

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE CLINICHE E FARMACO- TOSSICOLOGICHE VETERINARIE  
XVIII CICLO-TRIENNIO 2002-2003 2004-2005

---

**VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI ALCUNI  
INQUINANTI SU DIVERSE SPECIE NON  
CONVENZIONALI CON PARTICOLARE  
ATTENZIONE ALLE TARTARUGHE MARINE  
(*Caretta caretta*)**

Candidato:  
Dott.ssa Marina Zucchini

Docente Guida:  
Dott.ssa Annalisa Zaccaroni

Docente Coordinatore:  
Prof. Angelo Persichino

---

Università degli Studi di Bologna  
Facoltà di Medicina Veterinaria  
Sede Amministrativa:  
Università degli Studi di Napoli "Federico II"

*A mio padre che amava il mare, la  
natura e gli animali per avermi  
trasmesso questo amore*

# INDICE

<b>INDICE .....</b>	<b>3</b>
<b>PARTE INTRODUTTIVA .....</b>	<b>7</b>
<b>1.METALLI PESANTI E METALLOIDI .....</b>	<b>8</b>
1.1 ARSENICO .....	11
1.1.1. <i>Caratteristiche chimico-fisiche</i> .....	12
1.1.2. <i>Comportamento cinetico</i> .....	12
1.1.3. <i>Meccanismo d'azione</i> .....	13
1.1.4. <i>Aspetti tossicologici</i> .....	14
1.1.4.1. Tossicità acuta .....	17
1.1.4.2. Tossicità a lungo termine .....	17
1.1.4.3. Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi .....	17
1.2.4.4. Effetti mutageni .....	18
1.1.4.5. Effetti cancerogeni .....	19
1.1.4.6. Effetti immunodepressivi .....	20
1.1.5. <i>Impatto ambientale</i> .....	20
1.2. CADMIO .....	23
1.2.1. <i>Caratteristiche chimico-fisiche</i> .....	23
1.2.2. <i>Comportamento cinetico</i> .....	23
1.2.3. <i>Meccanismo d'azione</i> .....	24
1.2.4. <i>Aspetti tossicologici</i> .....	26
1.2.4.1. Tossicità acuta .....	28
1.2.4.2. Tossicità a lungo termine .....	28
1.2.4.3. Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi .....	29
1.2.4.4. Effetti mutageni .....	31
1.2.4.5. Effetti cancerogeni .....	31
1.2.4.6. Effetti immunodepressivi .....	32
1.2.5. <i>Impatto ambientale</i> .....	33
1.3. CROMO .....	37
1.3.1. <i>Caratteristiche chimico-fisiche</i> .....	37
1.3.2. <i>Comportamento cinetico</i> .....	38
1.3.3. <i>Meccanismo d'azione ed attività biologica</i> .....	41
1.3.4. <i>Aspetti tossicologici</i> .....	41
1.3.4.1. Tossicità acuta .....	44
1.3.4.2. Tossicità a lungo termine .....	44
1.3.4.3. Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi .....	45
1.3.4.4. Effetti mutageni .....	45
1.3.4.5. Effetti cancerogeni .....	46
1.3.4.6. Effetti immunodepressivi .....	46
1.3.5. <i>Impatto ambientale</i> .....	46
1.4. FERRO .....	48
1.4.1. <i>Caratteristiche chimico-fisiche</i> .....	48
1.4.2. <i>Comportamento cinetico</i> .....	49
1.4.3. <i>Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico</i> .....	50
1.4.4. <i>Aspetti tossicologici</i> .....	51
1.4.4.1. Tossicità acuta .....	54
1.4.4.2. Tossicità a lungo termine .....	54
1.4.4.3. Effetti cancerogeni .....	54
1.4.4.4. Effetti immunodepressivi .....	54
1.4.5. <i>Impatto ambientale</i> .....	55
1.5. MERCURIO .....	56
1.5.1. <i>Caratteristiche chimico-fisiche</i> .....	57
1.5.2. <i>Comportamento cinetico</i> .....	59
1.5.3. <i>Meccanismo d'azione</i> .....	61
1.5.4. <i>Aspetti tossicologici</i> .....	61
1.5.4.1. Tossicità acuta .....	62
1.5.4.2. Tossicità a lungo termine .....	63
1.5.5. <i>Impatto ambientale</i> .....	63

1.6. PIOMBO.....	66
1.6.1. Caratteristiche chimico-fisiche.....	67
1.6.2. Comportamento cinetico.....	67
1.6.3. Meccanismo d'azione.....	69
1.6.4. Aspetti tossicologici.....	70
1.6.4.1. Tossicità acuta.....	72
1.6.4.2. Tossicità a lungo termine.....	72
1.6.4.3 Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi.....	73
1.6.4.4. Effetti mutageni.....	74
1.6.4.5. Effetti cancerogeni.....	74
1.6.4.6. Effetti immunodepressivi.....	75
1.6.5. Impatto ambientale.....	76
1.7.RAME.....	78
1.7.1. Caratteristiche chimico-fisiche.....	78
1.7.2. Comportamento cinetico.....	78
1.7.3. Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico.....	79
1.7.4. Aspetti Tossicologici.....	80
1.7.4.1.Tossicità acuta.....	83
1.7.4.2. Tossicità a lungo termine.....	83
1.7.4.2. Effetti cancerogeni.....	83
1.7.5. Impatto ambientale.....	84
1.8.SELENIO.....	85
1.8.1 Caratteristiche chimico-fisiche.....	85
1.8.2. Comportamento cinetico.....	86
1.8.3. Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico.....	88
1.8.4. Aspetti tossicologici.....	88
1.8.4.1. Tossicità acuta.....	90
1.8.4.2. Tossicità a lungo termine.....	91
1.8.4.3. Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi.....	91
1.8.4.4. Effetti cancerogeni e anti-carcinogenici.....	92
1.8.4.5. Effetti immunodepressivi.....	92
1.8.5. Impatto ambientale.....	93
1.9.ZINCO.....	95
1.9.1. Caratteristiche chimico-fisiche.....	95
1.9.2. Comportamento cinetico.....	95
1.9.3. Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico.....	96
1.9.4. Aspetti tossicologici.....	98
1.9.4.1. Tossicità acuta.....	100
1.9.4.2. Tossicità a lungo termine.....	100
1.9.4.3. Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi.....	101
1.9.4.4. Effetti mutageni.....	101
1.9.4.5. Effetti cancerogeni.....	102
1.9.4.6. Effetti immunodepressivi.....	103
1.9.5. Impatto ambientale.....	103
1.10.FATTORI CHE CONDIZIONANO L' ASSORBIMENTO DEI METALLI PESANTI NELLE SPECIE SELVATICHE.....	104
1.10.1.Ambiente e alimentazione.....	104
1.10.2.Clima e stagione.....	105
1.10.3.Età e sesso.....	106
1.10.4.Presenza di altri metalli.....	107
1.11.PIOMBO E ANATIDI.....	108
1.11.1.Distribuzione ambientale del piombo.....	108
1.11.2.Modalità di penetrazione.....	110
1.11.3.Segni clinici.....	111
1.11.4. Anatomia patologica.....	112
1.11.4.1. Isto-patologia.....	113
1.11.5. Alterazione dei parametri ematici.....	114
1.12.METALLI PESANTI E TARTARUGHE MARINE.....	117
<b>2.INTERFERENTI ENDOCRINI.....</b>	<b>119</b>
2.1. DEFINIZIONE.....	120
2.2. GENERALITÀ.....	121
2.3. MECCANISMI D' AZIONE.....	123
2.4. RELAZIONE DOSE-RISPOSTA.....	124

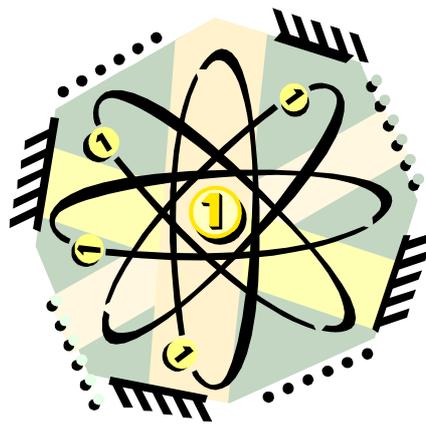
2.5. FATTORI DI ESPOSIZIONE.....	125
2.6. EFFETTI SULLA VITA SELVATICA .....	126
2.7. ENDOCRINOLOGIA E TOSSICOLOGIA ENDOCRINA .....	126
2.7.1. <i>L'asse HPG in specie non mammifere</i> .....	130
2.7.2. <i>L'asse HPA in specie non mammifere</i> .....	131
2.7.3. <i>L'asse HPT in specie non mammifere</i> .....	132
2.7.4. <i>Cross-talk ed alteratori endocrini</i> .....	133
2.7.5. <i>IE e vita selvatica</i> .....	133
2.7.5.1. IE e rettili.....	133
2.7.5.2 IE e pesci .....	135
<b>3. VITELLOGENINA E VITELLOGENESI.....</b>	<b>137</b>
3.1. SINTESI DELLA VITELLOGENINA (VTG) .....	138
3.2. INDUZIONE DELLA VITELLOGENESI NEI PESCI DURANTE LA FASE DI CRESCITA O IN MASCHI ADULTI.....	139
<b>PARTE SPERIMENTALE.....</b>	<b>141</b>
<b>4. STUDIO DEI METALLI PESANTI NEL CINGHIALE (<i>SUS SCROFA</i>).....</b>	<b>142</b>
4.1. CENNI DI BIOLOGIA DEL CINGHIALE (SUS SCROFA) .....	143
4.2. MATERIALI E METODI .....	146
4.2.1. <i>Campionamento</i> .....	146
4.2.2. <i>Analisi dei metalli pesanti</i> .....	147
4.2.3. <i>Analisi anatomo-istopatologiche</i> .....	148
4.2.4. <i>Analisi statistica</i> .....	148
4.3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	150
4.3.1. <i>Risultati tossicologici</i> .....	151
4.3.1.1. Ferro .....	159
4.3.1.2. Zinco .....	161
4.3.1.3. Rame .....	164
4.3.1.4. Cadmio .....	167
4.3.1.5. Piombo .....	174
4.3.2. <i>Risultati isto-patologici</i> .....	179
<b>5. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI TOSSICI DI PALLINI DA CACCIA DI DIVERSA TIPOLOGIA SU GERMANO REALE (<i>ANAS PLATHYRYNCOS</i>).....</b>	<b>187</b>
5.1. CENNI DI BIOLOGIA DEL GERMANO REALE ( <i>ANAS PLATHYRYNCOS</i> ) .....	188
5.2. MATERIALI E METODI .....	193
5.2.1. <i>Protocollo di trattamento</i> .....	193
5.2.2. <i>Protocollo autoptico e analisi anatomo-istopatologiche</i> .....	196
5.2.3. <i>Analisi tossicologiche</i> .....	196
5.2.3.1. Mineralizzazione dei campioni.....	196
5.2.3.2. Analisi dei campioni.....	197
5.2.4. <i>Analisi statistica</i> .....	198
5.3. RIAULTATI E DISCUSSIONE .....	199
<b>6. STUDIO DEI METALLI PESANTI E METALLAOIDI IN ESEMPLARI DI <i>CARETTA CARETTA</i></b>	<b>226</b>
6.1. CENNI DI BIOLOGIA DELLE TARTARUGHE MARINE.....	227
6.1.1. <i>Caretta caretta</i> .....	230
6.2. IMPATTO ANTROPOGENICO SULLE TARTARUGHE MARINE.....	232
6.3. MATERIALI E METODI.....	235
6.3.1. <i>Campionamento</i> .....	235
6.3.2. <i>Analisi dei metalli pesanti e metalloidi in tessuti</i> .....	236
6.3.2.1. Analisi del mercurio con generazione di idruri.....	236
6.3.2.2. Analisi dei metalli con tecnica di spettrometria di massa con sorgente al plasma (ICP-MS) .....	236
6.3.3. <i>Valutazione del Pb in campioni di sangue</i> .....	238
6.3.4. <i>Analisi statistica</i> .....	239
6.4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	240
6.4.1. <i>Risultati delle indagini necroscopiche e istologiche</i> .....	240
6.4.2. <i>Risultati dello studio dei metalli pesanti nei tessuti</i> .....	245
6.4.3. <i>Risultati e discussione sullo studio del Pb in campioni di sangue</i> .....	253

<b>7.STUDIO DELLA VITELLOGENINA IN PESCE SILURO (<i>SILURUS GLANIS</i>).....</b>	<b>256</b>
7.1.CENNI DI BIOLOGIA DEL PESCE SILURO .....	256
7.1.CENNI DI BIOLOGIA DEL PESCE SILURO .....	257
7.2.MATERIALI E METODI.....	258
7.2.1. <i>Campionamento</i> :.....	258
7.2.2 <i>Modalità analitiche</i> .....	264
7.2.2.1. Estrazione della VTG .....	264
7.2.2.2.Identificazione della VTG .....	264
7.2.2.3. Quantificazione della VTG.....	265
7.3. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	266
7.3.1. <i>Valutazione dell'efficacia della metodica UTILIZZATA</i> .....	267
7.3.2. <i>Valutazione dei livelli di vitellogenina nei campioni di <i>Silurus glanis</i></i> .....	270
<b>8.STUDIO DELLA VITELLOGENINA IN ESEMPLARI DI TARTARUGA MARINA (<i>CARETTA CARETTA</i>) .....</b>	<b>279</b>
8.1. MATERIALI E METODI.....	280
8.1.1. <i>Campionamento</i> .....	280
8.1.2. <i>Modalità analitiche</i> .....	281
8.2. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	281
<b>9. CONCLUSIONI .....</b>	<b>285</b>
<b>10.BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>290</b>
FONTI TELEMATICHE.....	347

# PARTE INTRODUTTIVA



## 1.METALLI PESANTI E METALLOIDI



I metalli pesanti sono elementi con caratteristico aspetto lucido, buoni conduttori di elettricità, che si comportano nelle reazioni chimiche da ioni positivi (cationi). Questa definizione si sostituisce a quella vecchia che si basava sulla densità dell'elemento e considerava come “ pesanti ” solo elementi con densità superiore 5. La nuova definizione, basandosi sulla chimica del metallo, permette così di considerare come importanti inquinanti anche elementi non “ pesanti ” come ad esempio l'alluminio (densità 1.5) che pur non essendo pericoloso in condizioni “ normali ” diviene un potente tossico se posto in acque acide.

Un metalloide è invece un elemento che a seconda delle condizioni presenta proprietà e aspetto fisico pur comportandosi chimicamente come un non metallo (As, B, Si, Ge, Sb, Te).

Metalli e metalloidi sono sostanze presenti nell'ambiente in qualità di elementi costitutivi dello stesso, nonché introdotti in seguito ad emissioni di tipo industriale. Come rappresentato in fig. 1, l'attività umana rappresentata dalle industrie, dagli insediamenti urbani (intesi in particolare come scarichi di reflui e di impianti di depurazione degli stessi), dalle attività di miniera e agricole, comportano un rilascio (nell'aria, nel terreno e nelle acque) di notevoli quantitativi di metalli (in particolare Cd, Zn, Pb, e Hg), che passano direttamente, per dilavamento dai terreni o legati ai sedimenti, nei bacini acquatici. Qui possono subire trasformazioni biologiche e chimiche, che ne comportano un accumulo nell'ambiente (sotto forma di sedimenti) e negli organismi, sia vegetali che animali, esplicando così la loro azione inquinante.

Sebbene attualmente l'esposizione a fonti antropiche risulti di prevalente importanza tossicologica, quella a fonti naturali (da dilavamento ed erosione delle rocce e successivo passaggio nelle acque e nei terreni) è risultata fondamentale per lo sviluppo, negli organismi viventi, di meccanismi di detossificazione, eliminazione ed utilizzo volti a ridurre, se non ad abbattere, la pericolosità dei metalli. Tali meccanismi consentono ad alcune specie animali di sopportare elevate concentrazioni tessutali, che viceversa possono risultare tossiche per altre, senza subire alcun danno (Wayland, 2000).

Nonostante i numerosi interventi svolti nell'ambito di piani nazionali ed internazionali tesi a limitare le emissioni di metalli pesanti nell'ambiente, molti dei quali effettuati con l'ausilio delle nuove tecnologie ed in seguito a limitazioni nell'impiego di alcuni elementi, alcuni di essi, come cadmio e piombo, possiedono ancora oggi un ruolo tossicologico preminente, mentre altri, quali zinco, ferro e rame, svolgono un ruolo fondamentale per il normale funzionamento degli organismi viventi, per cui sono definiti “elementi essenziali”.

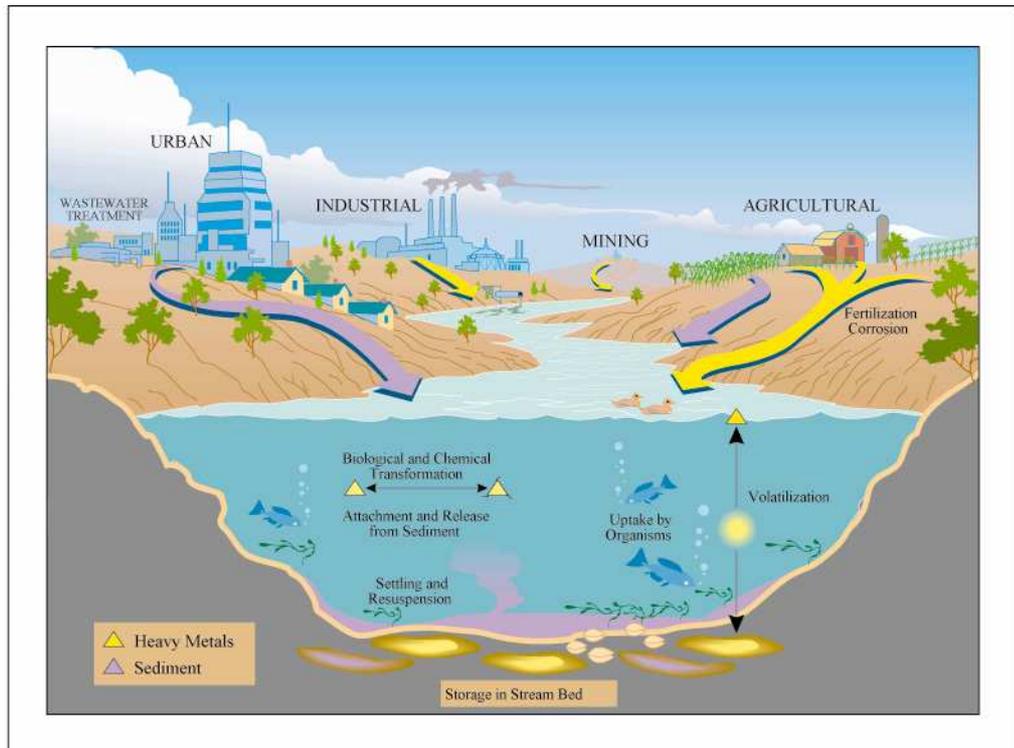


Fig.1.1 Fonti di inquinamento dei metalli pesanti ([http://wwwbrr.cr.usgs.gov/projects/sw\\_inorganic](http://wwwbrr.cr.usgs.gov/projects/sw_inorganic))

## 1.1 ARSENICO

L'arsenico è un elemento relativamente comune in natura, presente nell'aria, nel terreno, nell'acqua e nei vari tessuti. Fra i diversi elementi viene stimato essere al ventesimo posto come abbondanza nella crosta terrestre, al quattordicesimo negli oceani e al dodicesimo nel corpo umano. Generalmente in natura è presente sotto forma di solfuri: l' $\text{As}_2\text{S}_2$  o solfuro rosso o realgar, l' $\text{As}_2\text{S}_3$  o solfuro giallo o orpimento, l' $\text{FeAs}_2\text{S}$  o arsenopirite, sono i più comuni.

L'elemento viene normalmente recuperato, sotto forma di  $\text{As}_2\text{O}_3$ , come prodotto secondario della fusione del rame, del piombo, dello zinco e di altri metalli, lavorazioni che sono spesso causa di inquinamento ambientale. L'arsenico, in concentrazione variabili, è presente anche nel carbone combustibile e, durante la combustione, viene liberato nell'ambiente. La sua diffusione nell'ambiente ha visto un aumento seguito dall'uso di pesticidi ed erbicidi contenenti arsenico, anche se oggi l'utilizzo di tali preparati è stato praticamente abbandonato (Lucisano, 1994). L'As è anche usato come fungicida, algicida e come stimolatore per la crescita di piante e animali.

Nella maggior parte degli organismi, le concentrazioni di As sono, in genere, basse (<1.0 mg/kg peso fresco); risultano invece elevate nell'ambiente marino, dove, però, l'As è presente in larga misura come arsenobetaine che, essendo composti organici, rappresentano un rischio minore per gli organismi acquatici e chi se ne nutre. L'As, pur concentrandosi negli organismi, non va incontro a biomagnificazione nella catena alimentare (Eisler, 1988).

Diversi composti organici ed inorganici possono contenere arsenico. Il triossido di arsenico e gli arseniti sono composti inorganici dell'arsenico trivalente che possono provocare effetti tossici. Gli arsenicati di Pb, Ba e Na, usati come insetticidi o come conservanti del legno rappresentano, invece, i composti tossici dell'As pentavalente. Ancora, l'acido cacodilico e l'acido monometilarsonico, usati come erbicidi, sono quelli che tra i composti alifatici hanno maggiore interesse sul piano tossicologico. Infine tra i composti aromatici organici ricordiamo l'acido arsanilico e i suoi derivati, usati come auxinici zootecnici e come dispositivi per prevenire e limitare l'insorgenza di enteriti negli allevamenti avicoli e suinicoli.

Nell'acqua l'arsenico è presente sia in forma organica che inorganica, in forma disciolta o gassosa, per lo più in forma ionica (EPA, 1980).

Gli organismi marini, specialmente crostacei, possono contenere più di 100 mg As/kg di peso secco, in genere, come già precedentemente ricordato, in forma di arsenobetaine (Eisler, 1988). Le concentrazioni di arsenico nei tessuti di organismi

marini mostrano un vasto range di valori, in genere più alte nei lipidi, nel fegato e nei muscoli, che variano con l'età dell'organismo, l'area geografica e la vicinanza ad attività umane di immissione. (Eisler, 1988).

### 1.1.1. Caratteristiche chimico-fisiche

L'arsenico (As) è un metalloide che si presenta come un materiale grigio, cristallino, con numero atomico 33, peso atomico di 74,92, densità di 5,727, punto di fusione di 817°C, punto di sublimazione a 613° C (Woolson, 1975; NAS, 1977; NRCC, 1978; EPA, 1980-1985).

Presenta tre diverse valenze ( $3^-$ ,  $3^+$  e  $5^+$ ) ed è in grado di formare sali sia cationici che anionici. I sali arsenicali cationici sono reattivi e instabili ma acquistano stabilità se idrolizzati a sali arsenicali ossiacidi. L'AsH<sub>3</sub> (arsina), volatile, è piuttosto stabile e altamente tossico; forma complessi stabili a doppio legame con sali metallici (AgIAsH<sub>3</sub> o CuI<sub>2</sub>AsH<sub>3</sub>). I composti organici formano rapidamente complessi reversibili con i gruppi solfidrici e idrossilici delle proteine e degli aminoacidi (Venugopal e Luckey, 1978).

