

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI FEDERICO**

**II**

**FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE CLINICHE**

**E FARMACO TOSSICOLOGICHE VETERINARIE**

*(Curriculum farmaco-tossicologico)*

**XX Ciclo**

**Triennio 2004-2007**

*Effetti di un'esposizione al Cadmio sul sistema glutatione e  
sull'accumulo del metallo in Sparus aurata*

**Coordinatore**

Prof. Angelo Persechino

**Docente guida**

Prof.ssa Antonia Lucisano

**Candidata**

Dott.ssa Patrizia Luongo

## INDICE

|   |         |
|---|---------|
| <b>INTRODUZIONE</b>   |         |
| <b>Cadmio</b>   | Pag. 1  |
| Cadmio e ambiente   | Pag. 3  |
| Caratteristiche chimico-fisiche del cadmio  | Pag. 6  |
| Comportamento cinetico  | Pag. 7  |
| Meccanismo d'azione   | Pag. 9  |
| Aspetti tossicologici   | Pag. 12 |
| Tossicità acuta   | Pag. 13 |
| Tossicità a lungo termine   | Pag. 14 |
| Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi  | Pag. 17 |
| Effetti mutageni  | Pag. 21 |
| Effetti cancerogeni   | Pag. 22 |
| Effetti immunodepressivi  | Pag. 25 |
| Tossicità per le specie acquatiche  | Pag. 25 |
| <b>Enzimi antiossidanti</b>   |         |
| Il sistema glutatione   | Pag. 27 |
| Perossidazione lipidica   | Pag. 31 |
| <b>Scopo del lavoro</b>   | Pag. 31 |
| <b>PROCEDURE SPERIMENTALI</b>   | Pag.    |
| Esposizione degli animali   | Pag. 33 |
| Campionamento dei tessuti   | Pag. 34 |
| Analisi dei metalli   | Pag. 34 |
| Valutazioni enzimatiche   | Pag. 37 |
| Saggio Attività antiossidante totale (valutazione del glutatione)                                       | Pag. 37 |
| Saggio Glutazione reduttasi (GR)  | Pag. 40 |
| Saggio Glutazione perossidasi (GPx)   | Pag. 43 |
| Saggio Perossidazione lipidica (LPO)<br>(determinazione degli idroperossidi in fase acquosa e lipidica) | Pag. 45 |
| Analisi statistica  | Pag. 47 |
| <b>Risultati</b>  | Pag. 48 |
| Attività enzimatiche  | Pag. 51 |
| <b>Discussione e conclusione</b>  | Pag. 53 |
| <b>Bibliografia</b>   | Pag. 61 |

*Effetti di un'esposizione al Cadmio sul sistema  
glutazione e sull'accumulo del metallo in Sparus aurata*

Il cadmio è uno dei metalli pesanti più deleteri per gli ambienti acquatici e terrestri. Esso dà luogo a bioaccumulo e determina una serie di effetti tossici che comprendono a seconda della specie anemie, enfisema, danni al rene e al sistema scheletrico, necrosi testicolare.

Tra le specie animali i pesci sono quelle che meno possono sfuggire agli effetti dannosi determinati dalla sua presenza.

Da più parti si ritiene che oltre agli effetti tossici prima accennati la tossicità del Cd sia associata alla sua capacità di catalizzare reazioni ossidative che porterebbero alla produzione di specie reattive all'ossigeno (Bagchi et al 2000 e Shi et al 2005).

I pesci, come altri organismi, hanno sviluppato una serie di meccanismi per difendersi dagli effetti tossici del Cd e altri xenobiotici che provocano stress ossidativi. Per proteggersi dallo stress organi quali il fegato e il rene hanno attivato sistemi di difesa antiossidanti. Il sistema glutazione è uno dei più importanti, esso protegge i pesci dal danno ossidativo attraverso varie vie che comprendono la rimozione dei perossidi via glutazione perossidasi o glutazione S transferasi.

Lo studio che segue riporta i risultati di un esperimento condotto esponendo lo Sparus aurata al Cd in concentrazione che può essere considerata rappresentativa dell'esposizione ambientale, per verificare gli effetti sull'accumulo del metallo in tessuti target e sulla variazione dell'attività di alcuni enzimi antiossidanti.

## **INTRODUZIONE**

### **Cadmio ed ambiente**

Il cadmio è un metallo dotato di elevati effetti tossici senza alcun particolare ruolo fisiologico, che associa un accumulo preferenziale nei tessuti molli ad un'emivita prolungata connessa con la sua scarsa eliminazione dall'organismo.

La scoperta di questo metallo risale al 1817, ma il suo impiego e la sua estrazione a livello industriale iniziano a partire dagli anni '40.

La sua produzione è pari a 17.000 tonnellate, con conseguente emissione in atmosfera di 7.000 tonnellate di metallo.

Per quanto poco utilizzato allo stato puro, il cadmio è un costituente di molte leghe così come molto utilizzati sono i suoi composti (ossido, solfato e cloruri), alcuni dei quali un tempo trovavano impiego, per altro attualmente abbandonato, nella pratica terapeutica quali antielmintici, acaricidi, nematodici ed antisettici (Venugopal e Luckey, 1978).

Il suo impiego industriale riguarda sostanzialmente la produzione di batterie ricaricabili, dove rappresenta il polo negativo, l'elettrocadmio, la sua azione anticorrosiva per ferro ed acciaio e quella stabilizzante nella produzione della plastica e di pigmenti per vernici. Fra le fonti di contaminazione ambientale Stoepler (1991)

ricorda come il metallo sia altresì presenti nei fertilizzanti, nelle acque di scarico e nei fanghi di origine urbana.

Gli studi in questo senso indicano che nelle aree non contaminate la presenza naturale del cadmio ammonta alle concentrazioni di seguito riportate:

Tab. 1

| <b>Comparto ambientale</b>    | <b>Concentrazione (ppb)</b> |
|-------------------------------|-----------------------------|
| Acque dolci                   | 0.05-0.2                    |
| Oceani                        | 0.01-0.1                    |
| Sedimenti dei fiumi dei laghi | 5.000                       |
| Sedimenti marini              | 30.100                      |
| Suoli di origine vulcanica    | 10-1.000                    |
| Suoli vulcanici               | 4.500                       |
| Rocce ignee                   | 1-600                       |
| Rocce fosfatiche              | 100.000                     |

Questi valori, che vengono comunemente ritenuti non tossici, possono divenirlo nell'evenienza che il metallo sia in forma disponibile per una sua assunzione e al proposito va altresì sottolineato come queste concentrazioni possano essere oggetto di marcato incremento per fenomeni di bioaccumulo che possono determinare un incremento a valori tali da far risultare alcune specie fonte di tossicità per l'uomo o altri animali (Shuster e Pringle, 1969, Zarogian e Cheer, 1976; Zarogian, 1979).

Numerosi risultano i fattori fisici e chimici che possono influenzare un'assunzione del metallo da parte degli organismi viventi: fra questi Eisler (1985) ricorda soprattutto la possibilità di

assorbimento e di rilascio da parte di componenti del terreno, il suo pH, il potenziale redox, la struttura chimica, ecc. .

Per quanto concerne l'ambiente acquatico i fenomeni di assorbimento e di conseguente concentrazione del metallo nei fondali appaiono strettamente connessi alla loro natura, tanto che Gardiner (1974) ricorda come ad un contenuto unico si associ una maggiore capacità di assorbimento, mentre Eisler (1985) sottolinea come il metallo possa assumere concentrazioni fino a 500.000 volte superiori rispetto ai suoi livelli nelle acque in funzione della tipologia e della granulometria dei fanghi, della quantità di cadmio, di complessi ligandi presenti e della durata del contatto.

Dalle osservazioni di Khalid et al., (1981) nel fiume Mississippi emerge come un pH particolarmente acido ed un pH particolarmente acido ed un elevato potenziale redox possono aumentare, viceversa, la mobilizzazione del metallo dai fanghi con conseguente maggior possibilità di assunzione.

La quantità di ossigeno disciolto sembra influenzare positivamente la quantità di cadmio disciolto in forma altamente biodisponibile: condizioni di anaerobiosi riducono infatti tali livelli e determinano un aumento della frazione legata alle particelle non biodisponibile (Eisler, 1985).

Anche il rilascio delle quantità di metallo accumulate nel tempo dalle macrofite, che avviene dopo la morte, può avere un certo ruolo, sebbene a livello più locale che su larga scala, nell'incrementare i livelli e la biodisponibilità di cadmio nelle acque e nei suoli (Eisler, 1985).

Come già accennato, la biomagnificazione del cadmio è più importante nei livelli inferiori delle catene trofiche; Ferard et al. (1983) ad esempio definiscono il Fattore di BioConcentrazione (FBC) per una catena trofica a tre livelli (l'alga *Clorella vulgaris*, il cladocero *Daphnia magna* e il teleosteo *Leucopius delineatus*), che risulta essere pari a 2.550 per l'alga e zero per il teleosteo.

I livelli relativamente elevati che vengono riscontrati negli organismi posti ai livelli superiori delle catene alimentari sono fondamentalmente legati ai processi di accumulo, per sequestro nei tessuti sotto forma di complessi con la metallotioneina, che portano a concentrazioni crescenti con l'età.

### **Caratteristiche chimico-fisiche del cadmio**

Il cadmio è un metallo bianco-argenteo caratterizzato da punto di fusione di 321 °C e di ebollizione di 756°C, con un peso atomico di 112.4. Presenta un solo stato di ossidazione (2<sup>+</sup>), ma può formare complessi tetraedrici con valenza 4, complessi alogenati del tipo

$[\text{CdX}_3]$  e  $[\text{CdX}_6]^{4-}$  e sali stabili come il cadmiato sodico ( $\text{Na}_2[\text{Cd}(\text{HO})_4]$ ). A fronte di una totale insolubilità del metallo in acqua, i suoi sali di zolfo e cloro si dimostrano invece idrosolubili (Windholz et al., 1976). Non origina composti alchilici ed organici di interesse tossicologico comprovato (Lucisano, 1994). Il cadmio presenta una capacità di legame con ligandi tiolici che risulta inferiore solo a quella di piombo e mercurio e questo rende ragione dell'elevata affinità che questo elemento presenta per proteine quali l'emoglobina, ricche di gruppi leganti e del forte legame con i tessuti, tanto da rendere inefficaci gli agenti chelanti la sua rimozione.

### **Comportamento cinetico**

Le principali vie di assorbimento per l'uomo e gli animali sono rappresentate da quella inalatoria e gastroenterica; la prima riveste particolare importanza soprattutto per l'uomo, che può risultare esposto all'elemento per motivi occupazionali.

L'entità dell'assorbimento del cadmio varia in funzione della via di esposizione, tanto da risultare pari ad un 5% nell'uomo e ad un 1-6% negli animali nel tratto gastroenterico, dove il fenomeno è influenzato non solo dalla solubilità del sale ma anche dai livelli di zinco, quando invece la via inalatoria ne comporta un passaggio in

circolo che oscilla tra un 25 e un 50% (Johnson e Sigman, 1971; McLellan et al., 1978; Friberg et al., 1986; Nordberg et al., 1985).

Una volta assorbito il cadmio si lega alle proteine plasmatiche, in maniera preponderante alle albumine e secondariamente alla metallotioneina circolante, per essere poi distribuito in tutti i tessuti molli, in particolare fegato e rene, nei quali è possibile reperire circa un 50% del contenuto totale. Tale accumulo preferenziale è fondamentalmente legato alle elevate concentrazioni di metallotioneina riscontrabili in questi substrati, le cui cellule possono sintetizzare elevate quantità di proteina.

A livello renale i complessi cadmio-tioneina circolanti vanno incontro a fenomeni di pinocitosi, che ne comportano un ingresso all'interno delle cellule tubulari, un catabolismo della frazione proteica ed un successivo legame del cadmio alla metallotioneina sintetizzata in loco (Flower et al., 1985).

Il metallo non subisce alcun tipo di reazione metabolica ed i processi di detossificazione che si realizzano nell'organismo consistono fondamentalmente in una segregazione, sotto forma di chelati nei vari distretti. Il fenomeno comporta un'emivita del cadmio che per l'uomo è stata valutata in circa 30 anni, il che porta ad un

costante aumento delle sue concentrazioni tissutali nell'arco della vita.

Lo scarso assorbimento che il cadmio presenta in sede gastroenterica rende ragione del reperimento nelle feci di circa il 95% del metallo assunto per via orale, ma resta comunque difficile definire la quota realmente allontanata per un mancato assorbimento intestinale e quella connessa con una vera e propria escrezione del metallo assorbito, che può pervenire nel lume intestinale anche tramite la secrezione biliare.

Secondo Nordberg et al. (1985) solo lo 0.01-0.02% del carico corporeo viene escreto quotidianamente per via fecale o urinaria. Al proposito va ricordato come la quantità di cadmio effettivamente escreta con le feci e la bile risulti dipendente dalla concentrazione corporea e come ancora la sua presenza a livello urinario assuma significativa importanza solo nell'evenienza di episodi di tossicosi, quando il danno renale che il metallo arreca ne determina un'eliminazione attraverso questa via.

### **Meccanismo d'azione**

Il cadmio è in grado di legarsi fortemente ai numerosi ligandi di molecole proteiche enzimatiche, con conseguente alterazione della loro struttura e funzionalità.

In particolare Kägi e Hapke (1984) hanno delineato una scala di affinità per i diversi ligandi che in ordine decrescente può essere così schematizzata: tiolico ( $RS^-$ ), fosforico ( $RPO^-$ ), > cloridrico ( $RCI^-$ ), > carbossilico ( $RCOO^-$ ). Tale affinità è direttamente proporzionale ai siti leganti presenti sulle molecole interessate, e si dimostra pertanto più elevata per glutatione e metallotioneina.

A livello cellulare l'azione del metallo può comportare inibizione delle ossidasi a funzione mista, alterazioni di alcune attività di calcio e del suo trasporto transmembrana, blocco della fosforilazione ossidativa dei mitocondri e variazioni della funzionalità di vari metalloenzimi, quali alcool deidrogenasi, carbossipeptidasi; delta-ALA deidrasi, superossido dismutasi, ecc. (Sporn et al., 1969; Webb, 1979; Goering, Waalkes e Klaasen, 1995).

Le interferenze a carico delle attività si applicano tramite il rilascio ai siti di deposito intracellulare ed un aumento dei livelli di inositol-fosfatasi, probabilmente a seguito di un'interazione con un recettore di membrana (Smith et al., 1989; Chern e Smith, 1992).

Al proposito va altresì ricordato come il cadmio possa sostituirsi al calcio nel legame alla calmodulina, proteina preposta alla regolazione di numerosi processi calcio-dipendenti, il che si traduce in un'azione calcio-agonista da parte del metallo, che può determinare,

in funzione della sua concentrazione, un'attivazione o un'inibizione degli enzimi calmodulino-sensibili, quali la fosfodiesterasi e l'adenosin-trifosfatasi Ca/Mg dipendente; il fenomeno trova convalida nel fatto che un trattamento con calmodulina-inibitori si dimostra in grado di apportare miglioramenti al quadro tossico (Donnelly, 1978; Forse et al., 1979; Anderson et al., 1984; Cox e Harrison, 1983; Habermann et al., 1983; Chao et al., 1984; Cheung, 1984; Mills e Johnson, 1985; Akerman et al., 1985; Richard et al., 1985).

La sostituzione dello zinco da parte del cadmio rende invece ragione della sua azione sui metalloenzimi, come comprovato dal fatto che carenze di zinco si traducono in un aggravamento degli effetti tossici (Vallee e Ulmer, 1972; Valee e Glades, 1974).

Il cadmio si dimostra altresì in grado di indurre l'attività della emeossigenasi, con conseguente incremento nella degradazione dell'eme, a sua volta responsabile di una riduzione dell'attività delle ossidasi a funzione mista e del contenuto di citocromo P450.

L'esposizione al cadmio comporta infine un aumento nella formazione di radicali superossido, suscettibili di indurre rotture del singolo filamento di DNA e perossidazione lipidica in vitro e nei tessuti target (Gabor et al., 1978; Stacey et al., 1980; Amoroso et al., 1982; Ochi et al., 1983; Wahba e Waalkes, 1990).

## **Aspetti tossicologici**

In funzione delle sue azioni su numerosi sistemi enzimatici, il cadmio si dimostra in grado di esplicare notevoli effetti tossici, con variazioni connesse a differenze nella via di assorbimento, nel dosaggio, nella specie e nel sesso (tab. 1).

Le sue interazioni con altri metalli, quali rame, zinco e ferro, possono comportarne modificazioni di tossicità. La presenza di zinco può infatti ridurre, se non addirittura prevenire, gli effetti tossici del cadmio, che si dimostra altresì in grado di diminuire l'assorbimento del ferro e del rame e di aumentare la deplezione epatica del primo e l'escrezione urinaria del secondo. Effetti protettivi nei confronti delle azioni tossiche del cadmio vengono esplicate anche dall'acido ascorbico, dalla vitamina D, dalla cisteina, dal glutatione e dal selenio (Worker e Migkovesky, 1961; Powell et al., 1964; Pond et al., 1966; Bunn e Matrone, 1966; Gunn et al., 1968; Anke et al., 1970; Fox e Fry, 1970; Fox et al., 1971; Freeland e Cousins, 1973; Whanger, 1973).

I principali effetti tossici rilevabili negli animali sono imputabili ad un'ingestione di diete contaminate; non fa eccezione l'uomo nel quale la tossicità del metallo è stata inizialmente rilevata nel corso di un episodio tossico verificatosi a Fuchu, in Giappone, e connesso con un'ingestione di riso contaminato dal metallo. La sindrome morbosa,

nota come “Itai-itai”, risultava caratterizzata da intense mialgie di natura reumatica, da marcata proteinuria, da osteomalcia e da disturbi della locomozione, con un prevalente interessamento delle donne di età compresa tra i 45 e i 70, in menopausa e pluripare.

*Tossicità acuta* I quadri tossici da cadmio insorgono fondamentalmente per assunzione orale e inalatoria di particelle di metallo o di suoi sali, le cui solubilità e dimensioni influiscono notevolmente sulla tossicità dell'elemento, in ragione di variazioni apportate nell'assorbimento rispettivamente a livello gastroenterico e polmonare.

Un'esposizione acuta al metallo comporta inizialmente l'insorgere di fenomeni irritativi a carico del tessuto interessato (tratto gastrointestinale o polmonare), ai quali fanno seguito nausea, vomito, scialorrea, diarrea e dolori addominali, quadro questo che risulta particolarmente grave ed intenso nei roditori, in ragione della loro incapacità a vomitare. A seguito di inalazione si presentano anche dolori toracici, dispnea, vertigini, con successivo instaurarsi di polmonite e di edema polmonare ad esito fatale (Lucisano, 1994).

La somministrazione parenterale di una singola dose di sali solubili induce lo sviluppo di fenomeni necrotici a carico del testicolo e dei gangli sensoriali, che per dosi più elevate si associano a necrosi

epatica e danni in numerosi altri organi (Elidere, 1985). Secondo Dudley et al., (1982) il fegato costituisce l'organo target dopo assorbimento di dosi elevate di cadmio e a carico di questa struttura vengono descritti necrosi del parenchima, degenerazione del reticolo endoplasmatico rugoso e dei mitocondri nonché proliferazione del reticolo endoplasmatico liscio.

Molti dei fenomeni tossici descritti in precedenza, quali ad esempio la necrosi testicolare, possono essere prevenuti da pretrattamenti condotti con basse dosi di cadmio e/o dalle somministrazioni ripetute dell'elemento, che si ritengono in grado di stimolare la sintesi di nuova metallotioneina suscettibile, in ragione della sua capacità di sequestrare il metallo, di svolgere funzione protettiva per l'organismo (Nordberg, 1971).

*Tossicità a lungo termine* Il quadro dell'intossicazione cronica da cadmio è sostanzialmente caratterizzato da nefro- ed epatopatia, ostemalacia e da danni a carico dell'apparato polmonare.

L'interessamento renale si instaura per concentrazioni tissutali superiori ai 200  $\mu\text{g/g}$  e determina disfunzioni a carico dei tubuli prossimali, con riscontro di elevati livelli di cadmio nelle urine, proteinuria, aminoaciduria, glicosuria e fosfaturia. I primi sono fondamentalmente legati ad un riassorbimento dei complessi cadmio-

metallotioneina a livello tubulare con conseguente azione lesiva sulle cellule del tubulo stesso. La proteinuria, irreversibile, viene attribuita ad un diminuito riassorbimento proteico nel tubulo prossimale e viene riguardata come un primo sintomo di intossicazione cronica da cadmio, dal momento che la sua comparsa si verifica prima dell'instaurarsi del danno renale conclamato (Piscator, 1962; Roels et al., 1982; Friberg et al., 1986; Klaasen, 1990; Goyer, 1991).

Autori diversi (Perry e Schroeder, 1995; Schroeder, 1965; Schroeder, 1966; Kanisawa e Schroeder, 1969) descrivono nel ratto abbeverato con acqua contenente 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  di cadmio acetato ipertensione arteriosa ed assottigliamento delle arteriose renali, con alterazioni glomerulari che ricordano quelle riscontrate nell'ipertensione cronica benigna conseguente ad un'esposizione cronica professionale al metallo.

Per concentrazioni tessutali pari o superiori a 60  $\mu\text{g}/\text{g}$  a livello epatico si riscontra aumento dell'attività delle aminotransferasi, decremento delle ossidasi a funzione mista e diminuita integrità degli epatociti, quando i livelli anzidetti vengono superati. L'interessamento del fegato, che si instaura prima di quello renale, può tradursi in un rilascio di complessi cadmio-tioneina, suscettibili di passare nel torrente circolatorio e di accumularsi nel rene, dove si rendono

responsabili dei danni sopra ricordati (Foulkes, 1978; Cherian et al., 1984; Squibb et al., 1984; Dudley et al., 1985).

L'ostemalacia rilevabile a seguito di esposizioni protratte a basse quantità di cadmio viene attribuita alle alterazioni che il metallo può apportare nel metabolismo del calcio (Goering, Waalkes e Klaassen, 1955). Sia nell'uomo (sindrome "Itai-itai") che negli animali da laboratorio la perdita del tessuto osseo e le alterazioni indotte dal cadmio assumono maggiore gravità nelle femmine rispetto ai maschi e vengono interpretate come una conseguenza dell'azione diretta del metallo sul tessuto stesso: al proposito valgono i risultati di studi in vitro dai quali si rileva come il cadmio induce osteoporosi o osteopenia, connesse con un aumento di cellule osteoclasto-simili multinucleari in colture di cellule del midollo ed un incremento nel riassorbimento dell'osso in colture di osteociti fetali di ratto (Bhattacharyya, 1991). Una riduzione della crescita e una scarsa mineralizzazione delle ossa vengono altresì attribuite all'azione competitiva del cadmio nei confronti del calcio (Banis et al., 1969; Jacobs et al., 1974).

Fenomeni infiammatori ed irritativi, con bronchite cronica ed edema, suscettibili di evolvere in polmonite ostruttiva per metaplasia dell'epitelio alveolare, proliferazione degli istiociti e distruzione

alveolare, con enfisema normalmente letale sono i principali rilievi effettuabili a carico dell'apparato respiratorio. Nei soggetti sopravvissuti all'enfisema si riscontra sviluppo di una fibrosi polmonare bronchiale e dei vasi circostanti, che comportano dispnea, ridotta capacità vitale ed aumento del volume residuale respiratorio (Venugopal e Luckey, 1978).

In ragione dell'aumentato catabolismo dell'eme indotto dal cadmio, nei soggetti interessati si osservano stati anemici ai quali partecipano le interferenze che questo metallo può esplicare nell'assorbimento intestinale di ferro e calcio (Banis et al., 1969; Jacobs et al., 1974).

Negli animali in lattazione Miller et al. (1967) rilevano come un accumulo di metallo nella ghiandola mammaria comporti una netta riduzione della produzione latte, senza per altro il riscontro di quantità elevate di cadmio nel secreto.

*Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi* Il cadmio si dimostra in grado di influire sull'apparato riproduttore degli animali di entrambi i sessi e, in molte specie animali risulta altresì caratterizzato da una forte azione teratogena ed embriotossica (Goering, Waalkes e Klaassen, 1995).

Gli effetti esplicati sull'attività riproduttiva degli animali si dimostrano sia di natura diretta, per danni agli organi riproduttori e alle strutture accessorie, che indiretta, come conseguenza dell'alterazione dell'asse ipotalamo-pituitario-gonadico (Goering, Waalkes e Klaassen, 1995).

I primi sono più evidenti nel sesso maschile, dove si assiste a necrosi testicolare con sterilità permanente.

Il danno testicolare, che non si presenta nelle specie prive di scroto, nelle gonadi delle specie aviarie (che risultano più resistenti agli effetti tossici) e nei soggetti non ancora sessualmente maturi, è legato a lesioni del letto vascolare, suscettibili di edema delle cellule interstiziali, con ridotta produzione di androgeni nelle cellule del Leyding, necrosi delle cellule del Sertoli, inibizione della spermatogenesi e ridotta motilità spermatica (Pariezek, 1957;; Meek, 1959; Gunn et al., 1983). Dosaggi pari 0.2 mM/kg di cloruro di cadmio somministrati per via sottocutanea si dimostrano in grado di indurre sterilità negli animali da laboratorio e di inibire la spermiogenesi nel bovino dopo iniezione endovenosa; quest'ultima azione è stata riguardata come possibile castrazione chimica in tale specie animale, in quanto capace di sopprimere permanentemente la

produzione di sperma) (Chiquoine e Suntzeff, 1965; Malcom, 1972; Venugopal e Luckey, 1978).

Nel sesso femminile i danni di tipo diretto risultano meno accentuati rispetto al maschio, e si traducono in necrosi dei tessuti decidui e/o placentali in corso di gravidanza. Questi ultimi sono interpretati sulla base di un accumulo selettivo del metallo nella placenta (che viene così a proteggere il feto dal tossico) a causa della sua abbondanza di proteine inducibili metallotioneino-simili (Parizek e Zahox, 1956; Girod e Clavineau, 1964; Lohiya et al., 1976; Kotsonis e Klaassen, 1977; Waalkes et al., 1984; Goyer e Cherian, 1992). Gli effetti di tipo indiretto sono rappresentati da modificazione della funzione ovarica con decremento della produzione di estrogeni, il che si traduce in alterazione del normale sviluppo puberale degli individui (Parizek et al., 1968; Der et al., 1977).

Tali effetti sono connessi con un incremento degli enzimi preposti a sintetizzare, a livello ovarico, gli estrogeni a produrre un'alterazione dell'asse ipotalamo-pituitario-gonadico: un accumulo del metallo nella ghiandola pituitaria esita infatti in un'alterata dinamica della gonadotropina 8Der et al., 1977, Rehm e Waalkes, 1988).

L'assunzione di cadmio in corso di gravidanza nelle fasi immediatamente precedenti al periodo dell'organogenesi riduce la percentuale di impianti embrionali (per alterata funzionalità ovarica ed uterina) e comporta marcati effetti teratogeni (Giovini et al., 1980).

Questi ultimi sono in linea di massima rappresentati da anomalie scheletriche, soprattutto a carico del cranio e della porzione caudale, del tubo neurale e da un ritardo della crescita. I fenomeni sono stati rilevati sia in animali da laboratorio o domestici che in specie selvatiche: in particolare nel criceto si è rilevato come la somministrazione endovenosa alla madre di cadmio alla dose di 2 mg/kg effettuata all'ottavo giorno di gravidanza determini un aumento del riassorbimento fetale e malformazioni nella prole. Risultati di carattere analogo caratterizzano gli studi condotti nel ratto con la somministrazione orale di cadmio alla dose di 40 mg/kg tra il 6° e il 19° giorno di gravidanza e nella capra a seguito di trattamenti eseguiti con metallo addizionato nella dieta in quantità di 75 ppm.

Tra le specie selvatiche gli studi più approfonditi riguardano le forme acquatiche. Studi condotti su girini allevati in acque contenenti 5-7 ppm di cadmio hanno evidenziato la mancata chiusura del tubo neurale, mentre in embrioni di ciprinidi di acqua dolce allevati in ambiente contaminato con 37-57 ppb di metallo si assiste ad un

aumento delle deformità e dei coaguli sanguigni e ad una riduzione della percentuale di schiusa. Nel barbiglio blu (*Lepomis macrochirus*) concentrazioni di 80 ppb nell'acqua comportano edema, microcefalia e deformità delle pinne caudali (Ferm e Carpenter, 1967; Anke et al., 1970; Mills e Dalgarno, 1972; Pickering e Gast, 1972; Scharpf et al., 1972; Eaton, 1974; Ferm e Layton, 1981; Nakaschima et al., 1988).