### 1.1.2. Comportamento cinetico

Solitamente gli animali entrano in contatto con il metalloide per ingestione, per inalazione o per contatto cutaneo; la sensibilità è specie-specifica e influenzata da diversi fattori, come la forma in cui si trova l'As, la via di somministrazione e la dose (Eisler, 1988)

L'arsenico nelle forme in cui è normalmente presente nel cibo viene prontamente assorbito e rapidamente escreto (Coulson et al, 1935). Anche il triossido di arsenico (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) viene assorbito facilmente presentando però un periodo di ritenzione a livello tissutale più lungo e viene escreto in proporzioni quasi uguali con le feci e con le urine (Coulson et al, 1935; Overby e Frederickson, 1963).

Facile risulta anche l'assorbimento dei composti organici che vengono rapidamente rimossi dai tessuti ed escreti principalmente con le feci (Frost et al, 1955, Hanson et al, 1955, Overby e Frost, 1960, Overby e Frederickson, 1963).

I composti arsenicali introdotti per via inalatoria vengono completamente assorbiti a livello polmonare e dalle superfici mucose di tutto l'apparato respiratorio.

Anche la pelle risulta essere una via d'assorbimento dell'arsenico, che a questo livello è maggiore se i composti sono lipo-solubili o presenti in unguenti ad alto contenuto di lipidi ( Venugopal e Luckey, 1978).

Una volta assorbito l'arsenico si riversa nel torrente ematico dove si lega alle proteine plasmatiche, in particolare alle  $\alpha$ -globuline (Reilly, 2002) nonché alle globuline dell'emoglobina negli eritrociti (Venugopal e Luckey, 1978) e viene

trasportato rapidamente a fegato, reni, polmoni, mucosa intestinale, milza, muscoli e a parte dei tessuti nervosi.

I composti arsenicali si accumulano normalmente a livello di pelle, unghie, capelli e, in maniera ridotta anche in ossa e muscoli (Reilly, 2002).

Poco conosciuti sono i meccanismi di biotrasformazione dei composti dell'arsenico (Lucisano, 1994). Sembra che la forma pentavalente sia ridotta alla forma trivalente, successivamente con l'aggiunta di un gruppo metilico si forma l'acido metilarsonico che si trasforma poi in acido dimetilarsonico con il legame con un secondo gruppo metilico, ottenendo così la detossificazione dei composti inorganici dell'arsenico (Geiger, 2001)

L'emivita dei composti dell'arsenico, sia organici che inorganici, sembra essere breve tra le 10 e le 30 ore (Reilly, 2002).

L'escrezione dell'arsenico avviene prevalentemente tramite le urine, a prescindere da come è stato assorbito (Venugopal e Luckey, 1978) e a questo livello si presenta sotto forma di arsenico inorganico, acido metilarsonico o dimetilarsonico (Neiger, 2001). Una parte, meno del 10% delle forme solubili, può venire escreta con le feci in relazione sia ad un suo incompleto assorbimento che alla presenza della circolazione entero-epatica. (Venugopal and Luckey, 1978)

All'eliminazione di questo metalloide, concorrono ancora, se pur in misura minore, anche il sudore, il latte, la pelle e i polmoni (Lucisano, 1994).

### 1.1.3. Meccanismo d'azione

L'azione tossica dei composti arsenicati trivalenti è dovuta al blocco dei gruppi sulfidrilici di alcuni enzimi, con conseguente alterazione di diversi processi metabolici d'importanza vitale, in particolare risultano alterati il metabolismo dei grassi e dei carboidrati e la respirazione cellulare (Buck, 1978)

L'arsina ( $AsH_3$ ), gas industriale altamente tossico, si lega all'emoglobina ed è ossidato ad un composto emolitico che non sembra agire attraverso l'inibizione sulfidrilica. (Buck, 1978)

Gli arsenicali pentavalenti esercitano invece una forte inibizione, anche se reversibile, delle reazioni di fosforilazione ossidativa mitocondriale. Si pensa che il meccanismo sia correlato alla sostituzione competitiva dell'arseniato al fosfato inorganico, con successiva formazione di un estere instabile perché suscettibile di demolizione idrolitica (Lucisano, 1994).

Il meccanismo d'azione dei composti arsenicali, che si attua principalmente attraverso il blocco dei gruppi sulfidrilici delle proteine è comune ad altri metalli quali cadmio e selenio e questo potrebbe spiegare l'interazione dell'arsenico con

questi elementi riportata da Reilly (2002); in particolare sembra che l'arsenico possa contrastare la tossicità derivata da un'eccessiva assunzione di selenio.(Rhian e Moxon, 1943).

#### 1.1.4. Aspetti tossicologici

Tra le cause più comuni di intossicazione da As c'è la disponibilità di recipienti usati per contenere insetticidi o erbicidi non accuratamente puliti dopo l'uso, ma anche la contaminazione di pascoli con erbicidi e pesticidi.

La tossicità dei composti arsenicati è inversamente proporzionale alla velocità con cui vengono eliminati dall'organismo e, pertanto, dipende dal loro accumulo nei tessuti.

In generale la tossicità aumenta nell'ordine: derivati organici < derivati di  $As^{5+}$  < derivati di  $As^{3+}$  < arsina o  $AsH_3$ .

La tossicità dei composti inorganici è riassunta nella tabella 1.1.

Effetti tossici risultano essere la comparsa di neoplasie cutanee maligne e di altre forme cancerose al polmone e al fegato. L'As è inoltre teratogeno e può attraversare la barriera placentare causando la morte del feto o diverse malformazioni nei mammiferi ed è anche in grado di causare tumori nei nascituri. Paradossalmente, l'arsenico è un elemento essenziale per gli organismi, carenze di questo elemento portano infatti ad uno scarso sviluppo, una ridotta sopravvivenza, un'inibizione dei fenomeni riproduttivi in piante e animali (Eisler, 1988)

I composti organici aromatici in genere sono meno pericolosi perché se assorbiti vengono di norma detossificati per metilazione ed i composti metilati sono eliminati dai tessuti in pochi giorni (Eisler, 1988). Possono però risultare tossici anche a bassi dosaggi in animali fortemente disidratati con funzioni renali compromesse. Gli arsenicati organici nei fenomeni acuti provocano incoordinazione motoria, uno stato di grave adinamia e poi fenomeni paralitici (Lucisano, 1994) La mortalità di animali sani con approvvigionamento idrico sufficiente è bassa ed occorrono dosi molto alte (100 ppm nel mangime) e tempi di esposizione lunghi (settimane) prima che si manifestino segni di intossicazione (Lucisano, 1994).

L'avvelenamento da arsenico può essere dovuto ad una singola dose (tossicità acuta) o a piccole dosi ripetute (tossicità cronica) (Thienes e Haley, 1972).

Va, altresì ricordato che l'ingestione di dosi crescenti di arsenico è stata dimostrata conferire all'organismo una certa assuefazione tale da poter tollerare dosi letali (Bottarelli, 1993). Tale apparente tolleranza sembra essere dovuta all'insolubilità dei cristalli di arsenico ingeriti; l'assorbimento è molto lento e questo fa sì che la maggior parte della sostanza ingerita sia eliminata immutata con le feci mentre solo

una piccola quantità assorbita e rapidamente escreta con le urine, senza che si verifichi un accumulo nei tessuti (Clarke e Clarke, 1975): si tratta comunque di un'assuefazione limitata alla sola assunzione per via orale.

**Tab. 1.1- Valori di DL<sub>50</sub> definiti per l'arsenico a seguito di somministrazione per vie diverse in differenti specie animali (Venugopal e Luckey, 1978).**

<b>Composto</b>	<b>Via di somministrazione</b>	<b>Specie</b>	<b>Tossicità</b>	<b>Dose (mg/kg o mg/m<sup>3</sup>*)</b>
Arsine	Inalatoria	Ratto	DL <sub>100</sub>	250
Triossido di Arsenico	Sottocutanea	Topo, ratto, cane	DL <sub>100</sub>	6-12
	Orale	Topo, ratto	DL <sub>50</sub>	43-143
	Orale	Cane	DL <sub>100</sub>	50
	Endovenosa	Cane	DL <sub>100</sub>	4
Pentossido di arsenico	Orale	ratto	DL <sub>50</sub>	8
Trifluoruro di arsenico	Sottocutanea	Cavia	DL <sub>50</sub>	20
Potassio arsenite	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	14
Arseniato di sodio	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	9
Arseniato di calcio	Orale	Topo	DL <sub>50</sub>	794

\* Esposizione per 4 h

#### *1.1.4.1. Tossicità acuta*

I sintomi dovuti ad una tossicità acuta si manifestano dai 30 minuti a diverse ore dopo l'ingestione del tossico.

La forma iperacuta porta rapidamente a morte l'animale prima che i sintomi si manifestino; nel decorso meno tumultuoso si osserva una colica violenta, collasso e quindi morte.

La forma acuta si manifesta inizialmente con un gusto metallico, una sensazione di secchezza e irritazione della bocca e della gola con difficoltà nella deglutizione; questi primi sintomi sono seguiti rapidamente da vomito o rigurgito di odore agliaceo, grave dolore addominale con rilevazione all'auscultazione di forti rumori borborigmici. L'animale si presenta cianotico con estremità fredde a volte con dolori agli arti, convulsioni e debolezza muscolare segno di un coinvolgimento del sistema nervoso centrale. Dopo 24 ore si ha diarrea acquosa, a volte emorragica accompagnata da tenesmo e forte disidratazione. Questa forte disidratazione porta inevitabilmente a collasso cardiocircolatorio e morte entro 3 giorni (Thienes e Haley, 1972, Clarke e Clarke, 1975, Bottarelli, 1993).

#### *1.1.4.2. Tossicità a lungo termine*

Gli effetti di una esposizione cronica all'arsenico non sono del tutto chiari e risultano piuttosto soggettivi.

Si possono manifestare come sindrome simile all'osteomalacia, con polidipsia, dimagrimento fino alla cachessia, turbe digestive, mucose color rosso mattone, polso debole e irregolare (Bottarelli, 1993).

Il coinvolgimento del sistema nervoso sia centrale che periferico porta a cambiamenti sensoriali, parestesia, debolezza muscolare progressiva (Goyer, 1996) fino ad atrofia e paralisi (Thienes e Haley, 1972).

Caratteristiche di una tossicità a lungo termine sono anche le lesioni epatiche che vanno dall'ittero fino alla cirrosi (Goyer, 1996)

Infine, le lesioni cutanee, dovute soprattutto all'assorbimento dell'arsenico per via cutanea, si osservano frequentemente nell'uomo mentre sono rare negli animali (più colpito il suino). In questi casi la pelle è arrossata, secca e simile a pergamena in seguito si screpola e sanguina; tali lesioni possono essere complicate da infezioni batteriche o da infestazioni da larve di insetti (Bottarelli, 1993).

#### *1.1.4.3. Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi*

Elevate dosi di composti arsenicati somministrati a animali da laboratorio gravidi producono varie malformazioni in dipendenza del giorno di gestazione (Hood e Bishop, 1972) e della via di somministrazione (Goyer, 1996)

Una somministrazione di 45 mg/kg di arsenico pentavalente a topine gravide provoca un aumento nel riassorbimento fetale (Venugopal e Luckey, 1978) e, nei feti sopravvissuti, esencefalo, mandibole più corte con conseguente protusione della lingua, esoftalmo, ernia ombelicale, coda più corta e difetti delle vertebre e delle coste (Hood e Bishop, 1972).

Non è chiaro invece se l'ingestione di composti arsenicati possa provocare teratogenesi nell'uomo (Mandal e Suzuki, 2002)

Alcuni autori (Nordstrom, Beckman, Norderson, 1978, 1979a, 1979b) hanno evidenziato come bambini nati da donne esposte a polveri arsenicate durante la gravidanza manifestavano un'incidenza di malformazioni congenite e un peso alla nascita inferiore alla media così come hanno evidenziato una maggiore probabilità di aborto spontaneo in operaie e donne che vivono nelle vicinanze di fonderie rispetto a donne che vivono lontano da queste (Nordstrom, Beckman, Norderson, 1979a, 1979b). Tutto ciò è spiegabile ricordando che già da 50 anni è nota la capacità che hanno i composti inorganici di attraversare rapidamente la placenta, mentre i composti organici non sembrano attraversare la barriera placentare così rapidamente ma, al contrario, sono accumulati nella placenta stessa (Leonard e Lauwerys, 1980)

#### *1.2.4.4. Effetti mutageni*

I composti arsenicati hanno dimostrato avere un'azione genotossica.

Comparando la frequenza con cui avvengono le aberrazioni cromosomiche indotte da composti arsenicati tri- o pentavalenti si evince che le forme trivalenti sono molto più potenti e genotossiche delle forme pentavalenti (Okui e Fujiwara, 1986). La tossicità mitotica più elevata, riportata in alcuni studi per gli organoarseniati, sembra sia attribuibile ai loro più forti effetti distruttivi prodotti sull'organizzazione microtubulare della cellula (Bernstam e Ntiagu, 2000).

Gli effetti mutageni provocati dai composti arsenicati comprendono l'induzione di un danno del DNA e una vasta varietà di alterazioni genetiche, che possono spaziare da semplici mutazioni del gene a grossi e visibili cambiamenti nella struttura nel numero dei cromosomi.

Alcuni di questi cambiamenti potrebbero causare danni trasmissibili alle generazioni seguenti e/o causare neoplasie o altri problemi alle generazioni direttamente esposte (Hoffman, 1991; Cantellano *et al*, 1964).

La scarsa correlazione tra il grado di esposizione all'arsenico e la risultante frequenza con cui si osservano aberrazioni cromosomiche può essere spiegata dal concetto che l'arsenico promuova danni genetici in larga misura attraverso l'inibizione dei processi di riparazione del DNA (Shannon e Stayer, 1989; Beneko *et al.*, 1988; Astolfi *et al.*, 1981).

Enzimi come le dismutasi e le superossido catalasi, che eliminano i radicali ossigeno liberi sembrano fornire una protezione contro i danni al DNA arsenico-indotti, indicando una possibile base per gli effetti genotossici dell'arsenico (Nordenson e Backman, 1991)

#### *1.1.4.5. Effetti cancerogeni*

La potenziale azione cancerogenetica dell'arsenico è stata a lungo studiata.

Un'esposizione cronica all'arsenico, induce, nell'uomo, tutta una serie di caratteristici cambiamenti a carico della pelle, da una iperpigmentazione ad una ipercheratosi fino a vere e proprie forme neoplastiche sia a carico delle cellule basali che di quelle dello strato squamoso.

I carcinomi delle cellule basali sono normalmente invasivi localmente mentre quelli dello strato squamoso possono dare origine anche a metastasi (Goyer, 1996).

Individui sottoposti ad un'esposizione inalatoria di tipo occupazionale possono andare incontro a neoplasie a carico dei polmoni, normalmente forme poco differenziate di carcinoma epidermide broncogenetico (Goyer, 1996).

Altri tipi di tumori viscerali sono stati associati ad un'esposizione al tossico, tra questi ricordiamo l'emangiosarcoma del fegato (Popper *et al.*, 1978), linfomi e leucemie, adenocarcinoma renale, probabilmente associato all'assunzione di acqua potabile contaminata (NRC, 1999) o ancora carcinoma nasofaringeo (Goyer, 1996).

Il rischio di cancro sembrerebbe essere dose-dipendente con una sua diminuzione al cessare dell'esposizione al tossico ed alla sua eliminazione dal corpo (Mandal e Suzuki, 2002). Nordberg e Anderson (1981) e Lee-Feldstein (1986) hanno suggerito un meccanismo alternativo; secondo questi autori l'arsenico per essere efficace dovrebbe essere presente alla sintesi del DNA, per questo suggeriscono che l'arsenato sia incorporato nel DNA in sostituzione del fosfato. Questo spiega anche perché l'arsenico sia clastogenico dal momento che il legame arsenato-fosfato sembra essere più debole del normale legame fosfodiesterico (Jacobson-Kram & Montalbano, 1985).

Nonostante questi tumori nell'uomo abbiano dato prova in campo di essere associati all'esposizione all'arsenico, è stato per molti difficile averne conferma con prove su animali da laboratorio (Goyer, 1996).

#### *1.1.4.6. Effetti immunodepressivi*

Pochi sono i dati reperibili in letteratura riguardanti gli effetti dell'arsenico sul sistema immunitario (Descostes et al, 1989).

L'esposizione di topi a 25-100 ppm di arsenico nell'acqua da bere per 10-12 settimane è stata osservata da Isaacson-Kerkvielt et al (1980) non essere associata ad alcuna immunodepressione mentre secondo Arnyi et al (1985) l'inalazione di arsenato trivalente può portare ad una diminuzione delle difese antibatteriche polmonari.

In uno studio più recente, Gonsebatt et al (1994) studiando l'abilità linfocito-replicante in 33 individui esposti a 33 µg per litro di acqua da bere hanno osservato che il conteggio dei linfociti nel sangue era leggermente aumentato rispetto ai controlli.

In altri studi (Grainer J.H., 1972) è stato ancora dimostrato come l'effetto sulla risposta immunitaria sia dose-dipendente; alte concentrazioni inibiscono, infatti, sia la sintesi che l'azione degli interferoni mentre basse concentrazioni ne aumentano la sintesi.

Al proposito ricordiamo però che più di 80 anni fa già Toyama e Kolmer (1918) avevano dimostrato che basse concentrazioni di arsenfenamine aumentavano gli anticorpi mentre alte concentrazioni li inibivano.

#### *1.1.5. Impatto ambientale*

L'arsenico è un elemento ubiquitario, 20° in abbondanza nella crosta terrestre, 14° nell'acqua di mare e 12° nel corpo degli organismi viventi (Woolson E.A., 1975).

Si tratta di un elemento cristallino che come appena ricordato rappresenta lo 0,00005% del 1% della crosta terrestre e con un concentrazione media nelle rocce sedimentari e laviche di 2 mg/kg.

E' concentrato in alcuni sedimenti di origine marina dove può raggiungere livelli di 3000 mg/kg.

Il principale carrier di arsenico nelle rocce e in molti tipi di depositi minerali è la ferro-pirite (FeS<sub>2</sub>) che può contenere più di 2000 mg/kg di arsenico (NRCC, 1978)

E', infatti il maggiore costituente di almeno 245 tipi di minerali (ferro pirite, come già ricordato, galena, calcopirite) dei quali l'arsenopirite è il più comune (NAS, 1977).

Per quanto riguarda i terreni la concentrazione dell'arsenico nelle zone non contaminate sembra compreso tra 1 e 40 mg/kg con concentrazioni minori in terreni sabbiosi e quelli derivanti da rocce granitiche, mentre le concentrazioni più alte si trovano nei terreni alluvionali e organici.

I principali fattori che influenzano la concentrazione di As nel terreno sono rappresentati dal tipo di roccia da cui il terreno ha origine e dalle attività umane ai quali si aggiungono il clima, le componenti organiche ed inorganiche del terreno ed il potere redox. Gli studi portati avanti in tal senso hanno dimostrato che il tipo di roccia da cui il terreno ha origine è un fattore molto più importante nell'influenzare il contenuto di arsenico rispetto al tipo di terreno stesso (Tang S. 1985,1987).

Altro fattore che può influenzare la forma in cui l'arsenico è presente nel terreno è rappresentato dal pH. Gli arsenati di ferro e di alluminio sono così la forma predominante nei terreni acidi e sono meno solubili del calcioarsenato che, invece, rappresenta la principale forma chimica in tutti i terreni alcalini e calcarei (Fordyee F.M. et al, 1995).

Nei sedimenti il livello di arsenico presente è normalmente inferiore a 10 mg/kg anche se varia considerevolmente nelle diverse parti del mondo (Crecelius E.A., 1974).

L'arsenico si trova in basse concentrazioni anche nelle acque.

La concentrazione massima consentita nell'acqua da bere è di 50 µg/l e il valore raccomandato da EPA e WHO è di 10 µg/l (WHO,2001; EPA, 1975).

Nell'acqua dolce non contaminata la concentrazione di arsenico è compresa tra 1 e 10 µg/l e può aumentare fino a 100-5000 µg/l in aree di miniere di zolfo (Smedly P.L. et al., 1996). Le principali forme organiche di arsenico presenti nell'acqua dolce sono gli acidi metil- e dimetil-arsenici e queste sono normalmente presenti in concentrazioni più basse rispetto agli arsenati e arseniti inorganici (Pershagen G. & Vahter M., 1979).

Il contenuto di arsenico nell'acqua di mare si attesta invece su valori variabili tra 0,001 e 0,008 mg/l tenendo presente che il dilavamento delle rocce e dei terreni porta all'immissione negli oceani di circa 45000 tonnellate di arsenico all'anno. L'immissione di arsenico, inoltre, è notevolmente aumentata nel passato secolo, sia derivante da fonti naturali che come risultato dell'uso industriale e delle attività agricole e di deforestazione. E' anche vero, però, che solo una piccolissima quota dell'arsenico totale presente nei mari rimane disciolto nell'acqua, la maggior parte, infatti, si lega alle particelle di materiale in sospensione (Mandal B.K. e Suzuki K.T., 2002).

Nell'aria l'arsenico viene adsorbito sulle particelle ed è presente come mescolanza di arseniti e arsenati, con una concentrazione totale compresa tra 0,4 e 30ng/m<sup>3</sup> (WHO, 1996).

L'ammontare di arsenico inalato al giorno in zone non inquinate è stato valutato aggirarsi sui 50 ng o meno con un grado di assorbimento che varia dal 30 all'85% a seconda che si tratti di inalazione di vapori o di particelle (WHO, 1981).

Per le regioni Europee i livelli medi di arsenico nell'aria sono compresi tra 0,2-1,5 ng/m<sup>3</sup> nelle aree rurali, 0,5-3 ng/ m<sup>3</sup> nelle aree urbane e non più di 50 ng/m<sup>3</sup> nelle aree industrializzate (WHO, 1981, DG Environment, 2000).

Per quanto riguarda gli organismi viventi si può affermare che l'arsenico è un elemento che una volta ingerito da qualsiasi organismo viene molto lentamente se non per niente eliminato.

La quantità di arsenico in una pianta dipende quasi esclusivamente dal grado di esposizione. La sua concentrazione varia da meno di 0,01 a circa 5 µg/g di peso secco (Miller Publishing Company, 1975).

Difficilmente gli animali si avvelenano consumando piante in quanto i danni alle piante avvengono prima che vengano raggiunte le concentrazioni tossiche per gli animali (Miller Publishing Company, 1975).

Come nelle piante anche nei tessuti animali l'arsenico è in grado di accumularsi permettendo una vasta gamma di concentrazioni dovute alla variabilità nelle varie aree, dell'arsenico ingerito.

Tra gli animali marini l'arsenico si accumula a livelli che variano da 0,005 a 0,3 mg/Kg nei celenterati ed in alcuni molluschi mentre alcuni crostacei possono contenere oltre 100 µg/g di As.

Il contenuto medio di arsenico nei pesci d'acqua dolce è di 0,54 µg/g peso fresco ma alcuni valori possono attestarsi sui 77 µg/g nell'olio di fegato di alcune specie (Whitaere & Pearse, 1972).

Nei mammiferi l'arsenico si accumula nei tessuti ectodermici, principalmente capelli e unghie.

Questa speciale affinità per capelli, peli e altri tessuti ricchi in cheratina è propria soprattutto dei composti inorganici dell'arsenico.

Il normale ammontare di arsenico in capelli e peli è di circa 0,08-0,25 µg/g con il valore di 1,0 µg/g che può essere utilizzato come indice di una presenza eccessiva di arsenico e quindi di avvelenamento.