Va infine sottolineato come sia gli effetti sulle gonadi che quelli teratogeni possano essere antagonizzati efficacemente dalla somministrazione di sali di selenio, cobalto e zinco, mentre invece quelli di piombo e mercurio esplicano un'azione sinergizzante nei confronti dei secondi (Parizek, 1957; Mason e Young, 1967; Gunn et al., 1968a; Gunn et al.b; Ferm e Layton, 1981).

*Effetti mutageni* Il cadmio si presenta come un potente agente mutageno e genotossico, sia in ceppi batterici che in modelli animali (Ferm and Layton, 1981). I riscontri effettuati al proposito mettono in evidenza una positività ai test di mutagenesi eseguiti con ceppi di *Salmonella* spp. ed alterazioni già evidenti in 12<sup>^</sup> ora nel numero di cromosomi a seguito di trattamenti per via sottocutanea nel topo con 3-6 ppm e in criceti con 1.5-3 ppm (Ferm e Layton, 1981).

Il meccanismo di questa azione mutagena viene interpretato sulla base del legame che il metallo contrae con due distinti siti del

DNA e che porta il cadmio ad intercalarsi tra i due filamenti di questa molecola, dove sostituisce lo zinco nell'acido desossiribonucleico e ad alterarne la trascrizione per destabilizzazione della struttura ad elica, cui si associa un'inibizione dell'attività della RNA polimerasi DNA-dipendente, in grado di alterare la trascrizione e l'espressione del codice genetico (Stoll et al., 1976; Webb, 1979; Waalkes e Poirier, 1984).

L'elevata affinità che caratterizza il cadmio per le basi dell'acido nucleico ne comporta un metabolismo aberrante, con cambiamenti nella sintesi del DNA ed accoppiamento errato delle basi stesse; nelle cellule di mammifero sono state infine rilevate rotture nella singola elica di DNA (Wacker e Vallee, 1959; Izatt et al., 1971; Loeb et al., 1977; Miyake et al., 1979; Coogan et al., 1992).

*Effetti cancerogeni* Registri internazionali, hanno di recente classificato il cadmio come cancerogeno umano, mentre più datati risultano i riscontri effettuati al proposito negli animali (IARC, 1976; Sunderman, 1978; Nomiyama, 1982; Oberdörster, 1986; Oberdörster e Cox, 1990; Waalkes e Oberdörster, 1990; IARC, 1993; Waalkes et al., 1993).

L'azione cancerogena del cadmio viene attribuita ad una sua attività promovente, in quanto studi in vitro delineano un'attivazione

dei pro-oncogeni c-jun e c-myc, e ad una stimolazione della crescita tumorale per legame al dominio esterno di recettori di membrana accoppiati alla fosfolipasi C (Smith et al., 1989; Jin e Ringertz, 1990; Chen e Smith, 1992; Tang Enger, 1992).

Gli effetti cancerogeni si rilevano soprattutto a carico del polmone, della prostata, del testicolo, del sistema emopoietico e del sito di iniezione o di impianto (Heath et al., 1962; Goering Waalkes, Klaassen, 1995).

Analogamente a quanto osservato nell'uomo anche gli studi condotti nel ratto mettono in evidenza come la comparsa di forme neoplastiche polmonari si verifichi sia a seguito di esposizione cronica continua che irregolare. L'attività oncogena del cadmio viene comunque ritenuta specie-specifica, in quanto non dimostrata nel topo e nel criceto (Takenaka et al., 1983; Oldiges et al., 1989; Heinrich et al., 1989; Glaser et al., 1990).

A livello prostatico le forme tumorali si presentano solo nei soggetti sessualmente maturi, a carico del testicolo sono state rilevate neoplasie delle cellule interstiziali ad opera di sali di cadmio sia iniettati direttamente nel tessuto interessato che dopo assunzione orale (Gunn et al., 1989; Waalkes e Rehm, 1992).

Piuttosto controverse risultano le osservazioni effettuate a carico del sistema emopoietico: a fronte infatti di un aumento di leucemie da esposizione cronica tramite l'alimentazione, il trattamento singolo con sali di cadmio per via sottocutanea ne comporta un loro decremento.

Parimenti la somministrazione sottocutanea di sali di cadmio determina nel topo un aumento del numero di linfonodi, quando invece nel criceto si assiste ad una sua diminuzione (Waalkes et al., 1991; Waalkes et al., 1992; Waalkes et al., 1994; Waalkes e Rehm, 1994).

L'attività cancerogena esplicata dal metallo nel sito di iniezione o d'impianto, per altro già nota da oltre 30 anni, viene interpretata sulla base di una permanenza *in situ* del metallo, in grado di svolgere un'azione irritante, meccanismo questo che si dimostra comune a molti metalli (Heath et al., 1962; Kazantzis, 1963; Haddow et al., 1964; Poirier et al., 1983; Waalkes et al., 1988; Waalkes et al., 1989; Waalkes e Oberdörster, 1990).

Indipendentemente dalla via di assunzione l'insorgenza di forme tumorali da cadmio può essere prevenuta dalla somministrazione di zinco (Gunt et al., 1963; Gunn et al., 1964; Oldiges et al., 1989; Waalkes et al., 1989).

*Effetti immunodepressivi* A carico del sistema immunitario il cadmio sembra avere effetti diversi e contrastanti: l'immunità umorale pare infatti subire un effetto stimolante ad opera di bassi dosaggi di metallo, mentre un loro marcato incremento ne comporta una depressione, quando livelli intermedi si dimostrano privi di attività in questo senso (Malavè e De Ruffino, 1984; Thomas et al., 1985; Borgman et al., 1986; Descotes, 1999). Tali differenze di comportamento vengono ipoteticamente interpretate da Dayan (1990) come conseguenza delle diversità di effettuazione degli studi, che vengono condotti con l'impiego di antigeni T-dipendenti o T-indipendenti e secondo una durata e una via di somministrazione tra loro diversificate.

### **Tossicità per le specie acquatiche**

Il Cd tra i metalli pesanti è uno dei più deleteri per i sistemi acquatici.

Elevata mortalità si riscontra in insetti, crostacei e teleostei già a concentrazioni superiori a 10 ppb, con valori di  $CL_{50}$  che variano in funzione della durata dell'esposizione, della durezza dell'acqua e dell'età dell'animale: la mortalità è infatti direttamente proporzionale alla prima e inversamente proporzionale alla seconda (Biesinger e

Christensen, 1972, 1972; Kumada et al., 1973; Chapman, 1978; Spehar et al., 1978; Carroll et al., 1979; Canton e Slooff, 1982).

Generalmente gli organismi marini, che vivono in acque più dure, hanno una maggior resistenza rispetto agli organismi d'acqua dolce: i valori ai quali compaiono sintomi di tossicità sono pari, infatti a 1.2-50 ppb per i primi e a 4-470 ppt per i secondi (Wayland, 2000).

Il Cd provoca significative alterazioni metaboliche e danni ai sistemi biologici (Zikic). Dopo essere penetrato nell'organismo dei pesci di acqua dolce attraverso le branchie il Cd si lega alle albumine e agli eritrociti nel sangue e viene trasferito ai tessuti e agli organi dove si lega alle proteine a basso peso molecolare che producono metallotioneine mediante induzione della sintesi dell'mRNA metallotioneine (Culds 1974, Gorge 1996).

Circa il 75% del totale del Cd accumulato nell'organismo dei pesci si deposita nel fegato e nel rene (Marafant 1976, Ciral 1995) ma può anche depositarsi nel cuore, nelle branchie e in altri tessuti (Vig 1996, Melgar 1997). Nei pesci il Cd causa la distruzione degli eritrociti, riduce i valori dell'ematocrito, la concentrazione dell'emoglobina e provoca anemia, osteoporosi ed enfisema. Il Cd influenza anche il numero delle cellule ematiche ed incrementa

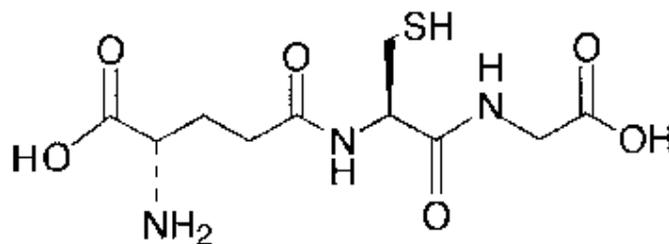
significativamente l'attività delle transaminasi (Nemesop 1981, Zkic 1997).

Da molti è ritenuto che la tossicità del Cd sia associata al danno ossidativi derivante dalla produzione di specie reattive all'ossigeno (ROS) (Bagchi et. al 2000, Shi et. al 2005) e che per difendersi dagli effetti tossici i pesci mettono in atto meccanismi di difesa di cui uno dei più importanti è il sistema glutatione. Esso protegge i pesci dal danno ossidativo attraverso varie vie che comprendono la rimozione dei perossidi e la riduzione dei radicali liberi.

### *Enzimi antiossidanti*

#### **Il sistema glutatione**

Il glutatione, uno dei più importanti sistemi antiossidanti; è un tripeptide costituito da 3 amminoacidi: cisteina, acido glutammico e glicina. Esiste in forma ridotta (GSH) ed in forma ossidata (GSSG) ed ha la seguente formula di struttura:



Il glutathione è presente nei tessuti di tutte le forme viventi in concentrazioni pari a 1 mM, per il 90% in forma ridotta e per il 10% in forma ossidata.

Il glutathione ridotto ha un ruolo essenziale per la salute degli organismi particolarmente degli organismi aerobici, per la sua attività detossicante e la capacità di chelare metalli pesanti e tossici. Negli animali, compresi gli esseri umani e nelle piante, rappresenta il tiolo non proteico intracellulare predominante ed ha un ruolo di massima importanza per il mantenimento dello stato di redox, elimina i radicali che si formano nella perossidazione dei lipidi che, causando la rottura di particolari membrane, hanno un impatto negativo su DNA e RNA e di conseguenza determinano danni cellulari e disfunzioni biochimiche.

Il glutathione protegge i pesci dal danno ossidativo attraverso la riduzione dei perossidi sia per via enzimatica, via glutathione perossidasi o via GSH-S-transferasi, sia per riduzione non enzimatica dei radicali liberi.

Il glutathione ridotto è un cofattore per le glutathione-S-transferasi, enzimi implicati nella detossificazione da xenobiotici inclusi quelli genotossici e quelli carcinogeni e per la glutathione perossidasi, importante enzima antiossidante contenente selenio. Esso svolge

inoltre un ruolo importante anche nella rigenerazione dell'ascorbato dalla sua forma ossidata.

Il glutatione ascorbato funziona da rapido donatore di ioni idrogeno e di elettroni ed ha un ruolo centrale nel meccanismo di difesa delle strutture cellulari in generale ed in particolare di quelle eritrocitarie nei confronti dei radicali liberi, dei perossidi e degli agenti ossidanti. Il sistema riducente derivante dalla cooperazione del GSH con l'attività ossidoriduttiva dell'ascorbato è, in condizioni normali, continuamente rigenerato attraverso una sequenza di reazioni che prevede l'intervento di due enzimi la glutatione perossidasi e la glutatione reduttasi.

Pertanto il meccanismo di difesa cellulare nei confronti di agenti ossidanti può essere così schematizzato:

|   |                                       |   |
|---|---------------------------------------|---|
| 1 | Ascorbato + Agente ossidante          | Deidroascorbato + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| 2 | Deidroascorbato + 2 GSH               | Ascorbato + GSSG                                |
| 3 | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 2 GSH | 2H <sub>2</sub> O + GSSG                        |
| 4 | GSSG + NADPH + H <sup>+</sup>         | 2 GSH + NADP <sup>+</sup>                       |

La deficienza funzionale di GSH, che si ha nei tessuti come conseguenza dello stress ossidativo può portare a forme patologiche. Per es. la deficienza di glucosio-6-fosfato-deidrogenato porta a produrre minore quantità di NADPH e quindi quantità più ridotte di glutatione, condizione questa caratterizzata da anemia emolitica. Lo stress ossidativo, causato da deficienza di GSH, provoca fragilità alle membrane degli eritrociti.

La glutatione reduttasi (GR) è un enzima che catalizza la riduzione del glutatione ossidato (GSSG) a glutatione ridotto (GSH). Si trova in molti tessuti e consente alla cellula di produrre livelli cellulari adeguati di GSH. E' un substrato per la GPx e per la glutatione S-transferasi.

La glutatione perossidasi (GPx), è presente in tutti i tessuti e gioca un ruolo cruciale nella protezione delle cellule dal danno indotto dai radicali liberi che si formano per la decomposizione dei perossidi.

Gli enzimi GPx catalizzano la riduzione del perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e di una gran varietà di perossidi organici ( $R - OOH$ ) ad alcoli stabili corrispondenti ( $R - OH$ ) ed acqua, usando GSH cellulare come agente riducente. Molte GPx cellulari contengono selenocisteina nel sito attivo, ma esistono anche GPx che non ne contengono. La selenocisteina partecipa direttamente alla donazione di elettroni al substrato dei perossidi e inizia il processo di ossidazione.

Molte malattie possono influenzare il livello di GPx, un incremento del livello di GPx è stato osservato nei reticolociti dei ratti diabetici; il livello torna alla normalità dopo somministrazione di insulina. Un decremento del livello dell'enzima è stato osservato in pazienti che soffrono di favismo o di leucemia.

## **La perossidazione lipidica**

La perossidazione lipidica contribuisce a determinare varie anomalie fisiopatologiche nei tessuti e nelle cellule.

Si è visto esserci correlazione fra incremento del livello di perossidazione lipidica negli eritrociti e insorgenza di diabete mellito nelle donne gravide e che i livelli dei perossidi sono estremamente elevati durante il 3° trimestre di gravidanza. Gli idroperossidi misurati nei pazienti normali e alcolizzati subiscono un incremento nei pazienti che hanno un eccesso di alcool nel sangue.

La misura del perossido di idrogeno nei tessuti è stata usata per studiare i diversi aspetti del danno indotto dai radicali liberi quali l'invecchiamento cellulare provocato dai raggi UV o gli effetti di elevati livelli di tirosinasi nelle cellule del melanoma. È stato anche dimostrato che il perossido di idrogeno è un potente mitogeno e arresta la crescita di cellule aortiche umane in coltura.

### ***Scopo del lavoro***

In questo studio sono stati valutati gli effetti dell'esposizione al cadmio a concentrazioni rappresentative della esposizione ambientale in un teleosteo molto diffuso, lo *Sparus aurata* (orata).

La scelta dell'orata è stata motivata dal fatto che essa è una specie predatrice rappresentativa dell'ecosistema mediterraneo quindi

facilmente reperibile, di notevole diffusione commerciale e capace di accumulare nei vari organi e tessuti muscolo-scheletrici il metallo in questione, mostrando interessanti fattori di bioconcentrazione con conseguente alta indicatività dei livelli di esposizione.

In particolare è stato studiato l'accumulo del cadmio in vari organi e tessuti e la concentrazione tissutale di zinco e rame che come è noto, sono correlati al cadmio anche per il legame che instaurano con le metallotioneine che, controllando i livelli di ioni liberi, neutralizzano gli effetti negativi dell'esposizione.

Non sono noti tutti i possibili effetti del Cd sulla morfologia e sulle capacità funzionali di organi e apparati di specie ittiche così come non sono del tutto elucidati i potenziali meccanismi d'azione a livello subcellulare e molecolare.

I residui di metalli agiscono a livello cellulare in modo diverso e spesso operano contemporaneamente a livello degli acidi nucleici, sulla struttura e funzione delle membrane, sull'attività enzimatica o sui meccanismi di controllo della sintesi degli enzimi. Non è ancora però del tutto chiaro quali sono i primi eventi, quali i successivi e quali i più dannosi per le strutture cellulari.

Da più parti è stato evidenziato che la tossicità del cadmio è associata al danno ossidativo derivante dalla produzione di specie

reattive dell'ossigeno e che per difendersi dagli effetti tossici i pesci mettono in atto meccanismi di difesa quali il sistema glutatione e la per ossidazione lipidica.

Pochi studi sono stati condotti allo scopo di esaminare gli effetti del Cd su tali enzimi e più in generale sugli enzimi antiossidanti nei pesci e in particolare sull'orata.

Partendo da queste premesse si è verificato se l'attività degli enzimi epatici ad azione antiossidante quali GSH, GR, GPx e degli idroperossidi acquosi e organici, coinvolti nei processi di detossificazione, venisse modificata dal trattamento.

## **PROCEDURE SPERIMENTALI**

### **Esposizione degli animali**

30 orate di circa 200 g. cadauna provenienti dall'allevamento di Valle Ca'Zuliani furono acclimatate per una settimana in condizioni controllate in vasche riempite con acqua di mare.

Dopo l'acclimatazione i pesci furono suddivisi in 5 vasche piene di acqua di mare. Tre vasche contenevano i pesci utilizzati come controllo; alle restanti due fu aggiunto Cd, sottoforma di CdCl<sub>2</sub>, in ragione di 0,1 mg/l, concentrazione che può essere considerata rappresentativa dell'esposizione ambientale.

## **Campionamento dei tessuti**

Il campionamento è avvenuto in tre fasi: la prima che interessava 6 esemplari di orate non esposte al cadmio (siglate come controlli al tempo T0); la seconda inerente 6 esemplari esposti per 4 gg al Cd e 6 esemplari di controllo non esposti (siglati come trattati T1 e controlli T1) e, infine, la terza che ha interessato 6 esemplari esposti per 11 gg al Cd e 6 esemplari di controllo (siglati come trattati T2 e controlli T2).

Gli esemplari raccolti sono stati immediatamente sacrificati ed eviscerati. Le branchie, il muscolo e parte del fegato sono stati pesati e congelati a  $-18^{\circ}\text{C}$  per l'analisi dei metalli. La restante porzione di fegato è stata ripetutamente lavata con PBS e conservata in azoto liquido a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'esecuzione dei saggi enzimatici.

## **Analisi dei metalli**

Le aliquote di tessuto muscolare, branchia e fegato pervenute in laboratorio sono state singolarmente pesate, associate in pool di 2 esemplari in modo da raggiungere per ogni campione analitico il peso di circa 1 grammo, ottenendo, quindi, per ogni tessuto da analizzare, 3 pool di controllo al tempo T0, 3 pool di esemplari esposti al tempo T1 e 3 pool di

controllo al tempo T1, 3 pool di esemplari esposti al tempo T2 e 3 pool di controllo al tempo T2 .

Per testare la metodica analitica relativa al dosaggio del Cd sono state effettuate delle prove su matrici (tessuto di mitilo) certificate a differente concentrazione di Cd (0,35  $\mu\text{g/g}$  e 1,3-1,6 $\mu\text{g/g}$ ) secondo il seguente schema analitico: 0,2 g di matrice liofilizzata sono stati mineralizzati in 1 ml di acqua ultrapura e 1 ml di  $\text{HNO}_3$  concentrato a  $120^\circ\text{C}$  per 90 minuti in sistema chiuso a ricadere. Le soluzioni acide sono state trasferite quantitativamente in capsula di porcellana, evaporate cautamente fino a secchezza e quindi incenerite in muffola a  $450^\circ\text{C}$  fino al raggiungimento di ceneri bianche. Le ceneri sono state riprese con acqua ultrapura acidificata con  $\text{HNO}_3$  0,3 M e lette all'assorbimento atomico senza fiamma. I recuperi ottenuti sono stati del  $96,90 \pm 10,94\%$  per entrambe le matrici certificate. I pool di tessuti di orata mineralizzati, insieme con un campione "bianco reattivo", con la stessa tecnica sono stati analizzati con Spettrofotometro ad Assorbimento Atomico con fornetto di grafite per il Cadmio e il Rame, con fiamma per lo Zinco.

Per la costruzione delle curve di calibrazione sono state utilizzate soluzioni standard Merck di Cd, Cu e Zn a concentrazione nota in  $\text{HNO}_3$  0,3 M.

Si riportano qui di seguito i Parametri \_ relativi alla determinazione spettrofotometrica, rette di calibrazione utilizzate, LOD, LOQ e recuperi.

Codificante di matrice Nitrato di Palladio 500 µg/L

**Cadmio:** Lunghezza d'onda lampada 228,80 nm

| Retta di calibrazione | Cd  |
|-----------------------|---|
| STANDARD 1            | 0,000 µg/L (soluzione di HNO <sub>3</sub> 0,3 M ) |
| STANDARD 2            | 0,100 µg/L  |
| STANDARD 3            | 0.250 µg/L  |
| STANDARD 4            | 0.500 µg/L  |

LOD 0,08ng/g

LOQ 0,24ng/g

recupero contro 2 matrici certificate (mitilo) con concentrazioni di Cd pari a 0,35 µg/g e 1,50 µg/g  
96,90 ± 10,94 %

**Rame:** Lunghezza d'onda lampada 324,80 nm

| Retta di calibrazione | Cu  |
|-----------------------|---|
| STANDARD 1            | 0,000 µg/L (soluzione di HNO <sub>3</sub> 0,3 M ) |
| STANDARD 2            | 1,000 µg/L  |
| STANDARD 3            | 2,500 µg/L  |
| STANDARD 4            | 5,000 µg/L  |

LOD 0,75 µg/g LOQ 2,25 µg/g

recupero ottenuto tramite aggiunta di quantità note a campioni di pesce 110,40 ± 5,00%

**Zinco:** Lunghezza d'onda lampada 23 1,90 nm

| Retta di calibrazione | Zn  |
|-----------------------|---|
| STANDARD 1            | 0,000 mg/L (soluzione di HNO <sub>3</sub> 0,3 M ) |
| STANDARD 2            | 0,125 mg/L  |
| STANDARD 3            | 0,250 mg/L  |
| STANDARD 4            | 0,500 mg/L  |

LOD 0,12 µg/g

LOQ 0,36 µg/g

recupero ottenuto tramite aggiunta di quantità note a campioni di pesce 88,00 ± 8,00%

## **Valutazioni enzimatiche**

Sui campioni di fegato di pesci esposti al cadmio (per 4 giorni e 11 giorni di trattamento) e sui campioni di controllo (soggetti non trattati e sacrificati a 0 giorni, 4 giorni e 11 giorni) sono state eseguite le determinazioni relative all'attività di enzimi antiossidanti.

Porzioni di fegato sono state lavate ripetutamente con PBS per allontanare quanto più possibile residui di sangue che potessero generare interferenze nei risultati durante le analisi successivamente eseguite; dopo pesata, le aliquote disponibili sono state conservate in azoto liquido.

La valutazione dell'attività enzimatica è stata effettuata adottando kit commerciali secondo le seguenti procedure sperimentali:

**Attività antiossidante totale (valutazione del glutatione)** Il saggio consente di misurare il livello di glutatione totale (GSSG+GSH) nei campioni biologici. I campioni sono stati prima deproteinizzati con una soluzione al 5% di acido 5-sulfosalicilico, centrifugati per rimuovere le proteine precipitate e poi sottoposti alla determinazione dei livelli di glutatione.

In breve, la misurazione del GSH si basa su di una cinetica enzimatica che quantizza le nmoli di GSH che causano una continua riduzione del 5,5'-ditiobis(acido 2-nitrobenzoico) (DTNB) a 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB). Nella sperimentazione, il prodotto della reazione

(TNB), di colore giallo, è stato misurato spettrofotometricamente a 412nm.

**Per le determinazioni è stato usato un kit della Sigma (Product code CS 0206) costituito dai seguenti componenti:**

- Glutazione tampone 5 x
- Glutazione reduttasi
- Glutazione ridotto
- Acido 5-5' ditiobis - 2- nitrobenzoico (DTNB)
- Acido 5-solfosalicilico
- NADPH
- Dimetilsolfossido (DMSO),

che sono stati utilizzati per la preparazione delle soluzioni e delle miscele di lavoro, secondo le indicazioni della casa produttrice, come appresso riportato:

- Soluzione stock di DTNB:  
8 mg di DTNB sono stati disciolti in 5,33ml di dimetilsolfossido.
- Soluzione stock di NADPH (40mg/ml):  
25 mg di NADPH sono stati disciolti in 0,625ml di acqua.
- Soluzione stock di Acido 5-solfosalicilico al 5%:  
2,5 mg di acido 5-solfosalicilico al 5% sono stati sciolti in 50ml di acqua.
- Soluzione standard di GSH (10 mM):  
0,3mg di GSH ridotto sono stati sciolti in 0,1 ml di acqua.

**Soluzioni di lavoro:**

- Tampone 1 x (Potassio fosfato 100 mM (pH7), con EDTA 1 mM):  
2,4ml di tampone 5x sono stati diluiti aggiungendo 9,6ml di acqua.
- Soluzione di enzima 6 U/ml  
3,8 µl di glutazione reduttasi sono stati portati al volume finale di 250 µl con il tampone 1x.
- Soluzione NADPH 0,16mg/ml  
A 10 µl di soluzione stock di NADPH (40 mg/ml) sono stati aggiunti 2,5 ml del tampone 1x.

**Miscela di lavoro:**

A 8ml di tampone 1x sono stati aggiunti 228 microlitri della soluzione dell'enzima (6 unità/ml) e 228 microlitri di soluzione stock di DTNB (1,5mg/ml) e si è mescolato bene.

- Soluzione standard di GSH:  
un'aliquota della soluzione standard di GSH (10 mM) è stata diluita 200 volte per portarla a 50 micromolare con una soluzione di acido 5-solfosalicilico al 5%.

Si è quindi preparata una serie di diluizioni di glutazione (schema 1) per allestire una curva standard di glutazione ridotto da utilizzare per calcolare per confronto con concentrazioni note di glutazione i livelli dell'enzima presenti nel campione.

**Schema 1 Preparazione della curva standard di GSH da una soluzione di GSH 50 µM.**

| Numero delle provette               | 1   | 2                 | 3                 | 4                 | 5                 |
|-------------------------------------|-----|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Concentrazione di GSH (µM)          | 50  | 25                | 12,5              | 6,25              | 3,125             |
| Soluzioni di GSH (µl)               | 50  | 25 dal pozzetto 1 | 25 dal pozzetto 2 | 25 dal pozzetto 3 | 25 dal pozzetto 4 |
| Acido 5-solfosalicilico (µl)        | -   | 25                | 25                | 25                | 25                |
| Nanomoli di GSH in 10µl di campione | 0,5 | 0,25              | 0,125             | 0,0625            | 0,0312            |

## Procedimento

a) deproteinizzazione del campione:

0,1 – 0,3g di fegato congelato sono stati omogeneizzati previa aggiunta di 3 volumi di soluzione di acido 5-solfosalicilico al 5% e successivamente di altri 7; si è continuata la omogeneizzazione del campione fino ad ottenere una sospensione che è stata lasciata a riposo per 10 minuti a 4°C. Si è quindi centrifugato a 10.000 giri per 10 minuti, misurato il volume del sovrantante e suddiviso il campione in aliquote di 20-100 µl, che sono state conservate a -80°C.

b) Misura assorbanza:

Dopo aver impostato il lettore di piastre sulla lunghezza d'onda di 412nm sono state eseguite letture multiple dell'assorbanza del campione per effettuare una cinetica enzimatica. Qui di seguito è riportato lo schema di reazione (schema 2c). I test sono stati condotti in duplicato.

**Shema 2 Schema di reazione**

|  | Mescolare e incubare 5 minuti |        |                   | Inizio reazione    |
|--|-------------------------------|--------|-------------------|--------------------|
|  | Volume del campione           | 5% SSA | Miscela di lavoro | NADPH<br>0,16mg/ml |
| <b>Bianco</b>                                | -----                         | 10µl   | 150µl             | 50µl               |
| <b>Curva standard<br/>(varie diluizioni)</b> | 10µl                          | ---    | 150µl             | 50µl               |
| <b>Campione<br/>sconosciuto</b>              | 5 µl                          | ---    | 150µl             | 50µl               |

La prima cuvetta contenente 10 µl di SSA al 5% è stata usata come bianco. Alle altre cuvette sono stati aggiunti 10µl di glutatione standard e volumi variabili (da 5 µl in poi) del campione sconosciuto,

a tutte sono stati aggiunti 150 microlitri della miscela di lavoro costituita da tampone potassio fosfato 95 millimolare: (pH 7,0); EDTA 0,95mM; NADPH (48nM) 0,038 mg/ml; DTNB 0,031mg/ml; GR 0,115U/ml e 0,24% di acido 5-solfosalicilico. Dopo aver mescolato e incubato la miscela per 5 minuti alla temperatura ambiente, sono stati aggiunti 50 microlitri di una soluzione di NADPH (0,16mg/ml) che consente di dare inizio alla reazione.