## 1.2. CADMIO

Il cadmio, metallo dotato di elevati effetti tossici, non possiede alcun particolare ruolo fisiologico, ed associa un accumulo preferenziale nei tessuti molli ad un'emivita prolungata in rapporto alla sua scarsa eliminazione dall'organismo.

Dagli studi condotti in tal senso è emerso che il metallo è presente nel suolo a concentrazioni variabili da 0.15 a 0.50 ppm, mentre nelle acque marine la sua concentrazione media ammonta a 0.3 ppb (Venugopal e Luckey, 1978).

Seppur la scoperta di questo metallo risalga al 1817, il suo impiego e la sua estrazione a livello industriale fanno data a partire dagli anni '40. Nel 1991, da quanto riportato da Stoeppler (1991), la sua produzione era pari a 17.000 tonnellate, con conseguente emissione in atmosfera di 7.000 tonnellate di metallo.

Il cadmio, poco utilizzato allo stato puro, è un costituente di molte leghe e molto utilizzati sono anche i suoi composti (ossido, solfato e cloruri). Alcuni di questi hanno trovato impiego nella pratica terapeutica quali antielmintici, ascaricidi, nematocidici ed antisettici, pratica, questa, attualmente abbandonata (Venugopal e Luckey, 1978)

Nel settore industriale il cadmio è impiegato sostanzialmente nella produzione di batterie ricaricabili, come polo negativo nell'elettrocadmio, per la sua azione anticorrosiva per ferro ed acciaio e per quella stabilizzante nella produzione della plastica e di pigmenti per vernici. Stoeppler (1991) ricorda che il metallo è presente nei fertilizzanti, nelle acque di scarico e nei fanghi di origine urbana, che ne rappresentano quindi un'ulteriore fonte di contaminazione ambientale.

### 1.2.1. Caratteristiche chimico-fisiche

Il cadmio è un metallo bianco-argenteo con peso atomico di 112.4, caratterizzato da punto di fusione di 321°C e di ebollizione di 756°C. Pur con un solo stato di ossidazione ( $2^+$ ), può formare complessi tetraedrici con valenza 4, complessi alogenati del tipo  $[CdX_3]$  e  $[CdX_6]^{4-}$  e sali stabili come il cadmiato sodico ( $Na_2[Cd(OH)_4]$ ). Nonostante il cadmio abbia dimostrato una totale insolubilità in acqua, i suoi sali di zolfo e cloro sono 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 inferiore solo a quella di piombo e mercurio; questo spiega l'elevata affinità che questo elemento presenta per proteine quali l'emoglobina e le metallotioneine, ricche di gruppi leganti, e il forte legame con i tessuti, tanto che l'azione degli agenti chelanti, attualmente disponibili per una sua rimozione, risulta inefficace.

### 1.2.2. Comportamento cinetico

L'uomo e gli animali s'intossicano principalmente per via inalatoria o per ingestione; la via di assorbimento inalatoria riveste particolare importanza per l'uomo, che può risultare esposto all'elemento per motivi occupazionali.

La via di esposizione influisce sull'entità dell'assorbimento; vediamo, infatti, come nel tratto gastroenterico, dove il fenomeno è influenzato non solo dalla solubilità del

sale ma anche dai livelli di zinco, risulti pari ad un 5% nell'uomo e ad un 1-6% negli animali, mentre per via inalatoria il suo passaggio in circolo 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 passa in circolo legandosi alle proteine plasmatiche, prevalentemente alle albumine e secondariamente alla metallotioneina circolante, per essere poi distribuito in tutti i tessuti molli, soprattutto fegato e rene, nei quali è possibile rilevare circa il 50% del contenuto totale. Alle elevate concentrazioni di metallotioneina riscontrabili in questi tessuti, le cui cellule ne possono sintetizzare elevate quantità, è fondamentale legato tale accumulo preferenziale.

I complessi cadmio-tioneina circolanti vanno incontro, a livello renale, a fenomeni di pinocitosi, con ingresso all'interno delle cellule tubulari, catabolismo della frazione proteica e successivo legame del cadmio alla metallotioneina sintetizzata in loco (Fowler et al., 1985).

Il metallo non va incontro ad alcuna reazione metabolica ma nei vari distretti subisce una segregazione sotto forma di chelati che ne rappresentano il principale processo di detossificazione che si realizza nell'organismo. Per questo l'emivita del cadmio è stata valutata, per l'uomo, intorno ai 30 anni, il che porta ad un costante aumento delle sue concentrazioni tessutali nell'arco della vita.

In sede gastroenterica il cadmio presenta uno scarso assorbimento che spiega come circa il 95% del metallo assunto per via orale, sia presente nelle feci; difficile risulta comunque definire quale sia realmente la quota allontanata per un mancato assorbimento intestinale e quella legata ad una vera e propria escrezione del metallo assorbito, esso, infatti, può raggiungere il lume intestinale anche tramite la secrezione biliare. Secondo Nordberg et al., (1985) quotidianamente, viene escreto con le feci o con l'urina solo lo 0.01-0.02% del carico corporeo. Va ricordato, a tal proposito, che la quantità di cadmio effettivamente escreta con le feci e la bile è dipendente dalla concentrazione corporea e, ancora, che la sua presenza a livello urinario assume significativa importanza solo in caso di tossicosi, in quanto il danno renale arrecato dal metallo ne determina l'escrezione per questa via.

### 1.2.3. Meccanismo d'azione

Il cadmio, essendo in grado di legarsi fortemente ai numerosi ligandi di molecole proteiche enzimatiche, ne provoca una conseguente alterazione della struttura e della funzionalità.

Una scala di affinità per i diversi ligandi è stata delineata da Kägi e Hapke (1984), scala che, in ordine decrescente, può essere schematizzata come segue: tiolico ( $RS^-$ )

> fosforico (RPO<sup>-</sup>) > cloridrico (RCl<sup>-</sup>) > carbossilico (RCOO<sup>-</sup>). Tale affinità risulta essere direttamente proporzionale ai siti leganti presenti sulle molecole interessate, ed è pertanto più elevata per glutatione e metallotioneina.

Diverse possono essere le conseguenze dell'azione del metallo a livello cellulare tra queste ricordiamo l'inibizione delle ossidasi a funzione mista, le alterazioni di alcune attività del calcio e del suo trasporto transmembrana, il blocco della fosforilazione ossidativa dei mitocondri e le 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).

Il cadmio interferisce anche con le attività del calcio attraverso un suo rilascio dai 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; Chen e Smith, 1992).

Inoltre, va ricordato che il cadmio può sostituirsi al calcio nel legame alla calmodulina ed essendo quest'ultima una proteina preposta alla regolazione di numerosi processi calcio-dipendenti, ciò si traduce in un'azione calcio-agonista da parte del metallo, con conseguente attivazione o inibizione, in funzione della sua concentrazione, degli enzimi calmodulino-sensibili, quali la fosfodiesterasi e l'adenosin-trifosfatasi Ca/Mg dipendente; il fenomeno può trovare conferma nel fatto che un trattamento con calmodulina-inibitori comporta miglioramenti del quadro tossico (Donnelly, 1978; Forsen et al., 1979; Andersson et al., 1982; 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 spiega invece la sua azione sui metalloenzimi, ciò trova una controprova nel fatto che carenze di zinco comportano un aggravamento degli effetti tossici (Vallee e Ulmer, 1972; Vallee e Glades, 1974). Il cadmio, inoltre, inducendo l'attività della eme-ossigenasi, porta ad un conseguente incremento nella degradazione dell'eme, che a sua volta è responsabile di una riduzione dell'attività dell'ossidasi a funzione mista e del contenuto di citocromo P450.

L'esposizione al cadmio comporta infine un aumento nella formazione di radicali superossido, che hanno dimostrato 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; Amoruso et al, 1982; Ochi et al, 1983; Wahba e Waalkes, 1990).

#### 1.2.4. Aspetti tossicologici

Data la sua azione su numerosi sistemi enzimatici, il cadmio può esplicare notevoli effetti tossici, variabili in funzione delle differenze nella via di assorbimento, nel dosaggio, nella specie e nel sesso (tab. 1.2).

La sua tossicità può subire modificazioni in relazione all'interazione con altri metalli, quali rame, zinco e ferro. Gli effetti tossici del cadmio possono essere, infatti, ridotti, se non addirittura prevenuti, dalla presenza di zinco; il cadmio, a sua volta è 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. Anche l'acido ascorbico, la vitamina D, la cisteina, il glutatione e il selenio esplicano effetti protettivi nei confronti delle azioni tossiche del cadmio (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).

L'ingestione di diete contaminate è la maggiore responsabile dei principali effetti tossici rilevabili negli animali. Nell'uomo la tossicità del metallo è stata rilevata, inizialmente, nel corso di un episodio tossico verificatosi a Fuchu, in Giappone, in seguito all'ingestione di riso contaminato. La sindrome morbosa è nota come "Itai-itai" e risulta caratterizzata da intense mialgie di natura reumatica, da marcata proteinuria, da osteomalacia e da disturbi della locomozione. Prevalentemente interessate risultano le donne di età compresa tra i 45 e i 70 anni, in menopausa e pluripare.

**Tab. 1.2-** Valori di DL<sub>50</sub> definiti per il cadmio a seguito di somministrazione per vie diverse in differenti specie animali (Venugopal e Luckey, 1978).

<b>Composto</b>	<b>Via di somministrazione</b>	<b>Specie</b>	<b>Tossicità</b>	<b>Dose (mg/kg o mg/m<sup>3</sup>*)</b>
Ossido di cadmio	Inalatoria	Scimmia	DL100	1100
Cloruro di cadmio	Sottocutanea	Topo, coniglio, gatto	DL <sub>100</sub>	20-25
	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	88
	Intramuscolo		DL <sub>50</sub>	25
	Orale	Coniglio	DL <sub>100</sub>	70
	Endovenosa	Coniglio, cane	DL <sub>100</sub>	2-5
Fluoruro	Orale	Cavia	DL <sub>50</sub>	150

di cadmio				
Solfato di cadmio	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	69
	Orale	Cane	DL <sub>100</sub>	105
	Sottocutanea	Cane	DL <sub>100</sub>	27
Fosfato di cadmio	Inalatoria	Topo	DL <sub>100</sub>	650
Lattato di cadmio	Sottocutanea	Topo	DL <sub>50</sub>	13.9
Succinato di cadmio	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	270
		Ratto	DL <sub>50</sub>	660

\* Esposizione per 4 h

#### *1.2.4.1. Tossicità acuta*

Fondamentalmente i quadri tossici da cadmio insorgono, come precedentemente accennato, per ingestione o inalazione di particelle di metallo o di suoi sali. La solubilità e le dimensioni di tali particelle influiscono notevolmente sulla tossicità dell'elemento, in quanto comportano variazioni nell'assorbimento rispettivamente a livello gastroenterico e polmonare.

La prima manifestazione di un'esposizione acuta al metallo è l'insorgere di fenomeni irritativi a carico del tessuto interessato (tratto gastrointestinale o polmone), seguiti da nausea, vomito, scialorrea, diarrea e dolori addominali, quadro questo particolarmente grave ed intenso nei roditori, in quanto incapaci di vomitare. Il suo assorbimento per via inalatoria comporta anche dolori toracici, dispnea, vertigini, con successivo instaurarsi di polmonite e di edema polmonare ad esito fatale (Lucisano, 1994)

Una singola dose di sali solubili somministrata per via parenterale può indurre lo sviluppo di fenomeni necrotici a carico del testicolo e dei gangli sensoriali, ai quali si associano, a dosi più elevate, necrosi epatica e danni in numerosi altri organi (Elinder, 1985). L'organo target dopo assorbimento di dosi elevate di cadmio è rappresentato, secondo Dudley et al. (1982), dal fegato, a carico del quale vengono descritti necrosi del parenchima, degenerazione del reticolo endoplasmatico rugoso e dei mitocondri e, ancora, proliferazione del reticolo endoplasmatico liscio.

E' possibile prevenire molti dei fenomeni tossici descritti in precedenza, quali ad esempio la necrosi testicolare, mediante pretrattamenti condotti con basse dosi di cadmio e/o somministrazioni ripetute dell'elemento, in quanto ritenuti in grado di stimolare la sintesi di nuova metallothioneina che, data la sua capacità di sequestrare il metallo, può svolgere funzione protettiva per l'organismo (Nordberg, 1971).

#### *1.2.4.2. Tossicità a lungo termine*

Nefro- ed epatopatia, ostemalacia e danni a carico dell'apparato polmonare caratterizzano sostanzialmente il quadro dell'intossicazione cronica da cadmio.

Con concentrazioni tissutali superiori ai 200 µg/g abbiamo un'interessamento renale con disfunzioni a carico dei tubuli prossimali e un riscontro di proteinuria, aminoaciduria, glicosuria e fosfaturia.

Il riassorbimento dei complessi cadmio-metallothioneina a livello tubulare con conseguente azione lesiva sulle cellule del tubulo stesso sono responsabili fondamentalmente degli elevati livelli di cadmio nelle urine. La proteinuria è irreversibile, dovuta ad un diminuito riassorbimento proteico nel tubulo prossimale e viene considerata come un primo sintomo di intossicazione cronica da cadmio, in quanto la sua comparsa precede l'instaurarsi del danno renale conclamato (Piscator, 1962; Roels et al., 1982; Friberg et al., 1986; Klaassen, 1990; Goyer, 1996).

Nel ratto abbeverato con acqua contenente 5 µg/ml di cadmio acetato è stata osservata e descritta da autori diversi (Perry e Schroeder, 1955; Schroeder, 1965; Schroeder, 1966; Kanisawa e Schroeder, 1969) la comparsa di ipertensione arteriosa ed assottigliamento delle arteriole renali, con alterazioni glomerulari simili quelle riscontrate nell'ipertensione cronica benigna conseguente ad un'esposizione cronica professionale al metallo.

A livello epatico si riscontra, per concentrazioni tessutali pari o superiori a 60 µg/g, aumento dell'attività delle aminotransferasi, decremento delle ossidasi a funzione mista e, quando tali concentrazioni vengano superate, diminuita integrità degli epatociti. Il fegato viene interessato prima del rene e questo interessamento può comportare un rilascio di complessi cadmio-tioneina, capaci di passare nel torrente circolatorio e di accumularsi nel rene, dove sono responsabili dei danni precedentemente descritti (Foulkes, 1978; Cherian et al., 1984; Squibb et al., 1984; Dudley et al., 1985).

L'osteomalacia 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 Klaasen, 1995). La perdita del tessuto osseo e le alterazioni ossee indotte dal cadmio sembrano, sia nell'uomo (sindrome "Itai-itai") che negli animali da laboratorio, più gravi nelle femmine rispetto ai maschi e vengono interpretate come una conseguenza dell'azione diretta del metallo sul tessuto stesso: i risultati di studi *in vitro* lo provano; da essi, infatti, si rileva come il cadmio induca osteoporosi o osteopenia, con un aumento di cellule osteoclasto-simili multinucleate in colture di cellule del midollo, ed un incremento nel riassorbimento dell'osso in colture di osteociti fetali di ratto (Bhattacharyya, 1991). Anche l'azione competitiva del cadmio nei confronti del calcio può essere causa di una riduzione della crescita e una scarsa mineralizzazione delle ossa (Banis et al., 1969; Jacobs et al., 1974).

A carico dell'apparato respiratorio i principali rilievi sono dati da fenomeni infiammatori ed irritativi, con bronchite cronica ed edema, che può evolvere in polmonite ostruttiva per metaplasia dell'epitelio alveolare, proliferazione degli istiociti e distruzione alveolare, con enfisema normalmente letale. Se il soggetto sopravvive all'enfisema il parenchima polmonare e bronchiale vanno incontro a fenomeni fibrotici che coinvolgono anche i vasi circostanti, con conseguente dispnea, ridotta capacità vitale ed aumento del volume residuale respiratorio (Venugopal e Luckey, 1978).

L'aumentato catabolismo dell'eme indotto dal cadmio insieme alle interferenze che questo metallo può esplicare nell'assorbimento intestinale di ferro e calcio provoca la comparsa di stati anemici (Banis et al., 1969; Jacobs et al., 1974).

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

#### *1.2.4.3. Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi*

Il cadmio dimostra avere una certa influenza sull'apparato riproduttore degli animali di entrambi i sessi e, in molte specie animali, una forte azione teratogena ed embriotossica (Goering, Waalkes e Klaasen, 1995).

Gli effetti del cadmio sull'attività riproduttiva degli animali possono essere sia di natura diretta con danni agli organi riproduttori e alle strutture accessorie, che indiretta, per alterazione dell'asse ipotalamo-pituitario-gonadico (Goering, Waalkes e Klaasen, 1995).

I primi sono rilevati in maniera più evidente nel maschio, dove si assiste a necrosi dei testicoli e conseguente sterilità permanente.

Il danno testicolare non si presenta nelle specie prive di scroto, nelle gonadi delle specie aviarie (più resistenti agli effetti tossici) e nei soggetti non ancora sessualmente maturi, ed è legato a lesioni del letto vascolare, con possibile edema delle cellule interstiziali, ridotta produzione di androgeni nelle cellule del Leyding, necrosi delle cellule del Sertoli, inibizione della spermatogenesi e ridotta motilità spermatica (Parizek, 1957; Meek, 1959; Gunn et al., 1968; Samarawickrama, 1979; Wong e Klaassen, 1980; Dwivedi, 1983). Somministrati per via sottocutanea, dosaggi pari a 0.2 mM/kg (circa 40 mg/Kg) di cloruro di cadmio si dimostrano in grado di indurre sterilità negli animali da laboratorio e di inibire la spermiogenesi nel bovino dopo iniezione endovenosa; quest'ultima azione può essere sfruttata come castrazione chimica in tale specie animale, perché porta alla soppressione permanentemente della produzione di sperma (Chiquoine e Suntzeff, 1965; Malcom, 1972; B. Venugopal e T.D. Luckey, 1978).

Meno accentuati risultano, rispetto al maschio, i danni di tipo diretto nel sesso femminile, 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) in quanto ricca 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). La modificazione della funzione ovarica con decremento della produzione di estrogeni e conseguente alterazione del normale sviluppo puberale degli individui rappresenta un esempio degli effetti di tipo indiretto (Parizek et al., 1968; Der et al., 1977).

Tali effetti sono legati ad un interessamento degli enzimi responsabili della sintesi, a livello ovarico, degli estrogeni e/o ad un'alterazione dell'asse ipotalamo-pituitario-gonadico: infatti, un accumulo del metallo nella ghiandola pituitaria porta ad un'alterata dinamica della gonadotropina (Der et al., 1977, Rehm e Waalkes, 1988).

In corso di gravidanza, durante il periodo dell'organogenesi o nelle fasi immediatamente precedenti a questo, l'assunzione di cadmio riduce la percentuale di impianti embrionali (per alterata funzionalità ovarica ed uterina) e comporta, inoltre, marcati effetti teratogeni (Giavini et al., 1980).

Questi ultimi sono rappresentati, principalmente, da anomalie scheletriche, soprattutto a carico del cranio e della porzione caudale, del tubo neurale e da un ritardo della crescita. Tali fenomeni sono stati rilevati sia negli animali da laboratorio o domestici che nelle specie selvatiche. Nel criceto, in particolare, si è rilevato che somministrando cadmio per via endovenosa alla madre, alla dose di 2 mg/kg, all'ottavo giorno di gravidanza, si ha un aumento del riassorbimento fetale e malformazioni nella prole. Risultati simili sono stati ottenuti con gli studi condotti nel ratto con la somministrazione per via orale tra il 6° e il 19° giorno di gravidanza di cadmio alla dose di 40 mg/kg, e, nella capra, a seguito di trattamenti eseguiti con metallo addizionato nella dieta in quantità di 75 ppm. Nell'ambito delle specie selvatiche gli studi più approfonditi riguardano le forme acquatiche. Da questi studi è emerso come in girini allevati in acque contenenti 5-7 ppm di cadmio si abbia una mancata chiusura del tubo neurale, mentre in embrioni di ciprinidi di acqua dolce allevati in ambiente contaminato con 37-57 ppb di metallo si assista ad un aumento delle deformità e dei coaguli sanguigni e ad una riduzione della percentuale di

schiusa e come in barbiglio blu (*Lepomis macrochirus*) concentrazioni di 80 ppb nell'acqua comportino 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; Nakashima et al., 1988). Infine va ricordato che sia gli effetti sulle gonadi che quelli teratogeni possono essere antagonizzati con efficacia da una somministrazione di sali di selenio, cobalto e zinco, mentre, invece, quelli di piombo e mercurio esplicano un'azione sinergizzante (Parizek, 1957; Mason e Young, 1967; Gunn et al., 1968a; Gunn et al., 1968b; Ferm e Layton, 1981).

#### *1.2.4.4. Effetti mutageni*

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

Questa azione mutagena può essere interpretata sulla base del legame che il metallo contrae con due distinti siti del DNA; in questo modo il cadmio è in grado di intercalarsi tra i due filamenti di questa molecola, dove sostituisce lo zinco nell'acido desossiribonucleico e di alterarne la trascrizione attraverso la destabilizzazione della struttura ad elica. A ciò si associa un'inibizione dell'attività della RNA polimerasi DNA- dipendente, che può alterare la trascrizione e l'espressione del codice genetico (Stoll et al., 1976; Webb, 1979; Waalkes e Poirier, 1984).

Il cadmio presenta un metabolismo aberrante dovuto all'elevata affinità per le basi dell'acido nucleico, 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).

#### *1.2.4.5. Effetti cancerogeni*

Il cadmio è classificato nei registri internazionali come cancerogeno (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 si esplica attraverso un'attività promuovente, studi in vitro, infatti, evidenziano un'attivazione dei pro-oncogeni c-jun e c-myc ed una stimolazione della crescita tumorale dovuta ad un legame con il dominio esterno di recettori di membrana accoppiati alla fosfolipasi C (Smith et al., 1989; Jin e Ringertz, 1990; Chen e Smith, 1992; Tang e Enger, 1992).

Polmone, prostata, testicolo, sistema emopoietico e sito di iniezione o di impianto risultano i distretti a carico dei quali si rilevano maggiormente gli effetti cancerogeni del cadmio (Heath et al., 1962; Goering, Waalkes e Klaasen, 1995).

Gli studi condotti nel ratto, come osservato anche nell'uomo, mettono in evidenza come la comparsa di forme neoplastiche polmonari sia conseguente sia ad un'esposizione cronica continua che irregolare. L'attività oncogena del cadmio, non

essendo stata dimostrata nel topo e nel criceto, è, comunque, da ritenersi specie-specifica (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 una loro assunzione orale (Gunn et al., 1963; Gunn et al., 1964; Haddow A. et al., 1964; Rehm e Waalkes, 1988; Waalkes et al., 1989).

Le osservazioni effettuate a carico del sistema emopoietico risultano piuttosto controverse: da una parte, infatti, si assiste ad un aumento di leucemie da esposizione cronica tramite l'alimentazione, mentre, dall'altra, il trattamento singolo con sali di cadmio per via sottocutanea ne comporta un loro decremento. Così, nel topo, la somministrazione sottocutanea di sali di cadmio determina un aumento del numero di linfomi, mentre 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 esplicita dal metallo nel sito di iniezione o d'impianto è nota già da oltre 30 anni ed è dovuta ad una permanenza *in situ* del metallo con conseguente azione irritante, meccanismo questo che si dimostra comune a molti metalli (Heath et al., 1962; Kazantzis, 1963; Haddow A. et al., 1964; Poirier et al., 1983; Waalkes et al., 1988; Waalkes et al., 1989; Waalkes e Oberdörster, 1990).