Dopo la lettura dell'assorbanza si è calcolata la quantità di GSH che è stata espressa in nmoli di GSH/ml di campione, usando la seguente formula:

$$\text{nmoli GSH/ml campione} = \frac{\Delta A_{412}/\text{min} \times \text{volume totale}}{\Delta A_{412}/\text{min} (1\text{nmole}) \times \text{volume pozzetto}}$$

**Saggio sulla Glutazione reduttasi (GR)** La GR catalizza la riduzione del GSSG (glutazione ossidato) a 2 molecole di GSH svolgendo pertanto un ruolo chiave nel mantenimento di adeguati livelli di glutazione ridotto nelle cellule.

Dopo omogeneizzazione dei campioni di fegato si è proceduto alla determinazione della concentrazione proteica del campione mediante metodo BIORAD. L'attività della GR è stata misurata spettrofotometricamente nei campioni monitorando il decremento

dell'assorbanza a 340 nm causato dalla riduzione dei livelli di NADPH, coenzima coinvolto nella reazione riduttiva del GSSG.

**Il kit (Sigma Product code GRSA) è costituito dai seguenti componenti:**

- Glutazione reduttasi tampone potassio fosfato 100mM, pH 7,5; EDTA 1mM.
  - Glutazione reduttasi tampone diluito. Soluzione contenente tampone potassio fosfato 100mM; pH7,5; EDTA 1 mM e 1mg/ml di siero di albumina bovina.
  - Glutazione reduttasi controllo positivo Polvere liofilizzata contenente glutazione reduttasi del lievito, tampone potassio fosfato pH 7,5 con EDTA e tetralosio come stabilizzante.
  - NADPH
  - Glutazione ossidato
  - Acido 5'-5' ditiobis (2 nitrobenzoico)
- I componenti sono stati utilizzati per la preparazione delle soluzioni e delle miscele di lavoro:
- Glutazione reduttasi controllo positivo alla soluzione contenete tampone potassio fosfato 100mM, pH7,5, EDTA 1 mM e 38mg/ml di tetralosio. Si è aggiunta la GR ed 1ml di acqua in modo da ottenere un'attività maggiore di 1U/ml. La soluzione è stata conservata a -20°C.
  - Soluzione di NADPH: Si è disciolta nel tampone una porzione di NADPH pari a 1,85mg/ml per preparare una soluzione di 2 mM.
  - Soluzione di Glutazione ossidato:1,42mg/ml di glutazione ossidato è stato disciolto nel tampone per preparare una soluzione 2 mM.

### **Procedimento**

a) Preparazione del campione e determinazione delle concentrazioni proteiche

Campioni di fegato di orata (100-200mg) sono stati omogenati con PBS 1x più 1mM di PMSF più inibitori delle proteasi. Dopo aver centrifugato due volte a 13.000 giri per min. a 4°C per 15' e 10', si è mescolato il sovrantante e si è determinata la quantità di proteine contenute nel campione previo BIO RAD.

Si sono equilibrate le soluzioni di glutazione reduttasi tampone e glutazione reduttasi ossidato per 10 min prima di iniziare il saggio.

b) Valutazione attività

Si è predisposto lo spettrofotometro con il seguente programma:

$\lambda$  : 340nm

tempo iniziale: 10 sec

intervallo: 10 sec

n° di letture: 11

e lo si è azzerato con cuvette contenenti acqua.

Successivamente nelle cuvette sono state poste le seguenti soluzioni ai volumi indicati nello schema 3:

**Schema 3**

| <b>Soluzioni</b>        | <b>Volumi</b> |
|-------------------------|---------------|
| Glutatione ossidato 2mM | 250µl         |
| GR Tampone              | 175 - 225 µl  |
| Campione                | 0 - 50 µl     |
| NADPH 2mM               | 25 µl         |

La reazione è iniziata dopo l'aggiunta di NADPH. Dopo aver mescolato per inversione si sono piazzate le cuvette nello spettrofotometro e si è iniziata la lettura. Come bianco è stata usata la soluzione tampone.

L'attività è stata espressa in unità di GR definita come quantità di enzima che riduce 1mole di GSSG /min a 25°C e pH 7,5/ml o mg di proteine.

$$\text{unità di GR/ml} = \frac{(\Delta A \text{ campione} - \Delta A \text{ bianco}) \times \text{fattore diluizione}}{\epsilon^{\text{mM}} \times (\text{vol. campione in ml})}$$

Per NADPH  $\epsilon^{\text{mM}} = 6,22$

**Saggio sulla Glutazione perossidasi (GPx)** La GPx catalizza la conversione dei perossidi, potenzialmente tossici per la cellula in quanto capaci di generare processi radicalici, in derivati alcolici non tossici. Il coenzima riducente è il GSH che viene quindi ossidato a GSSG a sua volta ritrasformato in GSH dal GR e dalla NADPH. Il dosaggio della GPx viene effettuato in maniera indiretta. Il campione in cui dosare l'attività della GPx è incubato con GSH ed un perossido organico (ter-butil-idroperossido); il GSSG formatosi dalla riduzione del perossido è ridotto dalla glutazione reduttasi e dall'NADPH, entrambi inclusi nella miscela di reazione. L'attività della GPx, che risulta proporzionale al decremento di NADPH, è valutata quantitativamente nel tempo monitorando, mediante spettrofotometro, la riduzione dell'assorbanza.

**Il kit utilizzato (Sigma Product code CGP1) è costituito dai seguenti componenti:**

- Glutazione perossidasi tampone, pH 8
- HCl 50mM + EDTA 0,5mM
- NADPH
- Ter-butil-idroperossido al 70% in soluzione acquosa
- Glutazione perossidasi standard.

Questi prodotti sono serviti a preparare soluzioni e miscele di lavoro, come appresso indicato.

- glutazione perossidasi tampone: è stata prelevata un'aliquota del tampone a pH8 e temperatura ambiente, avendo cura di maneggiare in ambiente sterile al momento dell'apertura.
- NADPH: una fiala è stata sciolta in 1,25ml di acqua e conservata a 2-8°C,
- ter-butil-idroperossido 30mM: 21,5 µl sono stati portati al volume totale di 5 ml,
- glutazione perossidasi standard: una fiala da 100 unità di glutazione perossidasi è stata sciolta in 1 ml di GPx tampone,

quindi diluita 400 volte fino ad ottenere una soluzione di lavoro pari a 0,25U/ml che è stata usata come controllo positivo per assicurarsi che la reazione avvenga.

Usando 20-25 µl della soluzione di lavoro nella reazione si sono ottenuti valori lineari in un range tra 0,005 e 0,002 unità/ml, che equivale ad un decremento dell'assorbanza di 0,032-0,13/min.

### **Preparazione del campione**

I fegati di orata, trattati come in precedenza descritto, sono stati diluiti con GPx tampone.

Sono state preparate diverse diluizioni del campione al fine di ottenere valori in un range lineare. La concentrazione finale dei reagenti nella miscela è stata NADPH 0,25 mM; glutatione ridotto 2,1 mM; glutatione reduttasi 0,5 U/ml, ter-butyl-idroperossido 300µM.

Si è predisposto il seguente schema di reazione (schema 4) e si è proceduto come segue.

**Schema 4: Schema di reazione della GPx**

|                           | GPx tampone µl | NADPH µl | Enzimi (0,25 unità/ml) | Campione (µl) | 30mM TBu-OOH (µl) |
|---------------------------|----------------|----------|------------------------|---------------|-------------------|
| <b>Bianco</b>             | µl 940         | 50       | -----                  | -----         | 10                |
| <b>Controllo positivo</b> | 890-920        | 50       | 20-50                  | -----         | 10                |
| <b>Campione</b>           | 890-930        | 50       | -----                  | 10-50         | 10                |

Le quantità di GPx tampone indicate nello schema sono state pipettate nelle cuvette di quarzo da 1ml mantenendo la temperatura nello spettrofotometro a 25°C. Si sono successivamente aggiunti 50 µl (microlitri) di NADPH e 50 µl di campione o 20-50 µl di enzima. La reazione ha avuto inizio per aggiunta di 10 µl di ter-butyl-idroperossido 30mM.

La riduzione dell'assorbanza è stata valutata a 340nm. Il programma di cinetica utilizzato è stato il seguente:

lunghezza d'onda 340 nM;

lettura iniziale dopo 15 sec, numero complessivo di letture 6 ad intervalli di 6 secondi.

L'attività enzimatica è espressa come unità di GPx/mg proteine utilizzando la seguente formula:

$$\text{Attività GPx/mg proteine} = \frac{\Delta A_{340} \times \text{fattore diluizione}}{6.22 \times \text{volume campione in ml}}$$

**Saggio sulla Perossidazione lipidica (LPO) (determinazione degli idroperossidi in fase acquosa e lipidica)** La valutazione degli idroperossidi acquosi e lipidici rappresenta uno dei metodi di valutazione dello stress ossidativo indotto nelle cellule da radicali liberi. La LPO porta alla formazione di perossidi e di aldeidi tossiche, quali la malondialdeide e l'idrossinonenale. La procedura si basa sul fatto che i perossidi ossidano a pH acido il  $\text{Fe}^{2+}$  a ioni  $\text{Fe}^{3+}$ . Gli ioni  $\text{Fe}^{3+}$  formeranno a 560nm un addotto colorato con lo xilenolo (tale prodotto è stabile per diverse ore). Nelle soluzioni acquose contenenti perossido d'idrogeno il prodotto colorato è reso più visibile dall'aggiunta del sorbitolo alla miscela di reazione. Per gli idroperossidi lipidici il reagente acquoso non è consigliabile in quanto il sorbitolo causa massiva perossidazione degli stessi lipidi comportando la formazione di un falso segnale. Si è utilizzato, quindi, un reagente metanolico contenente xilenolo e idrossitoluene butilato (BHT) (antiossidante che previene l'effetto di una eccessiva perossidazione.)

**Il kit utilizzato (Sigma Product code PD1) ed è costituito dai seguenti componenti:**

- soluzione acquosa di sorbitolo 100mM e xilenolo arancio;
- BHT 480mmol e xilenolo arancio 15 per ml in metanolo al 90%;
- solfato ferroso  $\text{NH}_4$ ;
- ter butil idroperossido in soluzione acquosa al 70%;
- $\text{H}_2\text{O}_2$  soluzione acquosa al 30%.
- Reagente colorato per perossidi acquosi costituito da sorbitolo 100mM e xilenolo arancio 125 $\mu\text{M}$
- Reagente colorato per perossidi lipidici BHT 480 $\mu\text{M}$  e xilenolo arancio 125 $\mu\text{M}$  e metanolo

### **Procedimento**

La preparazione di  $\text{H}_2\text{O}_2$  e la preparazione delle soluzioni di lavoro.

**Preparazione soluzione standard di  $\text{H}_2\text{O}_2$**  Per preparare una soluzione standard 100  $\mu\text{M}$  di  $\text{H}_2\text{O}_2$  da utilizzare per confronto con le soluzioni dei perossidi, la soluzione al 30% di  $\text{H}_2\text{O}_2$  è stata diluita con acqua deionizzata fino ad ottenere una soluzione 1M. La soluzione 1M ottenuta stata ulteriormente diluita e portata a 10mM. Si è quindi determinata l'esatta concentrazione spettrofotometricamente misurando l'assorbanza a 240nm e considerando nel calcolo della concentrazione il valore dell'assorbanza di una soluzione 10mM pari a 0,436.

Si è diluita ancora 10 volte per ottenerne una soluzione 100 $\mu\text{M}$ .

**Preparazione reagente colorato** Per preparare il reagente colorato per la determinazione dei perossidi si sono mescolati 10ml di reagente colorato per perossidi fase acquosa o per perossidi in fase organica (a seconda dei casi) con 100 $\mu\text{l}$  di solfato ammonico ferroso

**Determinazione dei perossidi** Si è seguito lo schema di reazione per l' $\text{H}_2\text{O}_2$  appresso indicato e piazzando 0, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{l}$  di soluzione standard di  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 $\mu\text{M}$  in cuvette che sono state portate al volume finale di 100 $\mu\text{l}$  con acqua deionizzata.

**Schema 5 Curva standard dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

| <b>100 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> soluzione (μl)</b> | <b>nmole per volume di reazione</b> |
|---|-------------------------------------|
| 0   | 0                                   |
| 10  | 1.0                                 |
| 20  | 2.0                                 |
| 40  | 4.0                                 |
| 60  | 6.0                                 |
| 80  | 8.0                                 |

Si è piazzato il campione in una cuvetta e lo si è portato al volume 100μl con acqua deionizzata.

Si è aggiunto in ogni cuvetta 1ml di reagente colorato, si è mescolato e incubato a 25°C per 50 minuti.

Il dosaggio del complesso colorato che i prodotti della LPO hanno formato a 25°C è monitorato spettrofotometricamente (a 560 e 590nm rispettivamente per gli idroperossidi acquosi e lipidici).

Le concentrazioni ottenute per confronto con la curva dell'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sono espresse in nmoli di perossidi/ml di campione utilizzando la seguente formula:

$$\text{nmole perossido/ml} = \frac{A_{560 \text{ o } 590} \text{ campione} - A_{560 \text{ o } 590} \text{ bianco} \times \text{ED}}{\text{-----}}$$

$$\text{-----} \quad A_{560 \text{ o } 590} (1\text{nmole perossido}) \times \text{vol. campione}$$

**Analisi statistica**

I risultati relativi ai livelli di cadmio, di rame e di zinco nei tessuti analizzati e quelli concernenti l'attività degli enzimi epatici ad azione antiossidante sono stati espressi come media ± deviazione standard.

Per l'analisi statistica dei risultati è stato utilizzato il metodo Anova (one-way analysis of variance) ed il Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test, che compara tra loro tutte le colonne di dati presi in esame. Sono state ritenute significative le differenze alle quali è associato un valore di P (P value) inferiore o uguale a 0.05 ( $P < 0.05$ ).

## **RISULTATI**

I risultati delle indagini relative all'accumulo del Cd e alle concentrazioni di Cu e Zn nelle orate di controllo e di quelle esposte per 4 e 11 giorni al Cd alla concentrazione di 0,1 mg/l sottoposti ad elaborazione statistica ed espressi come media  $\pm$  deviazione standard sono riportati nella tabella 3.

Cadmio dalla tabella emerge che già al 4° giorno si ha un aumento della concentrazione del Cd nei trattati rispetto ai controlli. Tale aumento ( $371,72 \pm 117,93$  vs  $51,67 \pm 31,10$  e  $209,43 \pm 111,38$  vs  $9,71 \pm 7,67$ ) diventa significativo all'11° giorno e limitatamente al fegato ed alle branchie ( $P < 0,05$  e  $P < 0,01$ , rispettivamente per il fegato e le branchie). Nel muscolo si riscontrano variazioni nel livello del metallo di non particolare rilievo.

Cu e Zn Da una prima disamina si evince che il contenuto in Cu in tutti i tessuti e per tutti i tempi valutati aumenta rispetto ai controlli

ma solo al 4° giorno si evidenziano nelle branchie differenze significative ( $P < 0,05$ ).

Il contenuto in Zn non subisce nei tessuti esaminati variazioni rispetto ai controlli. Esso inoltre è superiore da 3 a 12 volte al contenuto in Cu. Ciò è comprensibile considerando il ruolo essenziale che lo Zn svolge nell'organismo prendendo parte alla costituzione di più di 300 enzimi (Valee e Falchuk, 1993).

**Tab. 3 Contenuto in Cadmio, Rame e Zinco in tessuti di orate esposte in acqua di mare a cadmio alla concentrazione di 0,1mg/l**

| <u>Cd</u>        | T0 (0 giorni)                  |            |             | T1 (4 giorni)                  |             |              | T2 (11 giorni)                 |             |                  |
|------------------|--------------------------------|------------|-------------|--------------------------------|-------------|--------------|--------------------------------|-------------|------------------|
|                  | Media ± ds (µg/Kg peso fresco) |            |             | Media ± ds (µg/Kg peso fresco) |             |              | Media ± ds (µg/Kg peso fresco) |             |                  |
|                  | Branchia                       | Muscolo    | Fegato      | Branchia                       | Muscolo     | Fegato       | Branchia                       | Muscolo     | Fegato           |
| <b>Controllo</b> | 9,71±7,67                      | 16,45±3,07 | 51,67±31,10 | 20,59±5,18                     | 21,91±10,87 | 42,72±42,29  | 20,67±7,40                     | 23,94±11,06 | 174,32±59,14     |
| <b>Esposte</b>   |                                |            |             | 34,03±5,83                     | 24,85±9,20  | 119,83±67,76 | *209,43±111,38                 | 29,10±4,23  | ** 371,72±117,93 |

| <u>Cu</u>        | T0 (0 giorni)                  |           |           | T1 (4 giorni)                  |           |           | T2 (11 giorni)                 |           |           |
|------------------|--------------------------------|-----------|-----------|--------------------------------|-----------|-----------|--------------------------------|-----------|-----------|
|                  | Media ± ds (µg/Kg peso fresco) |           |           | Media ± ds (µg/Kg peso fresco) |           |           | Media ± ds (µg/Kg peso fresco) |           |           |
|                  | Branchia                       | Muscolo   | Fegato    | Branchia                       | Muscolo   | Fegato    | Branchia                       | Muscolo   | Fegato    |
| <b>Controllo</b> | 1,26±0,47                      | 0,85±0,36 | 3,24±0,77 | 1,85±1,48                      | 0,43±0,25 | 1,90±0,72 | 1,91±0,13                      | 1,44±0,21 | 6,54±0,20 |
| <b>Esposte</b>   |                                |           |           | **5,03±1,72                    | 0,82±0,76 | 3,57±2,36 | 3,39±1,00                      | 1,49±0,33 | 7,02±1,53 |

| <u>Zn</u>        | T0 (0 giorni)                  |            |            | T1 (4 giorni)                  |            |            | T2 (11 giorni)                 |            |            |
|------------------|--------------------------------|------------|------------|--------------------------------|------------|------------|--------------------------------|------------|------------|
|                  | Media ± ds (µg/Kg peso fresco) |            |            | Media ± ds (µg/Kg peso fresco) |            |            | Media ± ds (µg/Kg peso fresco) |            |            |
|                  | Branchia                       | Muscolo    | Fegato     | Branchia                       | Muscolo    | Fegato     | Branchia                       | Muscolo    | Fegato     |
| <b>Controllo</b> | 26,82±10,59                    | 12,53±4,58 | 22,48±7,01 | 27,42±6,62                     | 8,40±2,88  | 25,09±4,27 | 24,37±5,43                     | 9,74±2,38  | 26,64±8,54 |
| <b>Esposte</b>   |                                |            |            | 23,37±3,68                     | 10,84±3,70 | 27,97±6,95 | 25,08±5,70                     | 10,53±2,98 | 23,20±5,12 |

\* P < 0,01

\*\* P < 0,05

## **Attività enzimatiche**

I dati relativi all'attività degli enzimi epatici ad azione antiossidante sono stati sottoposti ad elaborazione statistica ed espressi come media  $\pm$  deviazione standard.

I risultati ottenuti, esposti nella tabella 4, evidenziano, per quanto concerne il glutatione, la glutatione reduttasi e la glutatione perossidasi, una riduzione dei livelli enzimatici nei trattati rispetto ai corrispondenti controlli. Tale decremento espresso in nmoli di perossidi/ml di campione è significativo ( $P < 0.05$ ) per la glutatione perossidasi nei trattati a 4 giorni ( $0.967 \pm 0.161$  vs  $1.400 \pm 0.261$ ). Le modificazioni dei livelli degli idroperossidi in fase organica ed acquosa non risultano del tutto chiare e lineari. Dopo 4 giorni di trattamento si può evidenziare una marcata diminuzione, ma non del tutto significativa, dei radicali dell'ossigeno soprattutto riguardante gli idroperossidi in fase organica ( $151.0 \pm 12.66$  vs  $168.0 \pm 51.50$ ) cui segue un aumento dopo 11 giorni di trattamento ( $126 \pm 2.646$  vs  $105.0 \pm 23.516$  e  $63.700 \pm 4.770$  vs  $53.467 \pm 2.335$ ) rispettivamente per gli idroperossidi in fase organica ed in fase acquosa).

Tab 4

|   | <b>Giorno 0</b>  | <b>Giorno 4</b>  | <b>Giorno 11</b> |
|---|------------------|------------------|------------------|
| <b>GLUTATIONE</b><br><b>Nmoli/ml di campione</b><br><b>(media ± d.s.)</b>                       |                  |                  |                  |
| Controlli   | 71,176 ± 24,588  | 64,400 ± 14,309  | 51,800 ± 16,516  |
| Trattati  |                  | 54,867 ± 11,086  | 40,333 ± 11,065  |
| <b>GLUTATIONE REDUTTASI</b><br><b>U/mg proteine</b><br><b>(media ± d.s.)</b>                    |                  |                  |                  |
| Controlli   | 0,026 ± 0,003    | 0,028 ± 0,021    | 0,026 ± 0,029    |
| Trattati  |                  | 0,015 ± 0,016    | 0,014 ± 0,002    |
| <b>GLUTATIONE PEROSSIDASI</b><br><b>Nmoli perossidi/ml di campione</b><br><b>(media ± d.s.)</b> |                  |                  |                  |
| Controlli   | 0,965 ± 0,230    | 1,400 ± 0,216    | 0,842 ± 0,148    |
| Trattati  |                  | 0,967 ± 0,161    | 0,627 ± 0,030    |
| <b>IDROPEROSSIDI FASE O.</b><br><b>Nmoli perossidi/ml di campione</b><br><b>(media ± d.s.)</b>  |                  |                  |                  |
| Controlli   | 106,330 ± 11,504 | 168,000 ± 51,507 | 105,000 ± 23,516 |
| Trattati  |                  | 151,000 ± 12,166 | 126,000 ± 2,646  |
| <b>IDROPEROSSIDI FASE A.</b><br><b>Nmoli perossidi/ml di campione</b><br><b>(media ± d.s.)</b>  |                  |                  |                  |
| Controlli   | 62,533 ± 5,921   | 82,667 ± 27,188  | 53,467 ± 2,335   |
| Trattati  |                  | 69,800 ± 4,359   | 63,700 ± 4,770   |

- P<0,05 vs controllo 4 giorni

## **Considerazioni e conclusioni**

L'esposizione sperimentale in acqua di mare dello Sparus aurata (orata) al cadmio alla concentrazione di 0,1ml/l che possiamo considerare rappresentativa della normale esposizione ambientale ha provocato accumulo di cadmio nel fegato e nelle branchie ma non nel muscolo dei soggetti esposti. I livelli sembrano aumentare per tutto il tempo dell'esposizione e raggiungono nel fegato e nelle branchie all'11° giorno di esposizione valori rispettivamente 7 e 11 volte più elevati di quelli dei controlli al tempo 0. La distribuzione del metallo rispecchia il ruolo funzionale degli organi analizzati ed i dati concordano con gli studi precedenti che indicano nel fegato e nelle branchie i target preferenziali.

Anche il contenuto in rame aumenta per tutto il tempo dell'esposizione.

La sua concentrazione a livello epatico conferma che il metallo tende ad accumularsi nel fegato dove si lega a metallotioneine e ad altre proteine, molte delle quali ad attività enzimatica.

I livelli di zinco, invece, non sembrano subire variazioni, lasciando ipotizzare che il periodo di esposizione non è stato sufficiente a modificare l'omeostasi.

Lo studio ha permesso anche di valutare l'attività epatica di enzimi antiossidanti da taluni ritenuti possibili marker di esposizione ai metalli.

Si è avuto nelle orate esposte al cadmio una riduzione dell'attività del GSH, della GR e della GPx. Viceversa le modificazioni dei livelli dei perossidi riscontrate non risultano del tutto chiare. Probabilmente questi risultati sono imputabili agli effetti di una iniziale risposta protettiva tissutale contro lo stress ossidativo dopo 4gg e al successivo instaurarsi di un danno ossidativo generato dalla ulteriore protratta esposizione al cadmio.

Va tuttavia considerato per quanto riguarda la valutazione delle attività enzimatiche che i dati riportati in letteratura spesso appaiono contrastanti. Sono infatti riportati talvolta effetti di stimolazione (Kostic et al 1993, Casalino et al 1997) talora di inibizione (Hussain et al 1987, Sharma et al 1991) o anche, negli stessi soggetti, di stimolazione di alcuni enzimi e di inibizione di altri (Manca et al 1991).

In conclusione, i dati ottenuti mostrano nel complesso come l'esposizione delle orate al cadmio sembri causare nel tempo un danno ossidativo correlabile sia alle variazioni nei livelli degli enzimi epatici ad azione antiossidante (in grado di reagire con radicali liberi e perossidi organici neutralizzando tali molecole potenzialmente dannose per le componenti cellulari) che all'aumento dei prodotti della perossidazione lipidica.

I dati, infine, incoraggiano a studiare ulteriormente il problema su popolazioni di pesci non solo in laboratorio, ma anche nell'ambiente naturale e a meglio verificare la possibilità di utilizzare il sistema antiossidante come marker dell'esposizione nella valutazione dell'impatto ambientale da metalli.

## BIBLIOGRAFIA

1. **Akerman K.E.O., Honkaniemi J., Scott I.G., Andersson L.C.**,(1985) "*Interaction of Ca<sup>2+</sup> with calmodulin activated (Ca<sup>2+</sup> + Mg<sup>2+</sup>)-ATPase activity of human erythrocyte ghosts*". **BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 845: 48**
2. **Amoruso M.A., Witz G., Goldstein B.D.**, (1982) "*Enhancement of rat and human phagocyte superoxide anion radical production by cadmium in vitro*" **TOXICOL. LETT., 10: 133**
3. **Andersson T., Drokenberg T., Forsen S., Thulin E.**, (1982) "*Characterization of the Ca<sup>2+</sup> binding sites of calmodulin from bovine testis using <sup>43</sup>Ca and <sup>113</sup>Cd NMR, Eur. J., BIOCHEM., 126: 501*
4. **Anke M., Henning A., Schneider H.J., Ludke H., Von Cagern W., Schlegal H.**, (1970) "*The interrelations between cadmium, zinc, copper and iron in metabolism of hens, ruminant and man*". In: **TRACE ELEMENT METABOLISM IN ANIMALS**, C.F. Mills Ed., Livingstone, Edinburgh, p. 317
5. **Banis R.J., Ponds W. G., Walker E.F., O'Connor J.R.**, (1969) "*Dietary Cd, Fe, and Zn interactions in growing rats*". **PROC. SOC EXP. BIOL MED., 130:**

802.