La somministrazione di zinco può prevenire l'insorgenza di forme tumorali da cadmio indipendentemente dalla via di assunzione (Gunn et al., 1963; Gunn et al., 1964; Oldiges et al., 1989; Waalkes et al., 1989).

#### *1.2.4.6. Effetti immunodepressivi*

Diversi e contrastanti sembrano essere gli effetti del cadmio a carico del sistema immunitario: bassi dosaggi di metallo sembrano avere, infatti, un effetto stimolante l'immunità umorale, che invece subisce una depressione con un loro marcato incremento, mentre livelli intermedi si dimostrano privi di attività in questo senso (Malavè e DeRuffino, 1984; Thomas et al., 1985; Borgman et al., 1986; Descotes, 1999). Un'ipotetica interpretazione di tali differenze di comportamento viene data da Dayan (1990) come conseguenza di una 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.

I risultati degli studi, condotti sia *in vitro* su linfociti T che *in vivo*, e finalizzati a delineare le interferenze esplicitate dal cadmio a carico dell'immunità cellulo-mediata, evidenziano una forte depressione con diminuita attività fagocitaria dei macrofagi peritoneali, ridotta attività delle cellule natural killer e decremento della resistenza alle infezioni (Müller et al., 1979; Fujimaki et al., 1983, Thomas et al., 1985, Descotes, 1992).

### 1.2.5. Impatto ambientale

Nelle aree non contaminate la presenza naturale del cadmio ammonta alle concentrazioni di seguito riportate:

Comparto ambientale	Concentrazione (ppb)
Acque dolci	0.05-0.2
Oceani	0.01-0.1
Sedimenti dei fiumi e dei laghi	5.000
Sedimenti marini	30-100
Suoli di origine non vulcanica	10-1.000
Suoli vulcanici	4.500
Rocce ignee	1-600
Rocce fosfatice	100.000

Questi valori, che vengono comunemente ritenuti non tossici, possono divenirlo nel caso in cui il metallo sia in forma disponibile per una sua assunzione. Va inoltre sottolineato, a tal proposito, che queste concentrazioni possono subire, per fenomeni di bioaccumulo, un marcato incremento, con il raggiungimento di valori (tab. 1.2.2) tali da far risultare alcune specie fonte di tossicità per l'uomo o altri animali (Shuster e Pringle, 1969, Zaroogian e Cheer, 1976; Zaroogian, 1979).

**Tab. 1.2.2.-** Livelli di cadmio, espressi in mg/kg di peso fresco (FW) o peso secco (DW), reperiti in specie aviarie e in mammiferi diversi.

Specie	Tessuto	Concentrazione	Autore
<b>Specie aviarie</b>			
<i>Aythya affinis</i>	Fegato	0.1-1.5 FW	Turner et al, 1978; White et al., 1979; White et al., 1980
	Rene	0.1-22.7 FW	
<i>Larus atricilla</i>	Muscolo	0.1 FW	Hulse et al., 1980
	Cuore	0.1 FW	
	Cervello	0.5 FW	
	Osso	0.4 FW	

	Fegato	0.6FW	
	Rene	0.5-5FW	
<i>Pelecanus occidentalis</i>	Fegato	0.6-13.6 FW	Jenkins, 1980
	Muscolo	0.2-0.4 FW	
<i>Sterna hirundo</i>	Fegato	3.8 FW	
	Rene	21.3 FW	
<i>Phasianus colchicus</i>	Fegato	0.9 FW	
	Rene	7.4 FW	
<i>Turdus migratorius</i>	Fegato	2 FW	
	Rene	0.6 FW	
<i>Accipiter cooperii</i>	Uova	0.015-0.24 FW	Snyder et al., 1973
<b>Mammiferi</b>			
<i>Callorhinus ursinus</i>	Fegato	0.1-15.6 FW	Anas, 1974
	Rene	0.5-4.6 FW	
<i>Globicephala macrorhynchus</i>	Grasso	0.4-0.8 FW	Stoneburner, 1978
	Fegato	11.3-19 FW	
	Rene	27.1-41.8 FW	
<i>Zalophus californianus</i>	Fegato	2-2.6 FW	Buhler et al., 1975
	Rene	10.2 FW	
	Cervelletto	0.6 FW	
	Altri tessuti	<0.2 FW	
<i>Enhydra lutris</i>	Rene	89-300 DW	Jenkins, 1980
<i>Odobenus rosmarus</i>	Fegato	51.6 FW	
	Rene	7.7 FW	
	Muscolo	0.3-0.7 FW	
<i>Canis latrans</i>	Rene	0.4 FW	
<i>Cervus sp.</i>	Fegato	1.5 DW	
	Rene	8.1 DW	
	Muscolo	0.6 DW	
<i>Erethizon dorsatum</i>	Cuore	0.4 FW	

Un'assunzione del metallo da parte degli organismi viventi può essere influenzata da numerosi i fattori sia fisici che chimici: fra questi ricordiamo soprattutto la possibilità di adsorbimento e di rilascio da parte di componenti del terreno, il suo pH, il potenziale redox, la struttura chimica, ecc. (Eisler 1985).

In ambiente acquatico i fenomeni di adsorbimento e di conseguente concentrazione del metallo nei fondali sembrano strettamente legati alla loro natura, Gardiner (1974), per esempio, ricorda come ad un alto contenuto umico si associ una maggiore capacità di adsorbimento, Eisler (1985), invece, sottolinea che il metallo può assumere concentrazioni fino a 500.000 volte superiori rispetto ai suoi livelli nelle acque, in base alla tipologia e alla granulometria dei fanghi, alla quantità di cadmio, a complessi ligandi presenti e alla durata del contatto.

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

La quantità di cadmio disciolto in forma ionica altamente biodisponibile sembra essere influenzato positivamente dalla quantità di ossigeno disciolto: una condizione di anaerobiosi riduce infatti tali livelli e determina un aumento della frazione legata alle particelle sospese, non biodisponibile (Eisler 1985).

Un certo ruolo nell'incrementare i livelli e la biodisponibilità di cadmio nelle acque e nei suoli, sebbene più a livello locale che su larga scala, può averlo anche il rilascio delle quantità di metallo accumulate nel tempo dalle macrofite, che avviene dopo la loro morte (Eisler 1985). La biomagnificazione del cadmio è più importante, come già accennato, nei livelli inferiori delle catene trofiche; Ferard et al. (1983), ad esempio, hanno definito il Fattore di BioConcentrazione (FBC) per una catena trofica a tre livelli (l'alga *Chlorella vulgaris*, il cladocero *Daphnia magna* e il teleosteo *Leucospius delineatus*), che risulta essere pari a 2.550 per l'alga e zero per il teleosteo.

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

Tra le specie selvatiche i fenomeni tossici a seguito di esposizione a cadmio si riscontrano più frequentemente tra le specie acquatiche che non tra le specie aviarie o tra i mammiferi.

Già a concentrazioni superiori a 10 ppb si riscontra, infatti, elevata mortalità in insetti, crostacei e teleostei: la mortalità è direttamente proporzionale alla durata dell'esposizione e inversamente proporzionale alla durezza dell'acqua e all'età dell'animale; i valori di  $CL_{50}$  variano, infatti, in funzione di questi parametri (Biesinger e Christensen, 1972; Kumada et al., 1973; Chapman, 1978; Spehar et al., 1978; Carroll et al, 1979, Anderson et al., 1980; EPA, 1980; Kumada et al., 1980; Canton e Slooff, 1982).

Gli organismi marini, generalmente, poiché vivono in acque più dure, presentano una maggior resistenza rispetto agli organismi d'acqua dolce: sintomi di tossicità, infatti, compaiono per valori pari a 1.2-50 ppb per i primi e a 4-470 ppt per i secondi (Wayland, 2000). Una certa resistenza al metallo si riscontra anche nelle specie aviarie: germani comuni e galline alimentate con diete contenenti 200 ppm di cadmio sono sopravvissuti senza mostrare segni di tossicità, ad eccezione di una mancata ovoprodotzione nelle galline (White e Finley, 1978). Wayland (2000) riporta una concentrazione renale di 100 ppm come valore soglia di tossicità per le specie marine, che scende a 30 ppm per i mammiferi, anch'essi resistenti al metallo. L'Autore, che imputa tale resistenza agli elevati livelli di metallotioneina, riporta

come reperti superiori a 30 ppm siano piuttosto comuni nei mammiferi, sia marini (narvali e foche dagli anelli) che terrestri (alci e altri cervidi), sebbene nelle specie aviarie sia difficile il riscontro di concentrazioni superiori ai 100 ppm.

Nelle specie selvatiche, in particolare in quelle acquatiche, a seguito di esposizione cronica al cadmio, si osserva una ridotta crescita e inibizione della riproduzione. Nell'edredone poi si sono individuate correlazioni tra i livelli di corticosterone (ormone coinvolto con la risposta allo stress e nel metabolismo intermedio) e quelli di cadmio, suggerendo un certo ruolo del metallo nel metabolismo e nell'accumulo del glucosio e del glicogeno (Wayland, 2000).

### 1.3. CROMO

Il cromo è un elemento che, pur in grado di svolgere un ruolo essenziale in numerose specie animali, in quanto componente del fattore di tolleranza al glucosio (FTG), risulta altresì caratterizzato da attività cancerogena e capace per concentrazioni elevate, di indurre importanti effetti tossici.

Gli studi condotti per delineare le concentrazioni ambientali del metallo ne definiscono una presenza pari a 200 ppm nella crosta terrestre e a 1-2.5 ppb nelle acque marine, quando invece nelle zone superficiali del terreno e nei vegetali è rinvenibile solo in tracce (Venugopal e Luckey, 1978).

Il cromo si ritrova sotto forma di ossidi, in particolare ferrocromo ( $\text{FeOCr}_2\text{O}_3$ ) nei depositi dai quali viene estratto; viene impiegato nel campo industriale nella produzione di molte leghe, tra cui l'acciaio inossidabile e quello acido-resistente, di pigmenti e vernici, di batterie, e, ancora, nella stampa di tessuti, nella cromatura di metalli e nell'allestimento di strumenti da taglio dove ha sostituito il tungsteno (Venugopal e Luckey, 1978; IARC, 1980; Stern, 1982; Nieboer et al., 1984; Eisler 1986).

Eisler (1986) ha stimato la quantità di elemento mobilizzato dai depositi a causa degli agenti atmosferici in 32 tonnellate /anno. L'apporto contaminativo è legato a fonti diverse, sostanzialmente individuati dallo stesso Autore, negli scarichi di reflui di lavorazioni industriali, nei rifiuti urbani solidi e liquidi e nell'uso di fertilizzanti. In un rapporto del 2003 della Toxics Release Inventory il rilascio di composti cromati e di cromo nei pressi delle strutture che li utilizzano è stato stimato attorno alle 30 tonnellate e 5 tonnellate rispettivamente).

#### 1.3.1. Caratteristiche chimico-fisiche

Il cromo, metallo di colore grigio-acciaio, ha peso atomico 51.966, punto di fusione di 1900 °C e di ebollizione di 2642 °C.

Pur dimostrandosi estremamente stabile allo stato elementare, raramente viene reperito ad un elevato grado di purezza, mentre più comuni risultano essere i composti originati dai suoi diversi stati di ossidazione (+2, +3, +4, +5 e +6) (Towill et al., 1978; Venugopal e Luckey, 1978; Langård e Norseth, 1979, Ecological Analysts, 1981).

Il cromo, allo stato trivalente è in grado di formare complessi di coordinazione esa- o ottaedrici i quali a pH basico vanno incontro ad idrolisi con formazione di composti insolubili; presenta, inoltre, una particolare affinità per gli atomi di azoto ed ossigeno formando, con gli stessi, complessi interni instabili; allo stato

esavalente, invece, presenta solamente un forte legame con l'ossigeno ed viene rapidamente ridotto a cromo trivalente (Venugopal e Luckey, 1978).

I composti più solubili risultano essere quelli di interesse industriale (cromati e dicromati di sodio, potassio ed ammonio, triossido di cromo, sali idrati di nitrati, cloruri, acetati e solfati), mentre presentano una scarsa o nulla idrosolubilità alcuni pigmenti quali: il cromato di piombo, l'ossido di cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) e l'idrossido di cromo  $[\text{Cr}(\text{OH})_3]$  (O'Flaherty, 1995).

Seppur scarsamente caratterizzati da un punto di vista biologico, i composti biologicamente attivi, come il FTG, sono annoverati tra i complessi più facilmente utilizzati dall'organismo, soprattutto se confrontati con i sali inorganici, fra i quali perclorati e salicilati presentano una modesta attività come FTG (Venugopal e Luckey, 1978).

### 1.3.2. Comportamento cinetico

L'uomo e gli animali assumono il cromo principalmente per via gastroenterica e inalatoria, con un assorbimento che varia anche in funzione dello stato di ossidazione del metallo.

Il cromo trivalente presenta una scarsa attitudine ad attraversare le membrane e per questo viene scarsamente assorbito sia a livello del tubo digerente che del polmone, così che la quantità rispettivamente assorbita dai due distretti è stimata da Autori diversi (MacKenzie et al., 1959; Mertz et al., 1964; Edel e Sabbioni, 1985) in valori compresi tra meno dell'1% ed un 6%.

I composti del cromo esavalente, prima della loro riduzione a cromo trivalente si dimostrano, al contrario, ben assorbibili a livello polmonare in funzione della loro solubilità; a seguito di una massiva riduzione a cromo trivalente, nel tratto gastroenterico, il suo assorbimento, dopo ingestione, raggiunge normalmente solo un 6%, tale valore può, invece, aumentare ad un 20% nel caso in cui, nel corso di un esperimento, i sali di cromo vengano introdotti direttamente nell'intestino (MacKenzie et al., 1959).

Un importante meccanismo di clearance del cromo presente in sede polmonare è rappresentato dal suo passaggio dai polmoni all'apparato gastroenterico. I risultati di Langård et al. (1978) convalidano tale fenomeno, essi infatti mettono in evidenza nel ratto, sottoposto per 6 ore ad inalazione di cromato di zinco, elevate concentrazioni di cromo nelle feci.

Allo stesso modo dalle osservazioni eseguite sempre nel ratto da Bragt e van Dura (1983) risulta che la frazione di metallo che passa nelle feci aumenta con il diminuire della solubilità del sale, infatti al nono giorno post-trattamento inalatorio

con il cromato di piombo, sale insolubile, è possibile reperire un 80% della dose somministrata, che diminuisce, invece, ad un 20% dopo somministrazione di un sale solubile quale il sodio cromato. I risultati acquisiti da Weber (1983) e da Edel e Sabbioni, (1985) con analoghi esperimenti condotti con sali di cromo trivalente danno conferma a queste osservazioni, questi risultati, infatti, riportano, in settimo giorno post-trattamento, valori medi di escrezione fecale pari ad un 36%.

La composizione del contenuto gastrico insieme al tipo di anione che costituisce il sale e all'attività biologica del composto rappresentano i fattori che influenzano l'assorbimento del metallo a livello gastroenterico: così, ad esempio gli ossalati di cromo sono meglio assorbiti dei fitati, mentre le percentuali di assorbimento dei complessi biologicamente attivi possono raggiungere valori pari ad un 10-25%; va ricordato, inoltre, che la presenza di zinco può modificare la quota di metallo assorbita e che l'assorbimento di entrambi gli ioni può venire potenziato da uno stato di digiuno (MacKenzie et al., 1959; Mertz e Roginski, 1971; Chen et al., 1973; Hahn e Evans, 1975).

Il cromo esavalente, in ambiente gastrico, viene rapidamente e spontaneamente ridotto a cromo trivalente con una velocità che varia in funzione dell'acidità gastrica e della quantità di alimento presente (Donaldson e Barreras, 1966; DeFlora et al., 1987).

Il cromo trivalente, una volta assorbito, si riversa nel torrente ematico sotto forma di complessi con aminoacidi, acidi organici a basso peso molecolare e proteine, fra loro presenti in percentuale diversa a seconda dello stato nutrizionale e fisiologico dell'animale, ma indipendentemente dalla forma chimica del composto assunto (Gad, 1989; O'Flaherty, 1995). In sede plasmatica il metallo si lega principalmente alla transferrina, ma se presente in eccesso rispetto alla disponibilità della proteina si lega anche all'albumina e ad altri ligandi a basso peso molecolare, e il passaggio di membrana e di diffusione verso i tessuti è dovuta proprio a quest'ultima frazione (Visek et al., 1953; Hopkins e Schwarz, 1969; Gad, 1989; O'Flaherty, 1995).

Entrambe le forme ioniche sono in grado di penetrare nei globuli rossi, dove il cromo esavalente viene ridotto a trivalente permanendo a lungo all'interno degli eritrociti; la frazione globulare, in tutti i casi, non è comunque biodisponibile, da ciò si deduce che l'aliquota plasmatica è l'unica responsabile della distribuzione tessutale del metallo (O'Flaherty, 1995).

L'unico substrato in grado di accumulare una percentuale importante del cromo circolante è rappresentato dal tessuto osseo ed in particolare quello presente nella regione epifisaria delle ossa lunghe, e la distribuzione a questo livello, secondo

Kraintz e Talmage (1952) e Weber (1983), risulta analoga a quella del calcio e dello stronzio, elementi costitutivi del tessuto osseo stesso.

La presenza del metallo può risultare, come evidenziato dai risultati degli studi condotti nel ratto, direttamente dipendente dall'età dell'animale e particolarmente evidente nell'osso in accrescimento (Weber 1983; Witmer e Harris, 1991). Le osservazioni di Hopkins (1965) danno conferma di questa affermazione; egli, infatti, ha messo in evidenza come in ratti in accrescimento la somministrazione endovenosa di  $\text{CrCl}_3$  si traduca dopo 4 ore dal trattamento in un'incorporazione pari ad un 7% della dose utilizzata, con un suo incremento al 12% alla 24<sup>a</sup> ora, mentre nel ratto adulto lo stesso schema di trattamento comporti un'incorporazione solo pari ad un 4% senza successivi incrementi nel tempo.

Altri distretti di accumulo del metallo possono essere fegato, rene e milza, nonché testicoli ed epididimi, senza sostanziali differenze, come rilevato nel ratto, tra i sessi e indipendentemente dal dosaggio impiegato per somministrazione endovenosa unica (Mackenzie et al., 1958; MacKenzie et al., 1959; Mertz et al., 1964; Hopkins, 1965; Bragt e vanDura, 1983; Edel e Sabbioni, 1985).

Dalle indagini eseguite, sempre nel ratto, a seguito di esposizioni ripetute al metallo presente nell'acqua di abbeverata fino a concentrazioni massime di 25 ppm, sembra emergere, invece, limitatamente al tessuto epatico, una certa dose-dipendenza, per altro non caratterizzata da alcuna proporzionalità (Mackenzie et al., 1958; MacKenzie et al., 1959; Mertz et al., 1964; Hopkins, 1965; Bragt e vanDura, 1983; Edel e Sabbioni, 1985).

Il cromo assorbito subisce, a livello tissutale, la stessa reazione riduttiva che si verifica a livello gastrico, in questo caso, però, il processo è efficacemente catalizzato da numerosi enzimi microsomiali, mitocondriali e citosolici (Donaldson e Barreras, 1966; DeFlora et al., 1987).

L'escrezione del cromo, indipendentemente dal suo stato di ossidazione, si verifica prevalentemente per via urinaria. La somministrazione endovenosa nel ratto di cromo tri- ed esavalente, secondo Cikrt e Bencko (1979), comporta un reperimento del metallo, nelle urine delle prime 24 ore, pari a circa il 20% della dose utilizzata, nella bile delle prime 4 ore post-trattamento si rendono invece reperibili aliquote rispettivamente pari allo 0.5% con i composti trivalenti e al 3.5% per quelli esavalenti. Le quote reperibili in sede fecale risultano del 4.2% con i primi e del 7.3% con i secondi. Risultati analoghi sono stati raggiunti anche con gli studi di Cavalleri et al. (1985) dai quali si evince come l'escrezione biliare ammonti a quantitativi pari ad un 2% del dosaggio somministrato, di cui solo un 1% è costituito da cromo esavalente, in quanto quest'ultimo, pur dotato di una maggior

permeabilità rispetto al cromo trivalente, che ne comporta una più rapida escrezione nelle prime ore post trattamento, è anche oggetto di una rapida riduzione alla forma trivalente (Cikrt e Bencko 1979).

### 1.3.3. Meccanismo d'azione ed attività biologica

Il cromo rappresenta l'unico metallo di transizione per il quale non sia noto il meccanismo d'azione (Stoecker, 1999).

Mentre il cromo trivalente non sembra presentare particolari attività tossiche per gli organismi, lo ione esavalente si comporta, al contrario, da agente corrosivo locale: ciò è imputabile al suo elevato potere ossidante e alle sue caratteristiche acide, che possono portare ad irritazioni locali conseguenti ad esposizioni sia inalatorie che orali o dermiche; va ricordato, al proposito, che in passato i casi di perforazione della mucosa nasale assumevano particolare rilevanza nei lavoratori dell'industria galvanica. Fenomeni di sensibilizzazione e di dermatite allergica nell'uomo sono inoltre descritti in letteratura (O'Flaherty, 1995).

Nell'organismo il cromo riveste un ruolo essenziale per la normale attività dell'insulina, per il trasporto di metaboliti cellulari attraverso le membrane e per il metabolismo dei carboidrati (Preston et al., 1976; Onkelinx, 1977; Gale, 1978; Towill et al., 1978; Langård e Norseth, 1979; Post e Campbell, 1980).

Il cromo può reagire con gli acidi nucleici, tanto da rendersi reperibile nei preparati di RNA purificato, ma non entra, invece, nella composizione di alcun metalloenzima e non si dimostra attivatore enzimatico (O'Flaherty, 1995).

Se somministrato in suini, agnelli, ratti e polli può portare ad un miglioramento dell'indice di conversione con una riduzione della massa adiposa a favore di quella muscolare (Stoecker, 1999).

Il ruolo fisiologico svolto dal cromo nell'organismo viene confermato dall'osservazione in soggetti in carenza di metallo di una ridotta tolleranza al glucosio, con comparsa di stati patologici diabeto-simili, di un ritardo della crescita, di un decremento della durata della vita, cui si associano aumento del colesterolo sierico e della formazione di placche aortiche, al contrario la somministrazione di cromo riduce il contenuto sierico di lipidi totali e di colesterolo, con miglioramento del rapporto HDL/LDL (Preston et al., 1976; Riales e Albrink, 1981; Anderson et al., 1983; Mossop, 1983; Anderson, 1986; Evans, 1989; Wang et al., 1989).

### 1.3.4. Aspetti tossicologici

Il cromo nella forma trivalente non possiede alcun potenziale tossico ed attualmente non è possibile reperire in letteratura dati significativi concernenti intossicazioni a seguito di un'assunzione orale di tale ione, tenendo anche conto della sua incapacità

di attraversare le membrane. Nel ratto, come messo in evidenza dai risultati degli studi effettuati da Autori diversi (Schroeder et al., 1962; Mertz, 1969; Mertz e Roginski, 1975; Chromium Information Bureau, 1999), un'alimentazione con latte contaminato con 100 ppm di cromo lattato non comporta alcun segno di tossicità, analoghi riscontri sono stati ottenuti da studi eseguiti nel gatto con diete addizionate di 1000 ppm.