6. **Bagchi D., Joshi S.S., Bagchi M., Baimoori J., Benner E.J., Kuszynski C.A., Stohs S.J., (2000)** *“Cadmium and chromium induced oxidative stress, DNA damage, and apoptotic cell death in cultured human chronic myelogenous leukemia K562 cells, promyclocytic leukemia HL-60 cells, and normal human peripheral blood mononuclear cells”*. J. Biochem. Mol. Toxicol. **14**:33-41
7. **Bhattacharyya M. H., (1991)** *“Cadmium-induced bone loss: increased susceptibility in females”* WATER AIR SOIL POLLUTION, **57-58**:665
8. **Biesinger K.E. e Christensen G.M., (1972)** *“Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of Daphnia magna”*. J. FISH. RES. BOARD CANADA, **29**: 1691.
9. **Borgman R.F., Au B. e Chandra R.K., (1986)** *“Immunopathology of chronic cadmium administration in mice”* INT. J. IMMUNOPHARMACOL., **8**:813
10. **Bunn C.R. e Matrone G., (1966)** *“In vivo interactions of cadmium, copper, zinc, and iron in the mouse and rat”*. J. NUTR., **90**: 395.
11. **Canton J.H. e Slooff W., (1982)** *“Toxicity and accumulation studies of cadmium (Cd<sup>2+</sup>) with freshwater organisms of different trophic levels”*. ECOTOXICOL. ENVIRON. SAFETY, **6**:113
12. **Carroll J.J., Ellis S.J., Oliver W.S., (1979)**

- "Influences of hardness constituents on the acute toxicity of cadmium to brook trout (Salvelinus fontinalis)"*. BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., **22**:575
13. **Casalino E., Sbianco C., and Landriscina C.**, (1997) *"Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats. The possibility of iron involment in lipid peroxidation"*. Arch. Biochem. Biophys. **346**, 171-179
14. **Chao S.H., Suzuki Y., Zysk J.R., Cheung W.Y.**, (1984) *"Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionie radius"*. MOL PHARMACOL, **26**: 75
15. **Chapman G.A.**, (1978) *"Toxicities of cadmium, copper, and zinc to four juvenile stages of chinook salmon and steelhead"*. TRANS. AM. FISH. SOC., **107**: 841
16. **Chen Y.C. e Smith J.B.**, (1992) *"A putative lectin-binding receptor mediates cadmium-evoked calcium release"*. In TOXICOL. APPI. PHARMACOL., **117**:249
17. **Cherian M.G., Goyer R.A., Delaquerriere-Richardson L.**, (1976) *"Cadmium-metallothionein-induced nephrotoxicity"*. TOXICOL. APPL. PHARMACOL, **38**: 399
18. **Cheung W.Y.**, (1984) *"Calmodulin: its potential rote in cell proliferation and heavy metal toxicity"*.

FED. PROC., **43**:2995

19. **Chiquoine A.D. e Sutzeff V.**, (1965) "*Sensitivity of mammals to cadmium necrosis in the testis*". J. REPROD. FERTIL., **10**: 455
20. **Coogan T.P., Bare R.M., Waalkes M.P.**, (1992) "*Cadmium induced DNA damage: effects of zinc pre-treatment*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **113**:227
21. **Cox J.L. e Harrison S.D. Jr.**, (1983) "*Correlation of metal toxicity with in vitro calmodulin inhibition*". BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., **115**:106
22. **Dayan A.D., Hertel R.F., Helseltine E., Kazantzis G. Smith E.M., Van der Venne M.T.**, (1990) "*Immunotoxicity of metals and immunotoxicology*". PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL WORKSHOP. New York: Plenum Press.
23. **Der R., Fahim Z., Yousef M., Fahim M.**, (1977) "*Effects of cadmium on growth, sexual development and metabolism in female rats*". RES. COMMUN. CHEM. PATHOL. PHARMACOL., **16**: 485
24. **Descotes J.**, (1999) "*Immunotoxicology of drugs and chemicals: experimental and clinical perspectives*", 3<sup>rd</sup> edition. New York, Elsevier.
25. **Donnelly T.E.**, (1978) "*Effects of zinc chloride on the hydrolysis of cyclic GMP and cyclic AMP by the*

- activator-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine heart". BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 522:151*
26. **Dudley R.E., Gommel L.M., Klaassen C.D.**, (1985) "*Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity*". TOXICOL APPL PHARMACOL., **77**: 414
27. **Dudley R.E., Svoboda D.J., Klaassen C.D.** (1982) "*Acute exposure to cadmium causes severe liver injury in rats*". TOXICOL. APPL PHARMACOL., **65**:302.
28. **Eaton J.G.**, (1974) "*Chronic cadmium toxicity to the bluegill (Lepomis macrochirus Rafinesque)*". TRANS. AM. FISH. SOC., **103**:729
29. **Eisler R.**, (1985) "*Cadmium hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review*". PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 2.
30. **Elinder C.G., Kjellstrom T., Hogstedt C., Anderson K., Spang G.**, (1985) "*Cancer mortality of cadmium workers*". BR. J. IND. MED., **42**:651
31. **Ferard J. F., J. M. Jouany, R. Truhaut, and P. Vasseur.** (1983). "*Accumulation of cadmium in a freshwater food chain experimental model*". ECOTOXICOL ENVIRON. SAFETY **7**:43-52.
32. **Ferm V.H. e Carpenter S.J.**, (1968) "*The relationship of cadmium and zinc in experimental mammalian*

- teratogenesis*". LAB. INVEST., **18**: 429.
33. **Ferm V.H. e Layton W.M. Jr.**, (1981) "*Teratogenic and mutagenic effects of cadmium*". in J. O. Nriagu (ed.). CADMIUM IN THE ENVIRONMENT. Part 2, Health effects. John Wiley, New York Pag. **743-756**
34. **Forsen S., Thulin E., Lilja H.**, (1979); "*Cd NMR in the study of calcium binding proteins: troponin*" C. FEBS LETT., **104**:123
35. **Foulkes E.C.**, (1978) "*Renal tubular transport of cadmium- metallothionein*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **45**: 505.
36. **Fowler B.A., Goering P.L. e Squibb K.S.**, (1985) "*Mechanism of cadmium-metallothionein-induced metabolism*". In: METALLOTHIONEIN, PROC. SECOND INT. MEETING ON METALLOTHIONEIN AND OTHER LOW MOLECULAR WEIGHT METAL BINDING PROTEINS, Zurich 1985, J.H.R. Kagi e Y. Kojima Eds., Birkhauser Verlag, Basel.
37. **Fox M.R.S. e Fry B.E.Jr**, (1970) "*Cadmium toxicity decreased by dietary ascorbic acid supplements*". SCIENCE, **169**: 989
38. **Fox M.R.S., Fry B.E., Harland B.F., Schertel M.E. Weeks C.E.**, (1971) "*Effect of ascorbic acid on cadmium toxicity in the young coturnix*". J. NUTR., **101**: 1295
39. **Freeland J.H. e Cousins R.J.**, (1973) "*Effect of*

*dietary cadmium on anemia and iron absorption".*  
*FED. PROC*, 32 (3): 924

40. **Friberg L., Kjellstrom T., Nordberg G.F., (1986)** „Cadmium". In: Friberg L., Nordber G.F., vouk V.B. Eds., HANDBOOK ON THE TOXICOLOGY OF METALS, Vol. 2, 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier, New York, p.130
41. **Gabor S., Anca Z., Bordas E., (1978)** "*Cadmium-induced lipid peroxidation in kidney and testes: effect of zinc and copper*". *REV. ROUM. BIOCHIM.*, **15**:113.
42. **Gardiner J. (1974)** "*The chemistry of cadmium in natural water-II. The adsorption of cadmium on river muds and naturally occurring solids*". *WATER RES.* **8**:157-164.
43. **George S.G., Todd K., Wright J., (1996)** "*Regulation of metallothionein in teleosts induction of MTmRNA and protein by cadmium in hepatic and extrahepatic tissues of a marine flatfish, the turbot (Scophthalmus Maximus)*". *Comp. Biochem. Physiol C* **113**:109-115.
44. **Giavini E., Prati M., Vismara C., (1980)** "*Effects of cadmium, lead and copper on rat preimplantation embryos*". *BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL.*, **25**: 702.
45. **Girod C. e Chauvineau A., (1964)** «*Nouvelles observations concernano l'influence du chiorure de cadmium sur le testicule du Singe Macacus irus* ». *F. CUV. C. R. SOC. BIOL (Paris)*, **158**: 2113

46. **Glaser U., Hochrainer D., Otto F.J., Oldiges H.,** (1990) "*Carcinogenicity and toxicity of four cadmium compounds inhaled by rats*". CHEM.. ENVIRON. TOXICOL, **27**:153
47. **Goering P.L., Waalkes M.P., Klaasen C.D.,** (1995) "*Toxicology of cadmium*". In: TOXICOLOGY OF METALS, BIOCHEMICAL ASPECTS. Goyer R.A. e Cherian M. G. Eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcellona, Budapest, p. 189
48. **Gould E., Karolus J. J.,** (1974) "*Physiological response of the cunner, tautogolabrus disperses, to cadmium*". Noa. Tech. Rep., NMFS, SSRF **681**:21-25.
49. **Goyer R.A. and Clarkson T.W.** (2001): "*Toxic Effects Of Metals*", in: TOXICOLOGY OF POISONS (ed. Klaassen, C.D.); McGraw-Hill, New York, 811-868.
50. **Goyer R.A. e Cherian M.G.,** (1992) "*Kole of methallothionein in human placenta and rats exposed to cadmium*". In: Nordberg G.F., Herber R.F.M., Alessio L. Eds. CADMIUM IN THE HUMAN ENVIRONMENT. IARC, Lyon, p.239.
51. **Goyer R.A.,** (1989). "*Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity*" TOXICOL. LETT., **46**:153.
52. **Goyer R.A.,** (1990) "*Environmentally related diseases of the urinary tract*". ENVIRON. MED.,

**74: 377**

53. **Goyer R.A.**, (1996). *"Toxic effects of metals"*. In: CasarettDoull's Toxicology; THE BASIC SCIENCE OF POISONS, 5<sup>th</sup> edn., Klaassen C.D. (Ed.), McGraw-Hill, New York, pp.691-736.
54. **Gunn S.A., Gould T.C e Anderson W.A.D.**, (1968a)- *"Specificity in protection against lethality and testicular toxicity from cadmium"*. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., **128: 591**
55. **Gunn S.A., Gould T.C., Anderson W.A.D.**, (1963) *"Cadmium-induced interstitial cell tumors in rats and mice and their prevention by zinc"*. J. NATL CANCER INST., **31:745**.
56. **Gunn S.A., Gould T.C., Anderson W.A.D.**, (1964) *"Effect of zinc on cancerogenesis by cadmium"*. PROC. SOC. EXP. BIOL MED., **115:653**.
57. **Gunn S.A., Gould T.C., Anderson W.A.D.**, (1968b) *"Mechanism of zinc, cysteine and selenium protection against cadmium-induced vascular injury to mouse testis"*. J. REPROD. FERT., **15:65**.
58. **Habermann E., Crowell K., Janicki P.**, (1983) *"Lead and other metals con substitute for  $Ca^{2+}$  in calmodulin"*. ARCH. TOXICOL., **54:61**.
59. **Haddow A., Roe F.J.C., Dukes C.E., Mitchley B.C.V.**, (1964) *"Cadmium neoplasia: sarcomas at the site of injection of cadmium sulphate in rats and mice"*. BR. J. CANCER, **18:667**

60. **Heath J. C., Daniel M. R., Dingle J. T., Webb M.,** (1962) "*Cadmium as a carcinogen*". *Nature*, 193:592.
61. **Heinrich U., Peters I., Ernst H., Rittinghausen S., Dasenbrock C., Konig h.,** (1989) "*Investigation on the carcinogenic effects of various compounds after inhalation in hamster and mice*" *EXP. PATHOL.* **37**:253.
62. **Hussain T., Shulka S., and Chandra S.V.,** (1987) "*Effect of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats*". *Pharmacol. Toxicol.* **60**, 355-359
63. **IARC** (1976) "*Cadmium, nickel, some epoxides, miscellaneous industrial chemicals and general considerations on volatile anesthetics*". *INTL. AGENCY RES. CANCER*, Vol 28. Lyon, France, p. 205
64. **IARC**, (1993) "*Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry*". *INTL. AGENCY RES. CANCER*, Vol 58. Lyon, France, p. 119
65. **Izatt R., Christensen J., Rytting J.,** (1971) "*Sites and thermodynamic quantities with proton and metal ion interactions with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid and their constituent bases, nucleosides and nucleotides*". *CHEM. REV.*, **71**: 439.
66. **Jacobs R.M., Fox M.R.S., Fry B.E., Harland B.F.,**

- (1974) *"Effect of a two-day exposure of dietary cadmium on the concentration of elements in the duodenal tissue of Japanese quail"*. In: TRACE ELEMENT METABOLISM IN ANIMALS (W.G. Hoekstra, J.W. Suttie, H.E. Santher e W. Mertz Eds.), University Park Press, Baltimore, p. 684.
- 67.**Jin P e Ringertz N.**, (1990) *"Cadmium induces transcription of protooncogenes c-jun and c-myc in rat L6 myoblasts"*. J. BIOL. CHEM., **265**:14061
- 68.**Johnson A.D. e Sigman M.B.**, (1971) *"Early actions of cadmium in the rat and domestic fowl testis. IV. Autoradiographic location of <sup>115</sup>cadmium"* in J. REPROD. FERTIL, **24**:115.
- 69.**Kagi J.H.R. e Hapke H.J.**, (1984) *"Biochemical interaction of mercury, cadmium and lead"*. In: Nriagu J.O. Ed. CHANGING METAL CYCLES AND HUMAN HEALTH. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 237
- 70.**Kanisawa M. e Schroeder H.A.**, (1969) *"Renal arterial changes in hypersensitive rats given cadmium in drinking water"* EXP. MOL PATHOL, **10**:81
- 71.**Khalid R.A., Gambrell R.P., Patrick W.H. Jr**, (1981) *"Chemical availability of cadmium in Mississippi River sediment"*. J. ENVIRON. QUAL **10**:523.
- 72.**Klaassen C.D.**, (1990) *"Heavy metals and heavy-metalantagonists"*. In: Gilman A.G., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. Eds. GOODMAN AND GILMAN'S THE

PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS.  
McGraw-Hill New York, p 1152

73. **Katsonis F.N. Klaassen C. D.**, (1977) "*Toxicity and distribution of cadmium administered to rats at sublethal doses*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., 41:667
74. **Kostic M., Ogjanovic B., Dimitrijevic S., Zikic R., Stajn A., Rosic G.L., and Zivkovic R.V.** (1993) "*Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red cells of rats. In vitro effects*". Eur J. Haematol. **51**, 86-92
75. **Kraal M. H., Kraak Mhs, De Groot C. J., Davis C.**, (1995) "*Uptake and tissue distribution of dietary and aqueous cadmium by carp (Cyprinus Caprio).*" Ecotoxicol Environ Saf **31**:179-183.
76. **Kumada H., Kimura S., Yokote M., Matida Y.**, (1973) "*Acute and chronic toxicity, uptake and retention of cadmium in freshwater organisms*". BULL FRESHWATER FISH. RES. LAB. (Tokio), **22**:157
77. **Loeb L., Sirover M., Wymouth L., Dube D., Seal G., Agarwal S., Katz E.**, (1977)- "*Infidelity of DAN synthesis as related to mutagenesis and carcinogenesis*". J. TOXICOL. ENVIRON HEALTH, **2**:1297.
78. **Lohiya N.K., Arya M., Shivapuri V.S.**, (1976) "*The effects of cadmium chloride on the testis and*

*epididymis of the Indian hanuman Ianugr, Presbytis entellus entellus Dufresne*". ACTA EUR. FERTIL, **7:339**

79. **Lucisano A.** (1994) "*Cadmio*" in TOSSICOLOGIA VETERINARIA. A cura di C. Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp 167-170

80. **Malavè I e DeRuffino D.T.**, (1984) "*Altered immune response durino admium administration in mice*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL, **74:46**.

81. **Malcom D.**, (1971) "*Potential carcinogenic effect of cadmium in animals*". ANN. OCCUP. HYS., **15:33**.

82. **Marafante E.**, (1976) "*Binding of mercury and zinc to cadmium-binding protein in liver and kidney of goldfish (Carassius Auratus L.)*". Experientia **32:149-150**.

83. **Mason K.E. e Young J.O.**, (1967) "*Effectiveness of selenium and zinc in protecting against cadmium-induced injury of rat testis*". In: SYMPOSIUM: SELENIUM IN BIOMEDICINE, O.H. Muth Ed, AVI Publishing Co., Cunnecticut, p. 383

84. **McLellan J.S., Flanagan P.R., Chamberlain M.J. e Valberg L.S.**, (1978) "*Measurement of dietary cadmium absorption in humans*", in J. TOXICOL. ENVIRON. HEALTH, **4:131**

85. **Meek E.S.**, (1959) "*Cellular changes induced by cadmium in mouse testis and liver*". BR. J. EXP. PAHTHOL, **40:503**

86. **Melgar M. J., Perez M., Garcia M. A., Alonso J., Miguez B.,** (1997) "*The toxic and accumulative effects of short-term exposure to cadmium in rainbow trout (oncorhynchus Mykiss)*". Vet. Hum. Toxicol. **39**:79-83.
87. **Miller J. K., Perry S. C., Chandler P. T., Cragle R. G.,** (1967) "*Evaluation of radio cerium as a non-absorbed reference material for determining gastrointestinal sites of nutrient absorption and excretion in cattle*". J. DAIRY SCI., 50:355
88. **Mills C. F. e Dalgarno A. C.,** (1972) "*Copper and zinc status of ewes and lambs increased dietary concentrations of cadmium*". NATURE, 239:171
89. **Mills G. S., Johnson J. D.,** (1985) "*Metal ions as allosteric regulators of calmodulin*". J. BIOL. CHEM., **260**:15100
90. **Miyake M. Murata I., Osabe M., Ono T.,** (1979) "*Effect of metal cations on misincorporation by E.Coli DNA polymerises*". BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUNI., **77**:854.
91. **Nakashima K., Wakisaka T., Fujiki Y.,** (1988) "*Dose-response relationship of cadmium embriotoxicity in cultured mouse embryos*". REPROD. TOXICOL, **1**:293.
92. **Nemcsok J., Benedeczky I., Boross L., Asztalos B., Orband L.,** (1981) "*Subcellular localization of transaminase enzymes in fishes and their significance in the detection of water pollution*". Acta Biol. Szeged

27:9-15.

93. **Nomiyamo K.**, (1982) "*Carcinogenicity of cadmium*".  
JPN. J. IND. HEALTH, **24**:13.

94. **Nordberg G.F.**, (1971) "*Effects of acute and chronic cadmium exposure on the testicles of mice*".  
ENVIRON. PHYSIOL, **1**:171.

95. **Nordberg G. F., Kjellstrom T., Nordberg M.**, (1985)  
"*Kinetics and metabolism*" In: CADMIUM AND  
HEALTH, VOL. I, EXPOSURE, DOSE AND  
METABOLISM, Friberg L., Elinder C.G., Kjellstrom  
T. e Nordber G.F. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL,  
p.103

96. **Oberdorster G.**, (1986) "*Airborne cadmium and  
corcinogenesis of the respiratory tract*". SCAND. J.  
WORK ENVIRON. HEALTH, **12**:523

97. **Oberdorster G., Cox C.**, (1990) "*Carcinogenicity of  
cadmium in animals. What is the significance for man?*"  
CHEM. ENVIRON. TOXICOL, **27**:181

98. **Ochi T., Ishiguro T., Ohsawa M.**, (1983)  
"*Participation of active oxygen species in the induction  
of UNA single-strand scissions by cadmium chloride in  
cultured Chinese hamster cells*". MUTAT. RES.,  
**122**:169.

99. **Oldiges H., Hochrainer D., Glaser U.**, (1989)  
"*Preliminary results from a long-term inhalation study*"

- with four cadmium compounds*". TOXICOL ENVIRON. CHEM., **23**:35.
100. **Parizek J. e Zahox Z.**, (1956) "*Effect of cadmium salt on testicular tissue*". NATURE, **177**:1036
101. **Parizek J., Oskadolova I., Bemés I., Pitha J.**, (1968) "*The effect of a subcutaneous injection of cadmium salts on the ovaries of adult rat in persistent oestrus*". J. REPROD. FERTIL, **17**:559
102. **Parizek, J.**, (1957) "*The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc*". J. ENDOCRINOL., **15**:56.
103. **Perry H. M. e Schroeder H.A.**, (1955) "*Concentration of trace metals in urine of treated and untreated hypersensitive patients compared with normal subjects*". J. LAB. CLIN. MED., **45**:936.
104. **Pickering, Q. H. e M. Gast.**, (1972). "*Acute and chronic toxicity of cadmium to the fathead minnow (*Pimephales promelas*)*". J. FISH. RES. BOARD CANADA, **29**:1099.
105. **Piscator M.**, (1962) "*Proteinuria in chronic cadmium poisoning. I. An electrophoretic and chemical study of urinary and serum proteins from workers with chronic cadmium poisoning*". ARCH. ENVIRON. HEALTH, **4**:607.
106. **Pond W.G., Chapman P., Walker E.**, (1966) "*Influence of dietary zinc, corn oil, and cadmium on certain blood components, weight gain, and*

- parakeratosis in young pigs*". J. ANIM. SCI., **25**:122
107. **Powell G. V., Miller W. J., Morton J. D., Clifton C. M.,** (1964) "*Influence of dietary cadmium level and supplemental zinc on cadmium toxicity in the bovine*". J. NUTR., **84**:205
108. **Rehm S., Waalkes M.P.,** (1988) "*Cadmium-induced ovarian toxicity in hamsters, mice and rats*". FUND. APPL. TOXICOL, **10**:635
109. **Richard G., Federolf G., Habermann E.,** (1985) "*The interaction of aluminum and other metal ions with calcium-calmodulin-dependent phosphodiesterase*". ARCH. TOXICOL., **57**:257
110. **Roels H.A., Djubgang J., Buchet J.P., Bernard A., Lauwerys R.,** (1982) "*Evolution of cadmium-induced renal dysfunction in workers removed from exposure*". SCAND. J. WORK ENVIRON. HEALTH, **8**:191
111. **Sharma G., Nath R., and Gill K.D.** (1991) "*Effect of ethanol on cadmium induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat liver*". Biochem Pharmacol, **42**, S9-S16
112. **Scharpf L.G., Hill I.D., Wright P.L., Plank J.B., Keplinger M.L., Calandra J.C.,** (1972) "*Effect of nitroacetate on toxicity, teratogenicity and distribution of cadmium*". NATURE, **239**:231
113. **Schroeder H.A.,** (1965) "*Cadmium as a factor in hypertension*". J. CHRON. DIS., **18**:647.

114. **Schroeder H.A.**, (1966) "*Municipal drinking water and cardiovascular death rates*". J.A.M.A., **195**:81
115. **Shi H. S., Sui Y. X., Wang X. R., Luo Y., Ji L.L.**, (2005) "*Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of Carassius Auratus*". Comp. Biochem. Physiol. 140C. 115-121
116. **Shuster C. N. e Pringle B.H.**, (1969) "*Trace metal accumulation by the American Oyster, Crassostrea virginica*". 1968 PROC. NAT. SHELLFISH. ASSOC., **59**:91.
117. **Smith J.B., Dwyer S.D., Smith L.**, (1989) "*Cadmium evokes inositol polyphosphate formation and calcium mobilization. Evidence for a cell surface receptor that cadmium stimulates and zinc antagonizes*". J. BIOL. CHEM., **264**:7115
118. **Spehar R.L., Anderson R.L., Fiandt J.T.**, (1978) "*Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates*". ENVIRON. POLLUT., **15**:195.
119. **Sporn A., Dinu I., Stoenescu L., Cirstea A.**, (1969) "*Beitrage zur Ermittlung der Wechselwirkungen zwischen Cadmium und Zink*". NAHRUNG, **13**:461.
120. **Squibb K.S., Pritchard J.B., Fowler B.A.**, (1984) "*Cadmium metallothionein nephropathy: ultrastructural biochemical alterations and*

- intracellular cadmium binding*". J. PHARMACOL EXP. Ther., **229**:311
121. **Stacey N.H., Cantilena L.R. Jr, Klaasen C.D.,** (1980) "*Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **53**:470
122. **Stoeppler M.,** (1991) "*Cadmium*". In: Merian E. Ed., METALS AND THEIR COMPOUNDS IN THE ENVIRONMENT. VCH, New York, p.803.
123. **Stoll R., White J., Miya T., Bousquet W.,** (1976) "*Effects of cadmium on nucleic acid and protein synthesis in rat liver*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL, **37**:61
124. **Sunderman F. W. Jr.,** (1978) "*Carcinogenic effects of metal*". FED. PROC. **37**:140
125. **Takenada S., Oldiges H., Konig H., Hochrainer D., Oberdorster G.,** (1983) "*Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in Wistar rats*". J. NATL. CANCER INST. **70**:367
126. **Tang N. e Enger D.,** (1992) "*Cadmium's action on NRK-49F cells to produce responses induced also by TGF production or activation*" TOXICOLOGY, **71**:161
127. **Thomas P. T., Ratajczak H. V., Aranyi C.,**

- Gibbons R. e Fenters J. D.** (1985) "*Evaluation of host resistance and immune function in cadmium-exposed mice*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **80**:446
128. **Valle B.L. e Glades A.**, (1974) "*The metallo biochemistry of zinc enzymes*". ADV. ENZYMOL, **56**:283
129. **Vallee B.L. e Ulmer D.D.**, (1972) "*Biochemical effects of mercury, cadmium and lead*". ANNU. REV. BIOCHEM., **41**:91.
130. **Venugopal B. e Luckey T.D.**, (1978). "*Chemical toxicity of metals and metalloide*". METAL TOXICITY IN MAMMALS 2 *Plenum Press*, New York and London, pp. 24-32, 69-86,185-195, 248-253, 275-283
131. **Vigh P., Mastala Z., Balogh K. V.**, (1996) "*Concentration of grass carp (Ctenopharyngodon Idella Cuv. Et. Val) in a Shallow eutrophic lake and fish pond (possible effects of food contamination)*". Chemosphere **32**:691-701.
132. **Waalkes M.P., Coogan T.P. e Barter R.A.**,

- (1993) *"Toxicological principle of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium"*.  
CRIT. REV. TOXICOL., **22**:175
133. **Waalkes M.P., Oberdorster G.,** (1990)  
*"Cadmium carcinogenesis"*. In: Foulkes E.C. Ed.  
BIOLOGICAL EFFECTS OF HEAVY METALS, vol  
II: metal carcinogenesis. CRC Press, Boca Raton. FL,  
p. 129.
134. **Waalkes M.P., Poiner L.A.,** (1984) *"In vitro  
cadmium-UNA interactions: cooperativity of cadmium  
binding and competitive antagonism by calcium,  
magnesium and zinc"*. TOXICOL. APPL.  
PHARMACOL, **75**:539
135. **Waalkes M.P., Rhem S., Riggs C.W., Bare R.M.,  
Devor D.E., Poirier L.A. Wenk M.L., Henneman  
J.R.,** (1989) *"Cadmium carcinogenesis in the male  
Wistar [CrI:WI]BR rats: dose response analysis of  
effects of zinc on tumor induction in the prostate, in the  
testes and at the injection site"*. CANCER RES.,  
**48**:4656
136. **Wacker W.E.C. e Valle B.L,** (1959) *"Nucleic*

- acids and metals. Chromium, manganese, nickel, iron and other metals in ribonucleic acid from diverse biological sources". J. BIOL. CHEM., 234:3257.*
137. **Wabba Z. e Waalkes M.P.,** (1990) "*Effect on in vivo low-dose cadmium pretreatment on the in vitro interactions of cadmium with isolated interstitial cells of the rat testes*". *FUND. APPL. TOXICOL.*, **15:641.**
138. **Wayland M.,** (2000): "*Metals as threats to wildlife*" in Short course on wildlife toxicology. Canadian Cooperative Wildlife Centre. Saskatoon, 1-3 March 2000.
139. **Webb M.,** (1979) "*The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*". ELSEVIER/NORTH HOLLAND BIOCHEMICAL, New York
140. **Whanger P.D.,** (1973) "*Effect of dietary cadmium on intracellular distribution of hepatic iron in rats*". *RES. COMMUNI. CHEM. PATHOL PHARMACOL.*, **5:733**
141. **Windholz M., Budavari S., Stroumtsos L. Y. e Ferting M. N. Eds.,** (1976) *THE MERK INDEX,*

ninth editino. Merck and Co., Rahway, New Jersey

142. **Worker N. A. e Migicovsky B. B.**, (1961) "Effects of vitamin D on the utilization of zinc". J. NUTR. **75:222**
143. **Zarogian G.E. e Cheer S.**, (1976) "*Cadmium accumulation by the American oyster, Crassostrea virginica*". NATURE, **261:408**.
144. **Zarogian G.E.**, (1979). "*Studies on the depuration of cadmium and copper by the American oyster Crassostrea virginica*". BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL, **23:117**
145. **Zikic R. V, Stajn A. S., Ognjanovic B. I., Pavlovic S. Z., Saicic Z. S.**, (1995) "*Actives of superoxide dismutase and catalase in Erythrocytes and transaminases in the plasma of carps (Cyprinus Carpio L.) exposed to cadmium*". Physiol Res **46:391-396**.