Il cromo esavalente desta, invece, un maggiore interesse dal punto di vista prettamente tossicologico: questo ione, infatti, può indurre alterazioni alimentari e comportamentali e modificazioni delle attività enzimatiche, dei parametri ematocimici, oltre ad una minore resistenza agli agenti infettivi (Eisler 1986).

Nella tab. 1.3. sono riportati i valori di DL per il cromo.

**Tab. 1.3-** Valori di DL<sub>50</sub> definiti per il cromo a seguito di somministrazione per vie diverse in differenti specie animali (Venugopal e Luckey, 1978).

<b>Composto</b>	<b>Via di somministrazione</b>	<b>Specie</b>	<b>Tossicità</b>	<b>Dose (mg/kg o mg/m<sup>3*</sup>)</b>
<b>Triossido di cromo</b>	Sottocutanea	Cane	DML <sup>§</sup>	330
<b>Acido cromico</b>	Sottocutanea	Cane	DML	320
	Orale	Ratto	DL <sub>100</sub>	350
<b>Cromato di sodio</b>	Sottocutanea	Cavia, coniglio	DL <sub>100</sub>	30-243
	Endovenosa	Coniglio	DL <sub>100</sub>	32
	Endovenosa	Cane	DML	235
	Orale	Bovino	DL <sub>100</sub>	700
<b>Sodio dicromato</b>	Endovenosa	Topo, coniglio	DML	18.4-26.2
	Sottocutanea	Cavia	DML	25.5
<b>Potassio dicromato</b>	Sottocutanea	Topo, cavia	DL <sub>100</sub>	29.4-100
	Endovenosa	Coniglio	DL <sub>100</sub>	27.9
	Orale	Cane	DL <sub>100</sub>	2830
<b>Cromato di piombo</b>	Intraperitoneale	Cavia	DL <sub>50</sub>	400
<b>Tricloruro di cromo</b>	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	140
	Endovenosa	Topo, coniglio	DML	288-800
	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	1870
<b>Nitrato cromico</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	3250
<b>Solfato cromico</b>	Endovenosa	Topo, coniglio	DML	217-247

\* Esposizione per 4 h

§ Dose Minima Letale

#### *1.3.4.1.Tossicità acuta*

Il cromo esavalente possiede un potere nefrotossico per l'uomo e gli animali, con danni sia glomerulari che tubulari, con conseguente albuminuria e poliuria (Appenroth e Bräulich, 1988; Gumbleton e Nicholls, 1988; Goyer, 1990).

Esiste, secondo Franchini e Mutti (1988), un livello soglia superato il quale si verifica il danno tubulare; questo sembra avvenire solo dopo una saturazione dei sistemi di detossificazione, che porta ad una sua riduzione a cromo trivalente e ad un probabile aumento, a livello epatico, della sintesi di ribonucleine (Wacker e Vallee, 1959; Petrilli e DeFlora, 1988; O'Flaherty, 1995).

La temperatura, il pH, la salinità e l'alcalinità dell'acqua, le interazioni del cromo con altri contaminanti, la durata dell'esposizione, la forma chimica considerata, la specie, l'età e lo stadio di sviluppo dell'organismo interessato rappresentano alcuni dei diversi parametri abiotici e biologici che modificano la tossicità esplicita dal metallo nelle specie acquatiche. I valori di LC<sub>50</sub> a 96 ore definiti per il cromo esavalente e trivalente ammontano nelle specie d'acqua dolce a valori pari a 445 ppb e 2-3.2 ppm, mentre nei confronti delle specie marine si dimostrano dell'ordine di 2 ppm e 3.3-7.5 ppm (tab. 1.3 ) (Eisler 1986).

Le acque dolci e quelle acide aumentano la tossicità del cromo (EPA, 1980). Nei teleostei non esistono meccanismi di adattamento o responsabili di variazioni nella reattività al metallo, tanto che un'esposizione ripetuta al cromo non comporta alcuna modificazione nelle risposte da parte dei pesci (EPA, 1980; Stevens e Chapman 1984).

Dai dati reperiti in letteratura concernenti gli organismi terrestri si evince che la somministrazione endovenosa di cromo a dosaggi compresi fra 1 e 5 mg/kg si dimostra letale per molte specie di laboratorio, che presentano danni renali già a dosi di 0.2-0.5 mg/kg (Eisler 1986).

#### *1.3.4.2.Tossicità a lungo termine*

L'assunzione di cromo trivalente addizionato alla dieta per l'intera vita in quantità di 5 ppm esplica una benefica azione sull'accrescimento e sulla sopravvivenza di ratti e topi, mentre uno stesso trattamento condotto con cromo esavalente determina un leggero ritardo della crescita e la formazione di tumori maligni (Schroeder et al., 1965; Schroeder e Mitcher, 1971; Venugopal e Luckey, 1978).

Albuminuria con cellule di desquamazione, iperemia renale, degenerazione grassa e necrosi dell'organo sono gli effetti indotti da una somministrazione nel coniglio di cromati, così come 1.7 mg/kg di metallo somministrati alla stessa specie ed al ratto

per 6 settimane inducono alterazioni ematochimiche e modificazioni morfologiche a carico del fegato (Tandon et al., 1978; Laj et al., 1984).

Nel pollo, che come tutte le specie aviarie risulta più resistente al metallo, un'alimentazione con diete contenenti 100 ppm, protratta per 32 giorni, non determina alcun effetto (Steven et al. 1976).

Nelle specie selvatiche, secondo i dati rilevati in letteratura, i valori minimi di cromo esavalente in grado di influenzare la sopravvivenza, l'accrescimento e l'attività riproduttiva (Massima Concentrazione di Tossico Accettabile o MATC) si attestano su valori compresi tra 51 e 105 ppb per la trota e tra 1 e 31.95 ppm per i ciprinidi, mentre tra gli organismi marini la MATC calcolata per un polichete risulta variabile da 17 a 38 ppb. Gli unici valori reperibili di MATC relativamente al cromo trivalente, riguardano l'ambiente d'acqua dolce, con oscillazioni che vanno dai 47 ppb ad 1.4 ppm per *Daphnia magna*, ciprinidi e trota (Eisler 1986).

#### *1.3.4.3. Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi*

Il cromo esavalente si è dimostrato essere in grado di svolgere embriotossicità ed effetti teratogeni dose-dipendenti. A seguito di iniezione diretta nell'uovo, infatti, esso si rende responsabile di deformità agli arti, microoftalmia, esencefalia, inversione dei visceri e becco a pappagallo nell'embrione di pollo (Ridgeway e Karnofsky, 1952; Gilani e Marano, 1979; Hemminki e Lindbohm, 1986).

Allo stesso modo, l'azione lesiva esplicita nella prole da una somministrazione endovenosa nella madre di cromo esavalente alla dose di 5 mg/kg è caratterizzata da palatoschisi e difetti di ossificazione (Gale, 1978).

Infine va ricordato che il metallo, sempre nella forma esavalente, riduce l'accrescimento degli avannotti di trota e di salmone esposti per 14-16 settimane a concentrazioni ambientali di metallo comprese tra 16 e 21 ppb (EPA, 1980).

#### *1.3.4.4. Effetti mutageni*

Il cromo si dimostra in grado esplicitare un'azione mutagena su numerosi sistemi batterici ed animali. Va ricordata a tal proposito la positività riscontrata nel corso di studi condotti su *Salmonella typhimurium* e *Bacillus subtilis* esposti allo ione esavalente, mentre con la forma trivalente non si riscontrano effetti analoghi (Leonard e Lauwerys, 1980; Hatherill, 1981; Norseth, 1981; Del Carratore et al., 1984).

A seguito di un'esposizione per 24 h a concentrazioni di 24 ppm nell'acqua o d'iniezione di 1 mg/kg di metallo si riscontrano, nei modelli animali, aberrazioni cromosomiche nelle branchie (Krishnaja e Rege, 1982). Gli studi effettuati da

Uyeki e Nishio (1983) su colture di cellule ovariche di criceto mettono in evidenza un aumento negli scambi tra cromatidi fratelli ed un'inibizione della proliferazione cellulare a seguito di un'esposizione a 52 ppb di metallo, ma non a 0.52 ppb, Hatherill, (1981), al contrario, riscontra riarrangiamenti ed aberrazioni cromosomiche nel coniglio.

La somministrazione di agenti riducenti o di acido ascorbico, come riportato dagli stessi Autori, è in grado di revertire gli effetti mutageni del cromo.

#### *1.3.4.5. Effetti cancerogeni*

A differenza di quanto accade nell'uomo per il quale il cromo si è dimostrato un potente cancerogeno, con riscontro di un'elevata incidenza di neoplasie polmonari a seguito di esposizioni professionali a cromati, dicromati o triossidi di cromo, pochi sono i rilievi relativi ad una sua azione cancerogena negli animali (Eisler 1986; Langård, 1990). Solo Langård e Norseth (1979) rilevano un'insorgenza nel topo di adenocarcinoma dell'albero bronchiale dopo inalazione per 35 settimane di  $\text{CaCrO}_4$  al livello di  $13 \text{ mg/m}^3$ , oltre allo sviluppo di sarcomi e di carcinomi cutanei in alcune specie di laboratorio esposte al metallo.

Alla formazione di composti intermedi altamente reattivi ed elettrofili (cromo pentavalente, radicali ossigeno ed idrossilici) che si attua a seguito dei normali processi di detossificazione è attribuibile la responsabilità degli effetti genotossici ed oncogeni (Alexander et al., 1986; Bancks e Cooke, 1986; Kawanishi et al., 1986, Rossi e Wetterhahn, 1989; Wetterhahn e Hamilton, 1989).

#### *1.3.4.6. Effetti immunodepressivi*

Il cromo non presenta particolari effetti immunodepressivi; in vitelli stressati un'integrazione alimentare con 0.2 ppm di cromo esavalente comporta, al contrario, un aumento della concentrazione plasmatica di immunoglobuline e dei titoli di anticorpi emoagglutinanti (Chang e Mowat, 1992; Moonsie-Shageer e Mowat, 1993). Burton et al. (1993) riportano ancora come un incremento nella risposta anticorpale alla stimolazione con vaccino della rinotracheite infettiva bovina nel vitello e nella risposta umorale e cellulosa- mediata in bovine da latte possa essere indotto da diete contenenti 0.5 ppm di metallo.

#### *1.3.5. Impatto ambientale*

Poiché la stessa quantità di cromo può risultare più o meno reattiva e mobile in funzione del tipo di ione presente nel composto, gli effetti del cromo sugli organismi viventi sono fortemente influenzati dallo stato fisico-chimico del metallo (Steven et al. 1976).

Tra i fattori che modificano la tossicità del cromo nell'ambiente acquatico vanno ricordati la durezza, la temperatura, il pH e il grado di salinità dell'acqua, oltre alla specie e allo stadio di sviluppo dell'organismo. Un ruolo decisamente rilevante nel determinare il destino e gli effetti del metallo viene esplicitato dall'idrolisi e dalla precipitazione dei sali, mentre i fenomeni di adsorbimento e di bioaccumulo sembrano svolgerne uno piuttosto marginale (Ecological Analysts, 1981). Quella esavalente è la forma ionica predominante nelle acque marine; forma complessi altamente solubili e quindi molto mobili nell'ambiente; i composti originati dallo ione trivalente sono, invece, di tipo idrossilico, precipitano e vengono sequestrati dai sedimenti, dai quali vengono rilasciati solo in particolari condizioni di acidità e di anossia (Ecological Analysts, 1981). Nei sedimenti dei fiumi sono state rilevate concentrazioni elevate, ciò è dovuto alla loro ricchezza di materiale organico e di ferro, che allo stato colloidale lega e sequestra il metallo, consentendone pertanto il trasferimento all'ambiente marino sotto forma di flocculati (Mayer et al., 1981). Al proposito i rilievi eseguiti da Rehm et al. (1984) su sabbie intertidali e su fanghi anaerobi delineano livelli di cromo pari rispettivamente a 3.9 mg/kg e a 162.0 mg/kg.

Gli studi riguardanti le cause di un inquinamento ambientale attribuiscono la principale responsabilità dell'inquinamento idrico alle emissioni atmosferiche, tanto che nell'incremento dei livelli di cromo risultano addirittura più incisive dello scarico diretto di reflui liquidi nelle acque (Ecological Analysts, 1981).

La disponibilità del metallo nell'ambiente terrestre può subire modificazioni ad opera del pH e del contenuto di materiale organico presente nel suolo, questo perché questi parametri si dimostrano in grado, rispettivamente, di influenzare la velocità di riduzione dello ione esavalente a trivalente ed il grado di solubilità dei composti del cromo: i complessi organici del cromo rimangono infatti solubilizzati nel suolo per almeno un anno, gli ioni trivalenti liberi vengono, al contrario, rapidamente adsorbiti dal terreno mentre i sali dello stesso metallo vanno incontro ad idrolisi e a precipitazione (James e Bartlett, 1983a, 1983b; Eisler 1986).

Il cromo sembra, secondo i dati relativi ad un reperimento del metallo negli organismi di specie selvatiche, assumere concentrazioni più elevate nelle aree prossime a sorgenti puntiformi di emissione e una concimazione dei terreni condotta con fanghi di origine urbana, potenzialmente inquinati dal metallo, sembra, sempre secondo gli stessi dati, poter comportare un elevato rischio per la fauna. In particolare una concentrazione di cromo nei tessuti di pesci e di animali terrestri pari a 4.0 mg/kg viene ritenuta da Eisler (1986) dato indicativo di una contaminazione ambientale attuata da questo metallo.

## 1.4.FERRO

Il primo rilevamento storico di questo metallo risale al primo millennio a.C., corrispondente alla cosiddetta Civiltà del Ferro, che vede questo metallo utilizzato nella forgiatura di armi da difesa e strumenti da lavoro taglienti, che si sostituiscono alle precedenti armi di bronzo. Nonostante la sua maggiore resistenza, il ferro fu a lungo considerato un materiale raro a causa delle difficoltà di estrazione e di lavorazione: le sue prime testimonianze si hanno in Africa: Egitto e Mesopotamia, poi, attraverso l'Asia minore, in Sicilia ed Europa centrale. Qui dal 1000 al 700 a.C., in Grecia troviamo una sua rara presenza, mentre in Etruria gli Etruschi cominciarono ad utilizzare le risorse di ferro dei popoli conquistati (quella dell'isola d'Elba fu la maggiore di queste). I rilevamenti più importanti e meglio conservati sono quelli delle necropoli, in cui si assiste ad una vasta produzione di oggetti ad uso quotidiano. In Italia nel corso del Medioevo e Rinascimento, fino all'età barocca, è sempre più richiesto. E' tra Ottocento e Novecento che declina l'arte del ferro per ricomparire poi nella seconda metà del XX secolo ([www.zoomedia.it](http://www.zoomedia.it)).

Il ferro è il quarto elemento, in abbondanza, della crosta terrestre dopo silicio, ossigeno e alluminio. Le caratteristiche di questo metallo sono la duttilità e la malleabilità e, per questo, è uno dei metalli più impiegati nell'industria metallurgica per la formazione di numerose leghe. Estratto dagli ossidi per riduzione e carburazione con carbone negli altiforni, il ferro dà vita alla ghisa, che può successivamente essere convertita in acciaio.

Numerose sono, inoltre, le preparazioni terapeutiche a base di sali di ferro (carbonato, cloruro, solfato, ecc.) che possono essere usate negli animali per via enterale o parenterale allo scopo di integrare una dieta carente di questo elemento. Si menziona, al riguardo, il ferro destrano, somministrato quasi di routine ad animali neonati per la profilassi dell'anemia.

Si ricorda, inoltre, la sua presenza nei sistemi organici sia vegetali che animali, dove è implicato in importanti attività fisiologiche.

### 1.4.1. Caratteristiche chimico-fisiche

Il ferro è un elemento chimico, simbolo Fe, appartenente all'VIII gruppo del sistema periodico degli elementi. Numero e peso atomico del ferro sono 26 e 55,847, punto di fusione 1536°C e di ebollizione 3000°C. È un metallo pesante (peso specifico 7,86 g/cm<sup>3</sup>), di colore bianco argenteo. Negli ecosistemi è presente prevalentemente in forma ossidata come Fe<sup>2+</sup> o Fe<sup>3+</sup>, ha grande affinità con ossigeno e acqua e non si

modifica in presenza di aria secca o a contatto con acqua, purché priva di anidride carbonica; ciononostante subisce facilmente idrolisi a contatto con aria umida e viene corrosivo profondamente trasformandosi in idrossido di ferro insolubile (ruggine).

Allo stato puro, il ferro esiste in quattro forme cristalline denominate ferro  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . Le temperature di transizione da una forma cristallina all'altra sono 780, 930 e 1390 °C.

Anche in soluzione acquosa si trova come ione ferroso o ferrico in complessi organici; con pH vicino alla neutralità e in aerobiosi lo ione ferroso dei sali inorganici viene convertito nella più stabile forma ferrica.

#### 1.4.2. Comportamento cinetico

L'organismo animale attua una politica sicuramente "risparmiatrice" per quanto riguarda sia le assunzioni che il metabolismo del ferro; è, difatti, un oligoelemento necessario agli esseri viventi in quantità più elevate rispetto ad altri, per questo la principale fonte di questo metallo non è quella alimentare, bensì i depositi organici e il ferro derivante da processi emocateretici. La quota che si origina dalla distruzione degli eritrociti può essere immediatamente riutilizzata in forma di ferro attivo, piuttosto che essere depositata come ferro di riserva. Allo stesso tempo, tuttavia, a causa della sua capacità di cambiare stato di ossidazione, questo metallo può rivelarsi tossico, per cui la concentrazione della sua forma attiva deve essere mantenuta costante: questo fenomeno viene attuato grazie a una proteina plasmatica, la transferrina, appartenente alle  $\beta$ 1-globuline, e a una proteina citosolica delle cellule del sistema reticoloendoteliale, la ferritina (Gutteridge, 1987).

La via di assorbimento del ferro alimentare negli animali è quella enterica, attraverso la mucosa intestinale di duodeno e digiuno prossimale; questo processo è regolato da molteplici fattori: la disponibilità di energia metabolica, la richiesta organica dell'elemento, la sua concentrazione nell'alimento, la presenza in questo di sostanze in grado di chelare il metallo prima del suo assorbimento, l'efficienza dei sistemi carriers trans-membranari, l'entità della sintesi proteica, la digestione del cibo e la motilità intestinale.

L'assorbimento mediante altre vie di questo metallo dipende dalla solubilità del composto ed è abbastanza rapida. Attraverso i polmoni, ad esempio, sono rapidamente assorbiti nel sangue i composti solubili, mentre quelli insolubili vengono trattenuti nell'organo (Venugopal e Luckey, 1978).

Il ferro assunto con la dieta è legato in composti organici in forma ferrica e, per essere assorbito, deve venire trasformato in forma ferrosa ad opera di sostanze presenti nell'alimento stesso (acido ascorbico, ad esempio) oppure nello stomaco o nel primo tratto enterico. Una volta assorbito, in parte si deposita sotto forma di ferritina, in parte si distribuisce, veicolato nel sangue dalla transferrina, ai vari tessuti, soprattutto al fegato e alla milza, dove si deposita nuovamente come ferritina o come emosiderina, aggregato poco solubile che, in quantità eccessive, dà origine a quadri patologici. Un'altra quota considerevole va nel midollo osseo, dove viene utilizzata per la sintesi di cromoprotidi ed emoglobina.

Se il quantitativo di metallo introdotto nell'organismo supera la capacità di stoccaggio delle cellule, si instaura un meccanismo che blocca un'ulteriore liberazione di ferro dalla transferrina ai tessuti; questa proteina, quindi, normalmente satura solo per 1/3, si satura completamente, per cui il ferro si può accumulare solo nei depositi di ferritina negli enterociti, limitandone successivi assorbimenti. Inoltre le cellule della mucosa enterica, una volta morte e sfaldatesi nel lume intestinale, ne permettono un'escrezione con le feci.

In realtà il ferro assunto con la dieta in quantità minime (si ricordi che la richiesta organica è di ~3 mg/die, variando a seconda del "momento" fisiologico) serve solo a bilanciare le piccole perdite che si hanno col ricambio cellulare della pelle, dei peli e delle unghie.

Oltre alle feci, quote molto piccole di ferro sono escrete con le urine, il sudore e la desquamazione cellulare.

### 1.4.3. Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico

Il ferro è, insieme allo zinco, il metallo pesante più rappresentato nelle matrici biologiche ed è presente in concentrazioni elevate soprattutto nei tessuti molto vascolarizzati. In queste sedi, il metallo entra a far parte di numerosi composti organici, come, ad esempio, citocromi, enzimi mitocondriali, emoglobina.

Trattare separatamente tutte le attività biologiche del ferro sarebbe compito difficoltoso, risultando eccessivamente lunga l'esposizione dettagliata delle reazioni regolate da questo metallo e quelle a cui esso partecipa. Tra le più importanti reazioni biologiche che si svolgono solo in presenza di ferro, si possono ricordare le catalisi, la perossidazione, la sintesi del DNA, il trasporto di ossigeno nel torrente ematico e da questo ai tessuti periferici, l'eritropoiesi.

Dal punto di vista biochimico, i composti biologici del ferro sono distinti in tre categorie: 1. *ferro eme*, il metallo chelato da una porfirina, come avviene

nell'emoglobina, mioglobina e citocromi; 2. *ferro non eme*, unito a leganti proteici come ferritina, emosiderina, albumina, caseina o altri complessi a basso peso molecolare come zuccheri, acido ascorbico, acido citrico, amminoacido; 3. *ferro in forma insolubile* come fosfato ferrico, fitati, idrossido ferrico.

La maggior parte del ferro presente negli organismi viene impiegata nel processo dell'eritropoiesi (~70%); un'altra buona quantità si trova sotto forma di ferritina ed emosiderina (~20-30%); un 10-15% è reperibile negli enzimi cellulari, un 3% nella mioglobina; infine una minima parte è legata alla transferrina e si trova nel circolo ematico.

Uno dei meccanismi con cui il ferro esplica la sua azione tossica a livello cellulare consiste nella capacità di catalizzare la produzione di radicali idrossilici, che sono potenti agenti ossidanti; questi determinano, poi, una perossidazione delle membrane lisosomiali e depolimerizzazione dell'acido ialuronico con gravi danni a livello di alveoli polmonari e degli endoteli. In più, il metallo libero o sotto forma di aggregati di ferritina, accumulandosi anche nelle membrane sinoviali articolari, contribuisce a creare le lesioni caratteristiche dell'artrite reumatoide attraverso la produzione di radicali ossigeno e perossidi lipidici.

Il metallo causa l'inattivazione degli enzimi del ciclo di Krebs e ciò porta ad accumulo di acido lattico e altri acidi nel sangue e nei tessuti, diminuendo contemporaneamente il volume plasmatico in ragione di un'aumentata permeabilità capillare. Inoltre quando la concentrazione di  $Fe^{3+}$  eccede la capacità legante della transferrina, lo ione precipita in forma di  $Fe(OH)_3$ , rilasciando numerosi idrogenioni  $H^+$  che possono abbassare ulteriormente il pH ematico fino a valori di 6,7 (Venugopal e Luckey, 1978).

Assunzioni di sali di ferro in dosi tossiche accrescono la virulenza dei batteri mediante saturazione della transferrina sierica, proteina che aumenta l'interferenza esercitata sul metabolismo batterico del Fe da parte delle  $\beta_2$  e  $\gamma$ -globuline sieriche (Bullen e Rogers, 1969). In più il ferro si accumula nei lisosomi dei granulociti polimorfonucleati e in questo modo diminuisce le proprietà antibatteriche di queste cellule.

#### 1.4.4. Aspetti tossicologici

Il ferro è un metallo per cui carenze nell'assunzione sono in grado di indurre alterazioni dell'omeostasi negli organismi viventi, la cui manifestazione più tipica è l'insorgenza di un'anemia rigenerativa inefficace, caratterizzata da reticolocitosi e

microcitosi eritrocitaria nella maggior parte delle specie animali e da ipocromasia (Harvey *et al.*, 1982; Weiser e O'Grady, 1983).

Oltre alle carenze, tuttavia, il ferro è in grado di esplicare azioni tossiche se la sua assunzione è eccessiva. Un eccesso di ferro si può avere in seguito a un fallimento dei meccanismi regolatori della sua concentrazione e ad un'alterazione della capacità assorbente del tratto digerente, oppure in conseguenza di ripetute trasfusioni di sangue. Un assorbimento smisurato di questo metallo si ha nella emocromatosi "idiopatica", in caso di apporto dietetico sproporzionato di ferro solubile o in terapie prolungate e nelle anemie con eritropoiesi inefficace ed emolisi intensa.

Si è visto che il ferro in eccesso assorbito dal tratto gastroenterico si accumula nelle cellule parenchimali, mentre quello somministrato per via parenterale si deposita nelle cellule reticoloendoteliali (Nath *et al.*, 1972). Ad ogni modo, un accumulo di ferro, che va sotto il nome di emosiderosi e emocromatosi, rispettivamente nei tessuti e nel siero, provoca una serie di disordini eterogenei inquadrabili sia in stati acuti che cronici.

La dose letale media di solfato di ferro nell'uomo è variabile tra 200 e 500 mg/kg di peso corporeo; una somministrazione intravenosa di 10 mg/kg di ferro o un'assunzione di 150-250 mg/kg attraverso altre vie causa acidosi metabolica nel cane e nel coniglio (Reissman e Coleman, 1955; Arena, 1970).

**Tab. 1.4-** Valori di DL definiti per il ferro a seguito di somministrazione per vie diverse in differenti specie animali (Venugopal e Luckey, 1978).

<b>Composto</b>	<b>Via di somministrazione</b>	<b>Specie</b>	<b>Tossicità</b>	<b>Dose (mg/kg o mg/m<sup>3</sup>*)</b>
<b>Cloruro ferroso</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	984
	Orale	Coniglio	DL <sub>100</sub>	890
	Rettale	Ratto, coniglio	DL <sub>100</sub>	591-984
	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	188
<b>Cloruro ferrico</b>	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>100</sub>	260
	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	900
	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	68
	Intravenosa	Coniglio	DL <sub>50</sub>	7.2
<b>Nitrato ferroso</b>	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	428
<b>Nitrato ferrico</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	3250
<b>Solfato ferroso</b>	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	278
	Endovenosa	Topo	DL <sub>50</sub>	81
	Endovenosa	Coniglio	DL <sub>100</sub>	99
	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	100
	Rettale	Ratto	DL <sub>100</sub>	1040
	Orale	Topo, ratto	DL <sub>50</sub>	1170-1480
	Orale	Ratto, coniglio	DL <sub>100</sub>	2130-2780
<b>Solfato ferrico</b>	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	1070
<b>Solfato di ammonio ferroso</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	3250
<b>Ferro carbonile</b>	Inalatoria	Topo	DL <sub>100</sub>	7*
<b>Acetato ferroso</b>	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	492
<b>Gluconato ferroso</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	4600

\* Esposizione per 4 h

#### *1.4.4.1. Tossicità acuta*

L'intossicazione acuta da ferro causa uno shock bifasico: ad un iniziale ma rapido aumento delle pulsazioni cardiache e del respiro, associati a congestione dei vasi sanguigni, segue ipotensione e pallore in 6-8 ore. A questo quadro si accompagna prostrazione, coma e infine morte per blocco cardiaco in 36 ore. (Venugopal e Luckey, 1978)

#### *1.4.4.2. Tossicità a lungo termine*

L'intossicazione cronica esita in necrosi emorragica del tratto digerente, epatotossicità, acidosi metabolica, aumento del tempo di coagulazione ematica e aumento dei livelli sierici di serotonina e istamina. Soluzioni diluite di sali di Fe possiedono moderato effetto astringente, ma elevate concentrazioni hanno effetto caustico che provoca ulcerazioni e gastrite necrotizzante nel tratto pilorico dello stomaco (Venugopal e Luckey, 1978).

L'assunzione con la dieta di quantità tossiche di ferro danneggia il fegato e la lesione si evidenzia con ittero, causato da aumento del livello sierico di bilirubina e inibizione dell'attività cellulare epatica; alcuni studi istochimici dell'attività enzimatica indicano un'inibizione della glucosio-6-fosfatasi, dell'acido succinico-deidrogenasi e di altri enzimi ossidativi (Witzleben e Chaffey, 1966).

#### *1.4.4.3. Effetti cancerogeni*

Alcuni composti del ferro sono riportati come cancerogeni. Somministrazioni parenterali di complessi di ferro destrano inducono tumori maligni nel sito di inoculazione nei ratti (Richmond, 1959; Haddow e Horning, 1960), così come l'inalazione ripetuta ed a lungo termine di vapori di ossido di ferro causa siderosi polmonare ed aumenta l'azione cancerogena di tossici organici come il benzopirene svolgendo l'azione di trasporto per le molecole suddette fino ai siti di accumulo, comportandosi, così, da cocancerogeno (Stokinger e Coffin, 1968; Saffiotti *et al.*, 1968).

#### *1.4.4.4. Effetti immunodepressivi*

Effetti immunosoppressivi sono determinati dall'accumulo del ferro nei lisosomi dei polimorfonucleati, a causa della sua affinità per le glicoproteine acide di questi organuli, per la lattoferrina (Baggiolini *et al.*, 1970) e per le proteine basiche (Zeya e Spitznagel, 1968); la captazione del ferro da parte di queste proteine distrugge il loro effetto battericida.

### 1.4.5. Impatto ambientale

Il ferro è uno degli elementi il cui ciclo biologico-chimico ha subito le maggiori modificazioni da parte delle attività umane; si stima che la quantità di metallo estratta ogni anno dalle miniere superi di 8 volte la quantità erosa dalle rocce per azione degli agenti atmosferici.

A livello della crosta terrestre, in funzione della concentrazione presente, lo troviamo come quarto elemento dopo silicio, ossigeno e alluminio. Rappresenta circa il 5% in peso di questa, presente in quasi tutti i minerali o rocce. È il metallo predominante nel nucleo terrestre (90%) e nei minerali più importanti da cui si estrae è in forma di ossidi (magnetite  $\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), solfuri (pirite  $\text{FeS}_2$ ) e carbonati (siderite  $\text{FeCO}_3$ ). Nelle acque, nei fiumi e nei laghi è contenuto in molecole di diametro di  $0,5\mu\text{m}$ , con il 50% di  $\text{Fe}^{2+}$  e il 50% di  $\text{Fe}^{3+}$ , o di composti colloidali insieme a fosfati.

Le concentrazioni in alcuni comparti ambientali e matrici biologiche sono le seguenti (Merian, 1991):

<b>Comparto ambientale</b>	<b>Concentrazione</b>
Suolo	0,7-4,2%
Acqua potabile	$\leq 0,3 \text{ mg/l}$
Oceano	0,01-0,14 mg/l
Fiumi	0,67 mg/l
Atmosfera	$0,9-1,2 \mu\text{m/m}^3$
Donne	38 mg/kg
Uomini	49 mg/kg

## 1.5.MERCURIO

Il mercurio e i suoi composti non posseggono alcuna funzione biologica o metabolica. La loro presenza nelle cellule degli organismi viventi rappresenta sempre una contaminazione che deve essere considerata come non desiderabile e potenzialmente pericolosa.(NAS, 1978).

La maggior degli autori concorda sui seguenti punti:

- 1) il mercurio e i suoi composti non hanno una funzione biologica;
- 2) forme di mercurio con una tossicità relativamente bassa possono essere trasformate in forme più tossiche, come il metilmercurio, attraverso processi biologici;
- 3) il mercurio può essere bioaccumulato e bioamplificato tramite la catena alimentare;
- 4) il mercurio è mutageno, teratogeno, carcinogeno e provoca alterazioni istopatologiche;
- 5) gli alti livelli di mercurio trovati in alcune specie di pesci e di selvaggina provenienti da luoghi non contaminanti dalle attività umane dimostrano la complessità dei cicli naturali del mercurio e l'influenza umana su questi cicli;
- 6) l'uso del mercurio da parte dell'uomo deve essere ridotto poiché la differenza fra i livelli basali tollerabili e i livelli con effetti ambientali pericolosi è estremamente piccola.( NAS, 1978; EPA, 1985; Jenkins, 1980; Boudou e Ribeyre, 1983; Elhassani, 1983; Robinson e Touvinen, 1984; Wren, 1986).

L'attuale uso di mercurio in tutto il mondo è stimato tra le 10000 e le 15000 tonnellate ogni anno.( Boudou e Ribeyre, 1983).

Viene usato come fungicida in agricoltura, come agente di controllo nell'industria della carta, nella produzione di apparecchi elettrici e di plastica (Nriagu, 1979; EPA, 1980).

La valutazione del rapporto tra le emissioni di mercurio naturali ed antropiche è abbastanza controversa, ma si può assumere che il valore sia di 1:2. Il calcolo è particolarmente complesso poiché, il mercurio che deriva dalle attività umane una volta depositato nell'ambiente (acqua, sedimenti, terreno,ecc.), può comunque in un secondo momento essere reimmesso nell'atmosfera, e sembrare così appartenente alle quote emesse naturalmente (Nriagu, 1979).

La conseguenza dell'aumento dell'uso del mercurio è un netto incremento del numero degli avvelenamenti con andamento epidemico riscontrato sia tra gli uomini che tra la selvaggina e gli organismi acquatici.

Il mercurio proveniente dalle sorgenti naturali entra nella biosfera come gas (principalmente come vapori di mercurio), rilasciato soprattutto dall'evaporazione della crosta terrestre (il minerale cinabro rappresenta la sua maggior risorsa naturale) e dei corpi oceanici (Das *et al.*, 1982; Kim e Fitzgerald, 1986).

L'emivita dei vapori di mercurio nell'atmosfera è relativamente breve (circa 11 giorni), mentre le sue forme di deposito presentano un'emivita di circa 1000 anni (Clarkson *et al.*, 1984).

### 1.5.1. Caratteristiche chimico-fisiche

Il mercurio è un metallo bianco argenteo, liquido a temperatura ambiente ed è altamente volatile.

Può presentarsi in tre stadi di ossidazione: elementare ( $\text{Hg}^0$ ), mercurioso ( $\text{Hg}^+$ ) e mercurico ( $\text{Hg}^{++}$ ), e può essere parte di composti sia organici che inorganici (EPA, 1980; Clarkson *et al.*, 1984).

Il mercurio può assumere diversi stati chimici, tre dei quali risultano essere particolarmente importanti per capirne il comportamento ambientale:

-*Mercurio metallico*: è liquido e volatilizza velocemente a temperatura ambiente; questa sua sublimabilità lo rende particolarmente pericoloso per gli effetti nocivi che è in grado di determinare. È scarsamente solubile in acqua ed è la forma più rappresentata nell'aria.

-*Mercurio inorganico bivalente*: è il tipo chimico che forma sali con diversi anioni; tali sali sono moderatamente solubili in acqua.

-*Metilmercurio*: è la forma organica di mercurio ecologicamente più importante. Il monometilmercurio è solubile in acqua ed è molto stabile grazie al legame covalente tra il mercurio ed il carbonio. Il dimetilmercurio è meno stabile e meno idrosolubile.

Tra i composti monovalenti quello tossicologicamente più rilevante è il cloruro mercurioso ( $\text{HgCl}$  o calomelano), mentre tra i bivalenti il più pericoloso è il cloruro mercurico ( $\text{HgCl}_2$  o sublimato corrosivo) (Lucisano, 1994).

I composti organici del mercurio formano un gruppo estremamente eterogeneo e sono dotati di potenzialità tossicologiche molto varie.

Gli alchilderivati, tra cui il più comune è il metilmercurio, sono i più pericolosi, mentre gli arilderivati ed i composti alcossilchilici sono caratterizzati da una tossicità relativamente inferiore (Jensen e Jernelov, 1972).

Il tipo chimico è probabilmente la maggiore variabile che influenza l'ecotossicologia del mercurio, ma la determinazione della forma responsabile dei vari casi di avvelenamento non è semplice (Boudou e Ribeyre, 1983). Infatti il

mercurio in soluzione può reagire con vari elementi e può anche essere organicato tramite processi biologici e chimici di metilazione che determinano l'aggiunta di uno o due gruppi metilici alla forma inorganica bivalente (Jensen e Jervelov, 1969; Ramamoorth e Blumhagen, 1984; Callister e Winfrey, 1986).

Detta trasformazione può avvenire in ambienti anaerobici principalmente ad opera di batteri solfo-riduttori, ma si assiste al processo anche in assenza di organismi viventi sebbene la metilazione puramente chimica contribuisca solo circa al 10% alla produzione totale del metilmercurio.

Il processo metilante è influenzato da numerosi fattori, tra cui particolare importanza acquista il valore del pH: in ambienti acidi infatti si osserva sia un aumento del mercurio rilasciato dai sedimenti (e quindi reso disponibile come substrato per la reazione), che della velocità di reazione.

Il metilmercurio è la specie più pericolosa a causa della sua alta stabilità, della sua solubilità nei grassi e delle sue qualità ioniche, che ne determinano la spiccata capacità di attraversare le membrane biologiche (Beijer e Jernelowv, 1979; Winfrey e Rudd, 1990).

L'aver scoperto la possibilità di metilazione delle forme inorganiche di mercurio ha reso evidente che qualsiasi forma di mercurio è altamente pericolosa per l'ambiente (EPA, 1985).

Negli organismi al vertice della catena alimentare, come i pesci carnivori, la maggior parte del mercurio è accumulato in forma metilata, principalmente come risultato del consumo di prede che contengono metilmercurio, ma in piccola parte anche per processi di metilazione che avvengono a livello mucosale ed intestinale (Boudou e Ribeyre, 1983)

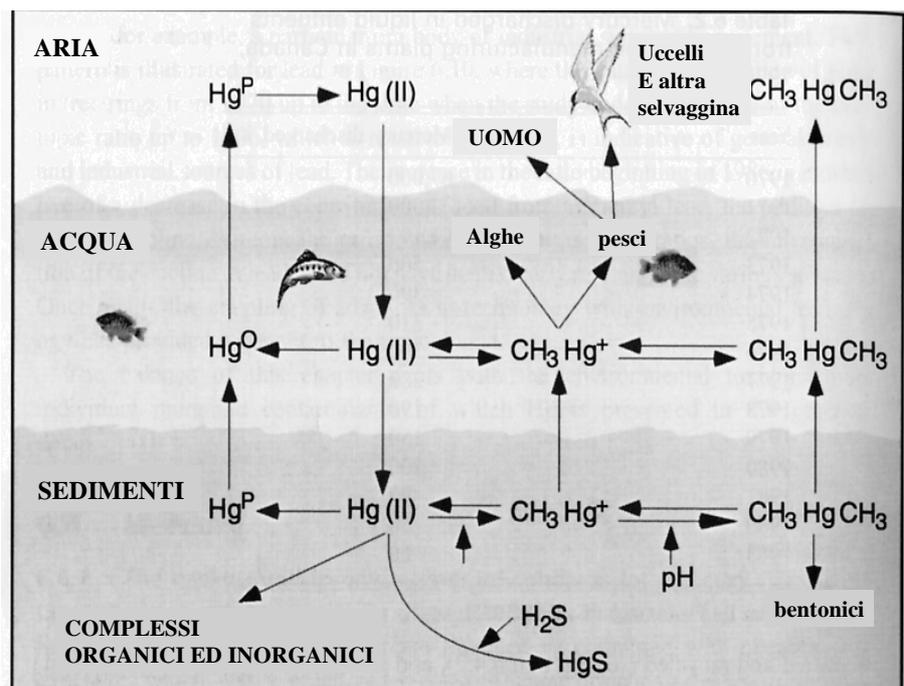


Fig.1.5.1 -Ciclo biogeochimico del mercurio (da Wright e Welbourn, 2002, modificata).

### 1.5.2. Comportamento cinetico

La principale via di assimilazione del mercurio è rappresentata dal tratto gastroenterico, ma notevole importanza rivestono anche la via respiratoria, transcutanea e mucosale (Elhassani, 1983; Greener e Kochen, 1983).

Il mercurio allo stato metallico risulta poco assorbibile dal tratto gastro-enterico, poiché è scarsamente reattivo con le macromolecole organiche, mentre il mercurio inorganico ed i fenilmercuriali sono suscettibili di un assorbimento intestinale variabile. L'assimilazione per questa stessa via del metilmercurio è praticamente totale, così come risulta essere notevole il suo assorbimento anche a livello cutaneo, mucosale e respiratorio (Lauwerys, 1982).

I vapori di mercurio sono estremamente pericolosi in quanto vengono assorbiti prontamente attraverso il polmone e generano fenomeni di tossicità acuta sistemica (Lauwerys, 1982; Lucisano, 1994).

I mercuriali organici sono dotati di maggior liposolubilità e perciò vengono assorbiti dal tratto gastro-enterico in misura maggiore rispetto ai sali inorganici (Klaassen, 1975).

Il mercurio elementare nel circolo ematico viene rapidamente trasformato in cationi mercurici bivalenti tramite ossidazione ad opera delle catalasi; in questa forma può così legarsi con le proteine tissutali e plasmatiche (Friberg e Nordberg, 1971; Clarkson, 1972).

La quota di mercurio che non subisce detta ossidazione a livello ematico attraversa la barriera emato-encefalica; nel tessuto cerebrale viene convertito in forma ionica e reagisce con le proteine qui presenti dando luogo a fenomeni di accumulo a questo livello.

I composti organici, invece, una volta arrivati nel torrente circolatorio si fissano ai globuli rossi, dove raggiungono concentrazioni anche 5 volte superiori a quelle plasmatiche (Swensson e Ulfarsson, 1963; Bakir *et al.*, 1976).

La distribuzione dei composti inorganici del mercurio tra i vari comparti e tessuti dell'organismo non risulta uniforme: le concentrazioni più elevate sono riscontrabili nel rene che li trattiene in misura maggiore e per un periodo di tempo più lungo rispetto a tutti gli altri organi (Lauwerys, 1982). Oltre che nel rene l'accumulo avviene anche, in ordine decrescente, in fegato, midollo osseo, milza, cute, muscoli, cervello e polmone.

L'escrezione del metallo, in forma di fenossialchilmercurio, è affidata in buona parte al rene, anche se la quota principale di eliminazione dei composti inorganici è quella che si ha attraverso le feci (Sabbioni e Manzo, 1980).

Particolare è l'eliminazione del metilmercurio, che avviene in tempi molto più lunghi rispetto agli altri composti. La spiegazione di questo fenomeno sta nell'esistenza di un circolo entero-epatico che interessa la frazione escreta con la bile. Tale circolo comporta un continuo riassorbimento intestinale del tossico, fino a quando non viene trasformato in mercurio inorganico. La lenta eliminazione del metilmercurio è dunque dovuta ai lunghi tempi richiesti per la trasformazione nella forma inorganica; infatti l'etilmercurio, che subisce tale trasformazione molto più rapidamente, viene anche eliminato più velocemente (Sabbioni e Manzo, 1980).

Il mercurio, a differenza di quanto si osserva per gli altri metalli, è in grado di provocare fenomeni di biomagnificazione, e il suo comportamento si dimostra particolarmente subdolo in quanto gli organismi ai livelli più bassi della catena alimentare sono quelli più resistenti ai suoi effetti tossici.

Così, ad esempio, si verifica che i pesci possano tollerare livelli di metilmercurio fino a 10 volte superiori a quelli sopportati dagli organismi superiori (Clarkson, 1995).

Se questo fatto può risultare positivo per la singola specie ittica, si capisce come, valutando la catena alimentare nella sua globalità, gli effetti dannosi siano moltiplicati, esponendo gli uccelli e l'uomo ad un rischio particolarmente alto.

Generalmente le concentrazioni di mercurio negli organismi campionati in luoghi non direttamente coinvolti da attività antropiche sono inferiori a 1 mg/Kg di peso

fresco. D'altronde questo livello viene notevolmente superato in animali e nella vegetazione di aree situate in vicinanza di impianti agricoli o industriali.

Negli uccelli è generalmente accettato che le concentrazioni di mercurio siano più alte nelle specie che si nutrono di pesci o di altri uccelli. I residui sono più alti nei reni, nel fegato e nel sistema nervoso centrale, ma il contenuto totale di mercurio è significativamente modificato proprio dal tipo di dieta della specie o dell'individuo. (Delbeke *et al.*, 1984).

Per esempio, le giovani oche mostrano livelli di mercurio più alti rispetto agli adulti, poichè le prime preferiscono nutrirsi di insetti, mentre gli adulti si cibano di tuberi acquatici. (Lindsay e Dimmick, 1983).

Le penne degli uccelli sono state usate per molto tempo come indicatori della contaminazione ambientale marina e terrestre da parte del mercurio. La cheratina, infatti, non è facilmente degradabile e il mercurio vi si lega in modo molto stabile tramite legami sulfidrilici (Applequist *et al.*, 1984)

### 1.5.3. Meccanismo d'azione

Tutti i composti del mercurio, inorganici ed organici, si comportano come veleni protoplasmatici, poiché esercitano la loro azione tossica bloccando l'attività di vari sistemi enzimatici, determinando precipitazione delle proteine ed agendo come corrosivi diretti.

Gli enzimi interessati dall'azione del mercurio sono quelli caratterizzati dalla presenza di gruppi sulfidrilici nella loro molecola, in quanto il metallo ha la capacità di sostituirsi all'atomo di idrogeno del gruppo -SH dando luogo alla formazione di mercaptidi  $X-Hg-SR$  o  $Hg(SR)_2$  (dove X rappresenta un radicale elettronegativo ed R una proteina) (Lucisano, 1994; Bottarelli, 1993)

Il mercurio è in grado di combinarsi, oltre che ai gruppi tiolici, anche ad altri gruppi funzionali, quali i fosforici, carbossilici, aminici e amidici, che risultano essere ugualmente importanti nel metabolismo cellulare.

### 1.5.4. Aspetti tossicologici

Le concentrazioni letali del mercurio variano da 2,2 a 31 mg/Kg di peso corporeo per gli uccelli e da 0,1 a 0,5 mg/Kg di peso corporeo per i mammiferi.

**Tab.1.5-** Valori di DL definiti per il mercurio a seguito di somministrazione per vie diverse in differenti specie animali (Venugopal e Luckey, 1978).

<b>Composto</b>	<b>Via di somministrazione</b>	<b>Specie</b>	<b>Tossicità</b>	<b>Dose (mg/kg o mg/m<sup>3</sup>*)</b>
<b>Mercurio</b>	Intraperitoneale	Ratto	DL <sub>50</sub>	400
	Inalatoria	Cane	DL <sub>100</sub>	15*
<b>Ossido mercurico</b>	Orale	Topo, Ratto	DL <sub>50</sub>	18-22
<b>Cloruro di mercurio</b>	Sottocutanea	Topo	DL <sub>50</sub>	23
	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	10
	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	14
	Intravenosa	Topo	DL <sub>50</sub>	7.6
	Intravenosa	Gatto	DL <sub>100</sub>	5
	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	37
	Orale	Cane	DL <sub>100</sub>	15
<b>Ioduro di mercurio</b>	Orale	Ratto, topo	DL <sub>50</sub>	40-80
	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	60
<b>Nitrato di mercurio</b>	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	4
<b>Solfato ferrico</b>	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	1070
<b>Solfato di mercurio</b>	Orale	Topo, ratto	DL <sub>50</sub>	40-57
<b>Cianuro di mercurio</b>	Orale	Topo	DL <sub>50</sub>	33
<b>Acetato mercurico</b>	orale	Topo, ratto	DL <sub>50</sub>	62-76
<b>Lattato mercurico</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	200
<b>Cloruro di metilmercurio</b>	Intraperitoneale	Ratto, cavia	DL <sub>50</sub>	7-11
	Orale	Cavia	DL <sub>50</sub>	21
<b>Cloruro di etilmercurio</b>	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	16
	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	30
<b>Cloruro di fenilmercurio</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	60
<b>Cloruro di butilmercurio</b>	Sottocutanea	Ratto	DL <sub>50</sub>	50
<b>Acetato di fenilmercurio</b>	Orale	Topo, ratto	DL <sub>50</sub>	26-50
	Orale	Ratto	DL <sub>100</sub>	70
	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>0</sub>	8
<b>Benzoato di clomercurio</b>	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	25

\* Esposizione per 4 h

#### *1.5.4.1. Tossicità acuta*

La forma di intossicazione acuta può conseguire o ad una singola dose letale, o a dosi sub-tossiche ripetute quando il tasso ematico di mercurio raggiunge 0,2mg/litro (Bottarelli, 1993).

I sintomi della forma acuta comprendono incoordinazione muscolare, letargia, arruffamento delle penne (negli uccelli), agitazione, abbassamento delle palpebre,

diarrea incoercibile, tachicardia, aumento della temperatura, dispnea e cianosi. La morte avviene per collasso cardiocircolatorio.

I soggetti che sopravvivono a questa fase presentano dopo circa 3 giorni stomatite e nefrite parenchimatosa.

La forma dovuta ad inalazione di vapori di mercurio è caratterizzata da irritazione delle vie aeree e da insorgenza di polmoniti associate ad edemi polmonari acuti.

In questi casi l'evoluzione dell'avvelenamento è infausta e generalmente si risolve con la morte dell'animale per shock ed insufficienza respiratoria entro 24 ore dalla somministrazione.

La tossicità del mercurio varia in funzione di fattori estrinseci, come la forma chimica dell'elemento, la dose o la via di somministrazione, e da fattori intrinseci, quali specie, sesso, età e condizioni fisiologiche dell'animale.

#### *1.5.4.2. Tossicità a lungo termine*

La forma di avvelenamento cronica si presenta se il mercurio viene assunto a dosi inferiori rispetto a quelle letali, circostanza in cui il metallo presenta un alto potenziale di bioaccumulazione e biomagnificazione.

Per le specie di uccelli sensibili sono pericolose dosi ripetute di 140  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  di peso corporeo di metilmercurio; per i mammiferi invece si possono notare sintomi ascrivibili a tossicità cronica con livelli nella dieta di 250  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  di peso corporeo assunti con la dieta (March *et al.*, 1983).

Gli effetti dannosi di queste dosi sub-letali si rendono evidenti nei processi di crescita e sviluppo, nella riproduzione, nel metabolismo, nel comportamento e nella chimica del sangue.

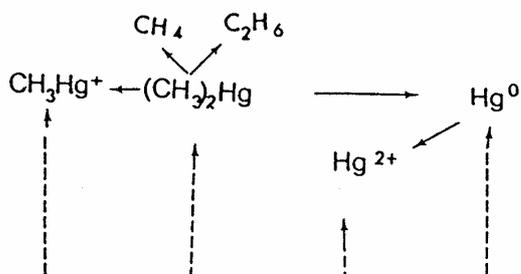
La sintomatologia ha una insorgenza lenta e subdola, caratterizzata da dimagrimento progressivo (cachessia mercuriale), linfonodi ingrossati e non dolenti, mucose anemiche con petecchie e tendenza ad emorragie capillari, disturbi della vista e dell'udito, disturbi locomotori con tremori, incoordinazione e paresi, deposizione di uova senza guscio e riduzione della cova.

#### *1.5.5. Impatto ambientale*

Come già accennato ad inizio capitolo l'utilizzazione industriale del mercurio in questi anni ha subito un notevole impulso dal momento che il metallo viene usato per molteplici scopi che vanno dall'industria chimica (preparazione elettrolitica di Cl e soda) a quella elettrica, a quella farmaceutica ed anche a quella agro-zootecnica. Una tale diffusione di impieghi porta a maggiori rischi di inquinamento

dell'ambiente. Il metallo, inoltre, può contaminare le acque per "fall out" di polveri provenienti dalla combustione del carbone e degli oli minerali (Lucisano, 1984).

Jerlonov (1969) ha studiato il ciclo biogeochimico del Hg e ha dimostrato che quest'elemento, sia come metallo che come composti organici, sedimenta in depositi acquatici e terrestri (Fig. 1.5.1. e 1.5.2.). Nei sedimenti acquatici e per azione di alcuni microrganismi bentonici, il mercurio può essere trasformato in composti inorganici o in composti organici (metil-mercurio e dimetil-mercurio). Il dimetilmercurio è un composto molto volatile e può evaporare dalle acque all'atmosfera, diffondendo la contaminazione anche a zone non immediatamente prossime alla sorgente di inquinamento. Il metilmercurio, invece, rimane nell'idrosfera e da qui passa nella catena alimentare, secondo linee tradizionali: fitoplancton, zooplancton, pesci predatori ed infine l'uomo (apice della catena nutrizionale). Quando piante e animali muoiono, l'Hg in essi contenuto viene restituito ai sedimenti da dove il ciclo può ricominciare.



**Fig. 1.5.2 : Ciclo del Mercurio**

E' stato calcolato che nell'ambito della catena alimentare, che si realizza nell'ambiente acquatico, il Hg può concentrarsi fino a 10000 volte (Lucisano, 1984).

Le concentrazioni in alcuni comparti ambientali e matrici biologiche sono le seguenti (Eisler, 1987):

Acqua di mare	<0,01 µg/L
Fiumi e laghi	0,01-0,05 µg/L
Sedimenti	
Area contaminata	0,1 – 746 mg/Kg
Area non contaminata	0,02 – 10 mg/Kg

## 1.6. PIOMBO

Il piombo è un elemento che può agire come veleno esplicando interferenza con svariati sistemi metabolici in particolar modo nelle forme di intossicazione ad andamento cronico e come agente mutageno, cancerogeno e teratogeno, mentre non esiste alcuna segnalazione, reperibile in letteratura, che ne indichi un ruolo fisiologico (Eisler, 1988).

Episodi di intossicazione cronica da piombo, o *saturnismo*, vengono riportati già dagli antichi Greci e dei medici arabi (2500 a.c.) ed i primi casi di encefalopatia da esposizione professionale risalgono al 400 a.c. circa (Barry e Mossman, 1970; Venugopal e Luckey, 1978).

Le concentrazioni medie di piombo presenti nella crosta terrestre sono piuttosto basse, pari a 15-16 mg/kg e il piombo si rinviene in numerosi minerali, come la galena (PbS), che rappresenta la fonte primaria di piombo allo stato naturale, l'anglesite (PbSO<sub>4</sub>) e la cerusite (PbCO<sub>3</sub>) (EPA, 1980).

Il piombo è pressoché ubiquitario ed è utilizzato in una grande varietà di prodotti (Ensley S., 2003)

Nell'ambito industriale il metallo e i suoi composti trovano impiego nella produzione di batterie in leghe con antimonio, stagno e rame, nell'allestimento di pigmenti per vernici e per l'industria ceramica; ancora è utilizzato nelle attività di smaltamento dei metalli, mentre è stato abbandonato il suo impiego come insetticida (arseniato di piombo), nella produzione delle plastiche (borato di piombo) e nella fusione dei caratteri di stampa. Il suo uso come piombo tetrametile e tetraetile, quale antidetonante nelle benzine può essere ricordato, tra gli altri, come fonte di inquinamento ambientale, anche se oggigiorno questa va rivestendo importanza sempre minore in ragione di una sua ridotta presenza nei carburanti (Venugopal e Luckey, 1978; Beretta, 1994; Eisler, 1988).

Il suo impiego nei pallini di piombo costituisce motivo di accumulo nelle aree aperte all'attività venatoria, ed in particolare nelle zone umide. L'abitudine, tipica di tutte le specie aviarie, di ingerire piccoli sassi per agevolare i processi digestivi nel ventriglio, può determinare nelle specie acquatiche un'ingestione involontaria dei pallini che, oggetto di corrosione a livello gastrico possono rendersi responsabili di massivo rilascio del metallo. Il fenomeno comporta un'elevata mortalità da saturnismo, che può colpire anche i rispettivi predatori, in quanto possono alimentarsi con gli esemplari defedati o deceduti a causa dell'intossicazione (Eisler, 1988).

### 1.6.1. Caratteristiche chimico-fisiche

Il piombo, di colore grigio-bluastro, presenta peso atomico 207.19, un punto di fusione di 327.5°C e di ebollizione di 1749 °C. E' fundamentalmente reperibile in forma bivalente e tetravalente, tra queste la prima è più stabile, mentre dalla seconda possono originare composti organici (Eisler, 1988).

I suoi composti presentano una diversa idrosolubilità, molto elevata in alcuni, quali ad esempio l'acetato, il nitrato e il cloruro, mentre in altri, come i solfati, gli ossidi e i solfiti, si è dimostrata essere piuttosto scarsa.

Elevata risulta l'affinità del metallo per i ligandi tiolici, i gruppi carbossilici ed i fosfati presenti in molecole biologiche complesse e nelle membrane e con i nucleosidi, in particolare la citidina, forma complessi stabili (Venugopal e Luckey, 1978).

### 1.6.2. Comportamento cinetico

Per l'uomo e gli animali, la principale via di assorbimento, attraverso la quale si realizzano la maggiorparte delle intossicazioni, è rappresentata dall'apparato gastroenterico, nonostante l'assorbimento per tale via risulti lento ed incompleto (1-2% secondo Marcato, 2002), limitazione dell'assorbimento in gran parte dovuta alla formazione di composti insolubili nell'intestino. E' proprio delle forme idrosolubili e dell'acetato di piombo ed è favorito da stati carenziali di ferro e calcio e da diete acide, in quanto l'acidità promuove la dissoluzione del piombo. Tutto questo indipendentemente dal dosaggio, con la sola eccezione dell'uomo, nel quale un suo incremento può comportare un'accentuazione della quota assorbita, che può giungere fino ad un 7%, quando invece il fenomeno opposto sembra verificarsi nel ratto (Hursh e Suomela, 1968; Skerfving, 1988).

Sempre nel ratto, i risultati degli studi condotti da Forbes e Reina (1972) dimostrano come il fenomeno dell'assorbimento del piombo possa risultare, da un punto di vista quantitativo, influenzato dall'età dell'animale: la quota assorbita aumenta infatti nei giovani fino al momento dello svezzamento, per poi attestarsi sugli stessi valori rilevati nell'adulto e in questo comportamento il piombo sembra presentare un andamento analogo a quello che caratterizza calcio e stronzio (Taylor et al., 1962).

L'assorbimento del piombo risulta altresì influenzato dall'attività peristaltica che, quando di entità elevata, si rivelano in grado di ridurre il fenomeno, che subisce viceversa un incremento ad opera della vitamina D (Skerfving, 1988).

Ancora, negli Anatidi, la quantità di piombo assorbito è dipendente dalla dose, dall'età, dal sesso (maggiore nei maschi rispetto alle femmine) e dal tipo di alimentazione. Esperimenti condotti su Germani Reali dimostrano che la quantità di piombo assorbita dipende dall'attività ventricolare e dalla presenza di sostanze abrasive in grado di aumentare la quota di piombo liberata a questo livello (Sanderson, 2000).

L'assorbimento per via inalatoria interessa soprattutto i lavoratori dell'industria dove il Pb si trova sottoforma di polveri o fumi (Skerfving, 1988).

In sede broncopolmonare l'assorbimento del metallo pare notevolmente influenzato dalle dimensioni delle particelle inalate. Infatti, mentre le particelle di diametro superiore ai 5  $\mu\text{m}$  si depositano nelle prime vie aeree con successivo allontanamento ad opera del sistema mucociliare, che ne comporta un possibile passaggio nel tratto gastrointestinale e assorbimento per via orale, quelle di dimensioni inferiori raggiungono gli alveoli a livello dei quali vanno incontro ad assorbimento piuttosto rapido che si completa nell'arco delle prime 24 h dopo l'esposizione (Hursh e Suomela, 1968; Booker et al., 1969; Hursh e Mercer, 1970; Morrow et al., 1980; Chamberlain, 1985; Skerfving, 1988).

Infine, la somministrazione parenterale di sali di piombo è stata dimostrata, da indagini sperimentali, essere in un loro parziale assorbimento, a causa della persistenza che presentano nella sede di iniezione (Choie e Richter, 1972).

Una volta assorbito il piombo si riversa nel torrente circolatorio, proveniente anche dal circolo linfatico, inizialmente a livello plasmatico per poi penetrare rapidamente negli eritrociti, a questo livello si lega all'emoglobina e ad altri componenti cellulari, per una quota che all'equilibrio ammonta al 99% (Raghavan et al., 1980).

La distribuzione tessutale del metallo è pari, inizialmente, grazie alla frazione plasmatica libera, ad un 60% nel tessuto osseo, ad un 25% in quello epatico e ad un 4% nel rene; successivamente, invece, la quantità di piombo nelle ossa ammonta al 90%, questo dimostra che la distribuzione iniziale è oggetto di una successiva ridistribuzione verso il tessuto osseo; si tratta del cosiddetto "steady state level".

Va sottolineato, nel considerare la distribuzione organica del piombo, che questo elemento si dimostra capace di attraversare la barriera placentare, raggiungendo, nel feto, concentrazioni ematiche e tessutali uguali a quelle della madre (Horiuchi et al., 1959; Barltrop, 1969).

Le principali vie d'escrezione del metallo sono quelle urinaria e fecale.

L'aliquota di metallo filtrata a livello glomerulare od escreta per trasporto transtubulare costituisce la quota presente nelle urine e la sua entità sembra dipendere, seppure non proporzionalmente, dalla sua concentrazione plasmatica

(Tola et al., 1973; Schutz e Skerfving, 1976; Vander et al., 1977; Manton e Cook, 1984; Skerfving et al., 1985; Goyer, 1996).

Nelle feci, invece, è reperibile un'aliquota costituita sia dalla frazione di piombo non assorbita che da quella eliminata con la bile quest'ultima sembra poter rappresentare, sulla base dei risultati conseguiti dopo somministrazione endovenosa di piccole quantità di piombo, circa un 80% della dose (Venugopal e Luckey, 1978). Il piombo tetraetile (TEL), grazie alla sua liposolubilità ed alla sua elevata diffusibilità, presenta un rapido assorbimento gastroenterico, respiratorio e cutaneo. Il composto, nell'organismo, viene in piccola parte metabolizzato, con rilascio del metallo e successivo accumulo nei tessuti molli, mentre, come tale, si accumula prevalentemente nel tessuto cerebrale, dato l'elevato tenore di lipidi di questa struttura (Venugopal e Luckey, 1978).

### 1.6.3. Meccanismo d'azione

Il piombo, come già accennato precedentemente, lega fortemente i gruppi tiolici (SH), fosforici (PO<sub>4</sub>) e carbossilici (COOH) di numerosi ligandi di natura proteica ed in particolare degli enzimi presenti nei globuli rossi, con conseguenti alterazioni funzionali e strutturali.

Il legame alle proteine eritrocitarie comporta infatti un aumento di fragilità osmotica dei globuli, in seguito ad un'alterata permeabilità di membrana e di un blocco dell'ATPasi Na/K, queste portano non tanto ad una vera e propria alterazione del metabolismo cellulare, quanto, piuttosto, a decrementi delle dimensioni globulari, per perdita di potassio ed acqua (Bishop e Surgerer, 1964; Lessler e Walters, 1973; Venugopal e Luckey, 1978).

L'azione inibente l'attività di enzimi interessati alla sintesi dell'eme, quali la deidratasi dell'acido  $\delta$ -aminolevulinico (ALAD), la coproporfirinogeno decarbossilasi e la ferrochelatasi (eme sintetasi), che caratterizzano rispettivamente la trasformazione dell'acido  $\delta$ -aminolevulinico in porfobilinogeno, del coproporfirinogeno in protoporfirina e di quest'ultima in eme, rinforza l'influenza espletata dal piombo sulla crisi ematica. L'accumulo plasmatico di acido  $\delta$ -aminolevulinico e di coproporfirina, con conseguente loro escrezione urinaria, nonché l'incremento del contenuto eritrocitario di protoporfirina sono le conseguenze di questa attività (Waldron, 1966; Skerfving, 1988). Un decremento a carico dell'attività della ALAD, che può risultare anche del 90%, associato ad una stimolazione della sintetasi dell'acido  $\delta$ -aminolevulinico, con conseguente suo incremento plasmatico, rappresentano un rilievo caratteristico in corso di intossicazione (Kao e Forbes, 1973).

Particolare importanza riveste, per le specie aviarie, l'azione inibente esercitata dal piombo a carico dell'attività della ALAD; in queste specie si riscontra, infatti, una maggiore attività enzimatica degli eritrociti nucleati, una più elevata richiesta di porfirine per la sintesi di eme-enzimi respiratori ed una minor emivita dei globuli rossi (pari a circa 1/3 di quella degli eritrociti umani) (Dieter, 1979).

Il piombo risulta in grado, probabilmente a causa di una riduzione della concentrazione extracellulare di calcio e di un peggioramento della captazione della dopamina e dell'attività dell'acido  $\delta$ -aminobutirrico, di inibire la funzione colinergica, inducendo così scompensi nella trasmissione neuronale degli impulsi (Rossow et al., 1987).

Gli studi condotti da Markovac e Goldstein (1988) hanno dimostrato che il metallo è in grado di sostituirsi al calcio nell'attivazione della proteinchinasi C, mentre gli studi condotti su soggetti umani delineano una riduzione delle concentrazioni di eme, responsabile di un'inibizione della triptofano pirrolasi, con conseguente aumento dei livelli di triptofano, serotonina e acido 5-idrossiindolacetico, il che spiega la neurotossicità del metallo (Goyer, 1996).

Gli studi eseguiti nell'uomo e in animali da laboratorio delineano, al proposito, come il cervello fetale o quello di soggetti giovani sia estremamente più sensibile rispetto all'adulto, in quanto le cellule endoteliali immature che formano i capillari della barriera emato-encefalica del cervello in via di sviluppo presentano una maggior sensibilità agli effetti lesivi del metallo il quale, a seguito anche della minor efficacia della barriera stessa, può raggiungere le cellule cerebrali in formazione in quantità più elevate, ed indurre pertanto danni più rilevanti (Goyer, 1996).

#### 1.6.4. Aspetti tossicologici

La tossicità del piombo è nota da lunghissimo tempo e l'importanza tossicologica del metallo, a differenza di quanto riscontrato in passato, oggi giorno va riguardata prevalentemente da un punto di vista a lungo termine (tab. 1.6).

La composizione della dieta viene segnalata tra i fattori che possono modificare il comportamento tossicologico del piombo, infatti, quote elevate di proteine, di vitamina D, di acido ascorbico e nicotinico, di calcio e di fosfati risultano in grado di diminuire la sensibilità degli animali alle intossicazioni, al contrario, bassi tenori di ferro e calcio favoriscono la mobilitazione del metallo e carenze di vitamina E si dimostrano in grado di potenziarne l'effetto emolitico (Levander et al., 1975; Venugopal e Luckey, 1978).

Nella tabella 1.6 sono riportati i valori di DL per il piombo.

**Tab. 1.6-** Valori di DL definiti per il piombo a seguito di somministrazione per vie diverse in differenti specie animali (Venugopal e Luckey, 1978).

<b>Composto</b>	<b>Via di somministrazione</b>	<b>Specie</b>	<b>Tossicità</b>	<b>Dose (mg/kg o mg/m<sup>3*</sup>)</b>
<b>Piombo metallico</b>	intraperitoneale	Ratto	DL <sub>100</sub>	1000
<b>Monossido di piombo</b>	Intraperitoneale	Ratto	DL <sub>50</sub>	400
<b>Clouro di piombo</b>	Orale	Cavia	DL <sub>50</sub>	2000
<b>Solfato di piombo</b>	Intraperitoneale	Cavia	DL <sub>50</sub>	300
<b>Arseniato di piombo</b>	Orale	Ratto, coniglio	DL <sub>50</sub>	100-125
<b>Acetato di piombo</b>	Intraperitoneale	Topo, ratto	DL <sub>50</sub>	140-150
	Endovenosa	Ratto, coniglio, cane	DL <sub>50</sub>	58-350
<b>Lattato di piombo</b>	Orale	Cavia	DL <sub>50</sub>	3000
<b>Piombo tetractile</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	35

#### *1.6.4.1. Tossicità acuta*

La sintomatologia che caratterizza l'intossicazione acuta da piombo nei mammiferi è la risultante degli interessamenti espliciti a carico del sistema nervoso centrale, gastroenterico e muscolo-scheletrico. A carico del primo si rilevano: alterazioni comportamentali, deambulazione incoordinata, crisi convulsiformi con manifestazioni di pseudo-cecità, alternate a fasi stuporose con prostrazione profonda, coma e morte. I principali riscontri connessi con le azioni lesive esplicate a livello gastroenterico sono, invece, anoressia, vomito, diarrea o costipazione, dolori colici e melena. Infine mioclonie e tremori muscolari rappresentano sostanzialmente le conseguenze dell'interessamento muscolo-scheletrico (Beretta, 1994).

Alla precedente sintomatologia si associa, relativamente alle specie aviarie, alterazione dell'equilibrio e della percezione e blocco dell'attività motoria gastrica, con stasi dell'alimento.

#### *1.6.4.2. Tossicità a lungo termine*

Il quadro dell'intossicazione cronica è essenzialmente caratterizzato da una riduzione operata a carico dell'attività di vari organi, dell'accrescimento e della durata della vita, nonché da alterazione della funzione renale, riproduttiva, del sistema emopoietico e dell'attività cerebrale.

Gli effetti sul rene conseguenti ad esposizioni a lungo termine (Goyer e Clarkson, 2001) si manifestano sottoforma di una nefropatia irreversibile, quando invece il disturbo causato da una esposizione acuta, riscontrato soprattutto in soggetti giovani, è di tipo reversibile.

Clinicamente si manifesta una sindrome tipo Fanconi accompagnata da proteinuria, ematuria e cilindruria. La nefropatia da piombo è accompagnata inoltre, più frequentemente di quanto succede in altre disfunzioni renali croniche, da iperuricemia e gotta.

A carico della funzionalità renale si rilevano, inoltre, fenomeni nefritici e aminoaciduria, glicosuria e fosfaturia possono essere rilevate già per concentrazioni ematiche pari a 1.5 ppm. Indagini condotte al proposito delineano danni strutturali nei mitocondri che esitano in un alterato utilizzo dell'energia con aumentato consumo di ossigeno per una riduzione dei livelli di citocromo nelle cellule renali (Goyer, 1968; Cardona et al., 1971; Rhyne e Goyer, 1971).

I riscontri autoptici mettono in evidenza erosione e riduzione del tessuto renale. La nefropatia da piombo è caratterizzata, istologicamente, da tipiche inclusioni nucleari nelle cellule circostanti il tubulo prossimale, costituite da complessi

piombo-proteina che compaiono precocemente e che si dissolvono dopo terapia con agenti chelanti, imputabili, quindi, al meccanismo detossificante del metallo (Choie e Richter, 1972, Venugopal e Luckey, 1978).

Rispetto agli effetti che si realizzano a carico del sistema emopoietico a seguito di esposizioni a lungo termine, l'anemia viene ritenuta effetto tossico meno grave, soprattutto qualora se ne consideri la reversibilità. Alterata produzione di emoglobina, stimolazione dell'eritropoiesi nel midollo osseo con ritardo nella maturazione dei globuli rossi, alterazioni morfologiche a carico delle cellule del midollo e conseguente incremento delle cellule basofile con anomalie nucleari e degli eritrociti anormali circolanti rappresentano le conseguenze determinate dal piombo a livello emopoietico (de Bruin, 1971; Arean, 1974).

Infine, l'azione del piombo a carico del sistema nervoso determina demielinizzazione e degenerazione assonale, alla quale si associano alterata permeabilità vasale con edema cerebrale, essudazione sierosa ed alterazione del metabolismo energetico delle cellule. Il nucleo striato, i lobi occipitali, il midollo spinale e i nervi motori e sensoriali risultano particolarmente interessati (Venugopal e Luckey, 1978).

Il piombo a livello osseo può sostituirsi al calcio da parte comportando una demineralizzazione particolarmente evidente a carico della mandibola, fenomeno al quale viene attribuita la responsabilità della perdita prematura dei denti, come si osserva nel ratto intossicato (Koelsch, 1959).

#### *1.6.4.3 Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi*

Il piombo si dimostra in grado di alterare la funzionalità riproduttiva di entrambi i sessi e di esercitare importanti effetti teratogeni e sullo sviluppo neurale della prole. I risultati degli studi condotti in ratti alimentati per un mese con diete contenenti 100 µg/kg di metallo delineano, in particolare, impotenza, iperplasia prostatica e riduzione della secrezione dell'organo (Fahim et al., 1972), che Choie e Richter (1972) ascrivono ad una stimolazione della sintesi di DNA. Nel ratto maschio, livelli ematici di piombo pari a 50 µg/100 ml inducono inibizione della spermatogenesi per danni testicolari, mentre nella femmina si osserva irregolarità estrale con estro vaginale persistente con successiva comparsa di cisti ovariche e riduzione dei corpi lutei (Hilderbrand et al., 1972).

In seguito ad una esposizione a dosaggi elevati di metallo, in ratte gravide si osservano un incremento dell'incidenza di riassorbimenti, decrementi ponderali della prole alla nascita, aumento della mortalità perinatale e alterazioni nello sviluppo dei piccoli, effetti che si dimostrano più accentuati negli esemplari di sesso maschile rispetto alle femmine (Rom, 1976).

La somministrazione di piombo a ratte gravide comporta un prolungamento delle cure parentali ed un ritardo nello sviluppo del comportamento esplorativo nella prole (Barrett e Livesey, 1983).

Va inoltre ricordato che precedenti osservazioni hanno dimostrato come diete contenenti il 10% di  $PbCO_3$  possano indurre nella prole paraplegia degli arti posteriori che si rende evidente 20 giorni dopo la nascita (Lampert et al., 1967). 2 anni dopo il trattamento nella prole di scimmie trattate quotidianamente con 0.1 mg/kg di piombo o con diete contenenti 0.5 mg/kg di metallo si rendono evidenti alterazioni dell'apprendimento e comportamenti sociali anormali (Eisler, 1988).

#### *1.6.4.4. Effetti mutageni*

Il piombo, in ragione dei riscontri relativi alla sua capacità di indurre aberrazioni cromosomiche in linfociti umani, viene riguardato come potenziale mutageno, tale affermazione, tuttavia, non trova convalida in risultati di analoghe indagini condotte con modelli animali o batterici (Barth et al., 1973; Forni et al., 1976).

#### *1.6.4.5. Effetti cancerogeni*

In seguito ai risultati ottenuti con prove sperimentali su animali di specie diversa, i composti inorganici del piombo sono stati classificati nel gruppo 2B della IARC (1987), mentre gli inorganici nel gruppo 3. Gli studi effettuati sul ratto, infatti, evidenziano come una presenza di acetato basico di piombo nella loro dieta induca l'insorgere di neoplasie maligne renali in questa specie, così come iniezioni per via parenterale di solfato di piombo insolubile esitano nella comparsa di adenomi e carcinomi dello stesso organo (Zollinger, 1953; Boyland et al., 1962; Silbergeld et al., 2000).

L'induzione da piombo dell'adenocarcinoma renale nei ratti e nei topi dipende dalla dose e non è stata osservata a livelli inferiori a quelli che causano nefrotossicità (EPA, 1980).

La patogenesi dei tumori renali dovuti al piombo può essere associata ad un effetto diretto sulle cellule tubulari, ma può anche essere una risposta non specifica all'iperplasia epiteliale, come è stato osservato in altri tipi di nefropatie indotte sperimentalmente ed in disturbi che colpiscono gli uomini, caratterizzate da cisti ed iperplasia tubulari (Bernstein et al., 1987).

In questi anni, sebbene non sia ancora stato possibile dimostrarla, molte sono state, le ricerche sulla correlazione tra l'esposizione al piombo ed i tumori maligni nell'uomo,

Dingwall-Fordyce e Lane, nel 1963, effettuarono uno studio su alcuni lavoratori inglesi esposti al piombo ma non dimostrarono alcun aumento dell'incidenza del cancro in tali soggetti.

Nel 1975 negli USA, Cooper e Gaffey, rilevarono che tra le cause di morte di 7000 uomini esposti al piombo per lavoro, l'incidenza di tumore all'apparato respiratorio od al sistema digerente, ma non al rene, era lievemente superiore.

Nel 1980 Baker et al. e nel 1981 Lillis, si dedicarono allo studio di alcuni casi di adenocarcinoma renale in soggetti che avevano lavorato per lungo tempo a contatto col piombo senza però riuscire a dimostrare l'esistenza di alcuna correlazione tra queste neoplasie e l'esposizione al metallo.

L'ipotesi formulata da Silbergeld et al. nel 2000, prevede che il piombo o arrechi un danno diretto al DNA o agisca inibendo la sintesi o la riparazione dello stesso. Inoltre il piombo potrebbe, sempre secondo gli stessi autori, reagire con l'ossigeno causando danni ossidativi al DNA.

Dati recenti indicano che il piombo potrebbe sostituirsi allo zinco in molte proteine che fungono da regolatori trascrizionali, riducendo i legami di queste proteine negli elementi di ricognizione del DNA cosa, questa, che suggerisce un coinvolgimento del piombo nell'espressione genica alterata

#### *1.6.4.6. Effetti immunodepressivi*

Piuttosto controversa, risulta l'attività del piombo sulle risposte immunitarie di tipo umorale, infatti ai rilievi di Koller e Kovacic (1974) e di Luster et al. (1978) circa un'azione depressiva riscontrata nel topo e nel ratto si contrappongono le acquisizioni di Lawrence (1981) e di Koller e Roan (1977), che, a seguito di somministrazione orale di piombo nel topo, non registrano alcun cambiamento nella risposta immunitaria.

I risultati di delle indagini *in vivo* condotte con differenti sali di piombo e finalizzate a delineare l'effetto del piombo sulla risposta di ipersensibilità ritardata paiono contrastare quelli degli studi *in vitro* (Lawrence, 1981) che delineano un incremento della proliferazione linfocitaria a seguito di stimolazione con mitogeni o in colture miste di linfociti. Questo tipo di immunità risulta infatti depressa ad opera del cloruro od acetato di piombo, mentre un effetto contrario caratterizza gli ossidi, i nitrati e i carbonati (Müller et al., 1977; Descotes et al., 1984, Laschi-Loquerie et al., 1984).

Anche l'azione del piombo sulla risposta non specifica e sulla resistenza ai patogeni è caratterizzata da una pari discrepanza di risultati: a fronte di una stimolazione della fagocitosi quale rilevata con somministrazioni singole o ripetute di metallo a bassi dosaggi, un loro incremento ne determina invece un'azione depressiva. Allo

stesso modo un'esposizione al metallo diminuisce la resistenza degli animali a numerosi patogeni, dato, questo, che è in netta contrapposizione al rilievo che la somministrazione di piombo immediatamente prima della stimolazione con *Klebsiella pneumoniae* aumenti la refrattarietà all'infezione (Koller e Roan 1977; Schlick e Friedberg, 1981; Tam e Hindschill, 1984; Laschi-Loquerie et al., 1987).

#### 1.6.5. Impatto ambientale

Nell'ambiente si rilevano concentrazioni di piombo molto più elevate nei sedimenti (47 mg/kg), nel suolo (16 mg/kg) e nelle acque interstiziali dei primi (36 µg/kg) rispetto a quelle riscontrabili nell'atmosfera e nelle acque libere, per cui i sedimenti devono essere riguardati come i più importanti depositi ambientali (Eisler, 1988).

Nelle acque, dove il metallo può pervenire a seguito del dilavamento dei suoli o delle piante, oltre che per un inquinamento diretto, la presenza del piombo, ne comporta una rapida precipitazione sotto forma di carbonati o idrossidi e come chelati con anioni diversi. Quando la corrente dell'acqua è lenta, l'entità di questa presenza raggiunge valori superiori, mentre un flusso elevato comporta un aumento di concentrazioni del metallo nel particolato o in forma libera (Bogges, 1977; May e McKinney, 1981; Benes et al., 1985; White e Driscoll, 1985).

Il rilascio del metallo dai sedimenti è favorito da un'acidità delle acque e dalla loro composizione ionica, mentre una temperatura elevata, un pH basso e una presenza di attività microbiche agevolano la sua organizzazione che si rende responsabile di un'alchilazione che investe non più del 10% del piombo presente e non sembra dipendere dalla concentrazione del metallo (Chau et al., 1980, May e McKinney, 1981; Demayo et al., 1982).

In ambiente acquatico, pur in assenza di fenomeni di biomagnificazione, i livelli maggiori di piombo si riscontrano nelle alghe e negli organismi bentonici, così come, i più elevati riscontri del metallo in tutte le specie animali, si rilevano nei soggetti ad habitat nelle aree maggiormente inquinate: a titolo esemplificativo valga la presenza in pesci di aree fortemente contaminate del Big River di livelli tessutali di metallo superiori a quello che viene normalmente considerato un valore già tossico per l'uomo e pari a 0.3 mg/kg (Schmitt et al., 1984).

I risultati acquisiti da Birdsall et al. (1986) in merito alle correlazioni esistenti fra livelli di piombo nei sedimenti e le concentrazioni tessutali riscontrate in girini, vanno riguardati nella stessa ottica; essi dimostrano come questi organismi presentino livelli di metallo già tossici per diverse specie che utilizzano questi animali come fonte alimentare.

La comparsa di quadri tossici da piombo nelle specie aviarie selvatiche, per quanto spesso sottovalutata perché di difficile rilevamento, può rivelarsi di estrema importanza dal punto di vista ecologico. Al proposito va segnalato come la stima eseguita da Mudge (1983) per quanto concerne gli esiti letali conseguenti all'ingestione di pallini di piombo definisca in 8.000 gli esemplari deceduti in Inghilterra, mentre Wobeser (1981) valuta in 2.400.000 quelli morti sull'intero globo terrestre. Inoltre, tra le specie aviarie, i cigni risultano gli animali più sensibili all'intossicazione da piombo, quest'ultima investe anche numerosi predatori, che possono andare incontro a fenomeni tossici dopo ingestione di animali defedati o morti per intossicazione (Eisler, 1988).

## 1.7.RAME

Il rame è un elemento ampiamente rappresentato in natura, presente tanto nel suolo e nelle acque, quanto negli organismi viventi, siano essi vegetali o animali.

Conosciuto fin dalla preistoria, si ritrova allo stato puro (“rame nativo”) ma soprattutto sotto forma di vari minerali, principalmente solfuri (calcosina  $\text{Cu}_2\text{S}$ , calcopirite  $\text{Cu}_2\text{FeS}_2$ ), cuprite  $\text{Cu}_2\text{O}$ , malachite e azzurrite che sono carbonati basici.

Fra le numerose applicazioni del rame si ricorda l'utilizzazione per quel che riguarda le condutture elettriche, per la produzione di leghe come bronzo (rame e stagno) e gli ottoni (rame e zinco), per la fabbricazione di apparecchi chimici. I suoi sali vengono tuttora adoperati come antifungini, insetticidi, algicidi, rodenticidi; se ne ricorda, inoltre, il suo uso in medicina veterinaria come additivo nelle diete e come emetico, in forma di solfato di rame.

### 1.7.1. Caratteristiche chimico-fisiche

Il rame appartiene al gruppo I, sottogruppo IB della tavola periodica degli elementi. Possiede numero atomico 29, peso atomico 63,546, punto di fusione  $1083^\circ\text{C}$ , di ebollizione  $2595^\circ\text{C}$ , densità  $8,96 \text{ g/cm}^3$ ; si presenta come un reticolo cristallino cubico a facce centrate.

Esibisce numero di ossidazione +1, +2 o +3; in soluzioni estremamente diluite è più stabile lo ione monovalente del bivalente, per soluzioni più concentrate il rame +1 tende ad ossidarsi quasi completamente a rame +2. Condizioni di acidità, come le piogge acide, facilitano la solubilizzazione del metallo dalle rocce, mentre l'alcalinità lo fa precipitare e lo rende non disponibile; questo è da tener in considerazione ai fini dell'inquinamento ambientale e di eventuali intossicazioni. Nonostante sia meno presente in composti enzimatici organici rispetto a ferro e zinco, può lo stesso formare complessi con ligandi contenenti P e N con un numero di coordinazione 4. La capacità legante le proteine del rame è elevata e conferisce stabilità alla conformazione delle proteine stesse (Venugopal e Luckey, 1978).

### 1.7.2. Comportamento cinetico

Il rame presente nel suolo, complessato in colloidali o insieme a composti del ferro, viene facilmente assorbito dalle piante e accumulato nelle radici o nelle pareti cellulari, e questo lo rende abbastanza biodisponibile agli animali.

L'assorbimento del metallo avviene attraverso la mucosa dello stomaco, del duodeno e del digiuno (Van Campen, 1971; Decker *et al.*, 1972); di tutto il rame

assunto, solo il 30% viene assorbito e, di questo, il 5% è trattenuto nell'organismo, la restante parte viene escreta con la bile o le urine. L'assorbimento viene influenzato da numerosi fattori, comprese le caratteristiche dei composti contenenti l'elemento: ossidi, idrossidi, ioduri, glutammati, citrati e pirofosfati passano velocemente in circolo, mentre solfuri e sali insolubili sono assorbiti in minima parte. La presenza di molibdeno, zinco, ferro, cadmio e argento, così come un elevato apporto proteico nella dieta ne inibiscono l'assorbimento.

Il rame forma complessi con gli amminoacidi presenti nel lume intestinale e, in questo modo, attraversa la mucosa rapidamente con un meccanismo di trasporto attivo.

Si riscontra anche un assorbimento, seppur in minima parte, attraverso la cute e in seguito a inalazione; secondo quest'ultima modalità l'assorbimento avviene gradualmente e parte del rame inalato permane temporaneamente nel polmone.

In circolo il rame viene sequestrato dagli eritrociti, dove viene utilizzato per la sintesi di eritrocupreina; un'altra porzione del metallo assorbito si lega a una  $\alpha$ -globulina, detta ceruloplasmina, sintetizzata dal fegato, e alle albumine, tramite le quali perviene ai tessuti molli. Fegato, rene e cervello trattengono la maggior parte del rame, sebbene il tessuto muscolare possa contenere circa il 35% del metallo corporeo totale. In questi tessuti il rame si complessa con proteine enzimatiche (cuproenzimi) che vanno sotto il nome epatocupreina e cerebrocupreina, che sono, in pratica, metallotioneine e superossido-dismutasi (Evans, 1973; Venugopal e Luckey, 1978; Brewer, 1987).

L'escrezione di questo metallo avviene prevalentemente per via biliare; solo un 2-4% è eliminato con le urine ed ancor meno con il sudore (Venugopal e Luckey, 1978).

### 1.7.3. Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico

Negli organismi animali, come già detto, il rame è presente in concentrazioni inferiori rispetto a ferro e zinco; possiede limitate, ma essenziali, funzioni biologiche ed è meno diffuso nei sistemi enzimatici.

Il rame è coinvolto direttamente nell'emopoiesi, nel metabolismo del tessuto connettivo, nella formazione della mielina dei neonati, nella sintesi dei pigmenti e nell'osteogenesi. Inoltre, presentando più stati d'ossidazione, è impiegato nei processi respiratori, entrando a far parte delle citocromoossidasi, particolarmente concentrate nei muscoli e necessarie per il trasporto degli elettroni nei mitocondri, e nell'emocianina; altri cuproenzimi sono le tirosinasi, le monoamminoossidasi, le dopaminoidrossilasi.

Altre funzioni biologiche di questo metallo sono implicate nell'immunità cellulo-mediata e nel metabolismo dei radicali liberi.

Il meccanismo tramite il quale il rame esprime la sua tossicità, invece, è abbastanza complesso. Esso implica un aumento della permeabilità cellulare negli eritrociti con conseguente emolisi, inibizione della glutatione-reduttasi e diminuzione del glutatione intracellulare ridotto, agglutinazione dei globuli rossi e una eccessiva stimolazione dello shunt dell'esoso monofosfato. Questo porta a uno stress ossidativo dei globuli rossi e ad una accelerata perdita del glutatione ridotto intracellulare (Todd e Thompson, 1963, 1965; Mital *et al.*, 1966; Metz e Sagone, 1972).

Contemporaneamente gli ioni rameici inducono rigonfiamento dei mitocondri e inibiscono il consumo di ossigeno (Bowler e Duncan, 1970). L'affinità del rame  $2+$  per i gruppi tiolici dell'emoglobina, degli eritrociti e di altre membrane aumenta la permeabilità e la lisi degli stessi globuli rossi.

Infine il rame aumenta la fragilità delle membrane lisosomiali, facilitando il rilascio di enzimi litici che provocano degenerazione cellulare (Chvapil *et al.*, 1972).

Recentemente, inoltre, si è scoperta una certa correlazione fra il rame e le malattie neurodegenerative provocate da prioni; la proteina prionica, normalmente espressa dai neuroni come glicoproteina di superficie cellulare, infatti, si è dimostrata essere una molecola legante il rame e, per questo, possiede un ruolo fondamentale nel metabolismo cerebrale di questo metallo. Essa può alterare l'ingresso intracellulare del rame e facilitare la sua incorporazione nella SOD (Superossido-dismutasi), oltre a comportarsi essa stessa come la SOD (Brown, 2001).

#### 1.7.4. Aspetti Tossicologici

Quando i livelli di rame organico raggiungono e superano le concentrazioni fisiologiche, si instaurano manifestazioni patologiche che rientrano in quadri acuti o cronici.

Non si può stabilire con precisione un livello soglia di tossicità del rame, poiché questo dipende anche dalle concentrazioni di altri metalli come molibdeno, zinco e ferro. Alcuni animali sono particolarmente sensibili al metallo, come per esempio i ruminanti, che dimostrano sintomi di intossicazione già con 8-10 ppm di rame nel foraggio.

L'intossicazione da rame si può verificare o per un'eccessiva assunzione del metallo con la dieta, o per inefficienza delle vie di escrezione, come si verifica, ad esempio, in caso di ostruzione del coledoco o di qualsiasi patologia epatica o renale,

ma anche per carenza di proteine che legano il rame (rendendolo così inattivo) e per deficit di Md, Fe, Zn, che competono con esso nell'assorbimento.

**Tab. 1.7-** Valori di DL definiti per il rame a seguito di somministrazione per vie diverse in differenti specie animali (Venugopal e Luckey, 1978).

<b>Composto</b>	<b>Via di somministrazione</b>	<b>Specie</b>	<b>Tossicità</b>	<b>Dose (mg/kg o mg/m<sup>3*</sup>)</b>
<b>Cloruro ferroso</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	984
	Orale	Coniglio	DL <sub>100</sub>	890
	Rettale	Ratto, coniglio	DL <sub>100</sub>	591-984
	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	188
<b>Cloruro ferrico</b>	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>100</sub>	260
	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	900
	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	68
	Intravenosa	Coniglio	DL <sub>50</sub>	7.2
<b>Nitrato ferroso</b>	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	428
<b>Nitrato ferrico</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	3250
<b>Solfato ferroso</b>	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	278
	Endovenosa	Topo	DL <sub>50</sub>	81
	Endovenosa	Coniglio	DL <sub>100</sub>	99
	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	100
	Rettale	Ratto	DL <sub>100</sub>	1040
	Orale	Topo, ratto	DL <sub>50</sub>	1170-1480
	Orale	Ratto, coniglio	DL <sub>100</sub>	2130-2780
<b>Solfato ferrico</b>	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	1070
<b>Solfato di ammonio ferroso</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	3250
<b>Ferro carbonile</b>	Inalatoria	Topo	DL <sub>100</sub>	7*
<b>Acetato ferroso</b>	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	492
<b>Gluconato ferroso</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	4600

\* Esposizione per 4 h

#### *1.7.4.1. Tossicità acuta*

Lo stato tossico acuto si manifesta con scialorrea, vomito, dolori addominali, diarrea, convulsioni fino a paralisi e, nei casi gravi, morte dopo 1 o 2 giorni per blocco cardio-circolatorio; si ricorda, inoltre, che il rame possiede potere notevolmente caustico per la mucosa del digerente.

#### *1.7.4.2. Tossicità a lungo termine*

L'intossicazione cronica, invece, comprende due stadi di sviluppo; il primo è abbastanza lungo ed è caratterizzato dal progressivo accumulo del metallo nel fegato (Soli, 1980) che determina una fase subclinica in cui si instaura il danno all'organo emuntore. Questo stato si può evidenziare con degenerazione epatocellulare e aumento dei tenori sierici degli enzimi epatici. Successivamente compaiono i segni del secondo stadio, uguali in tutti gli animali: anemia microcitica ipocromica, crisi emolitiche in seguito a rilascio del rame in circolo, con danno alle membrane degli eritrociti, alterazioni della pressione osmotica ed emoconcentrazione; queste crisi si manifestano con ittero, ottundimento del sensorio e astenia. Altri sintomi sono ricollegabili al danno epatico: vomito, melena, diarrea e dolori colici; altri ancora all'insufficienza renale, quasi sempre sequela dell'intossicazione: emoglobinuria e metaemoglobinemia.

I reperti anatomo-isto-patologici includono degenerazioni renali, ulcere alla mucosa gastro-enterica, epatomegalia e maggiore friabilità del fegato, che presenta pure aree necrotiche, edema polmonare e essudati in cavità addominale. Inoltre, eccessi di rame nella dieta producono anche alterazioni cerebrali, evidenziabili con aree di trasformazione spongiforme nella sostanza bianca.

Il suino e i suidi in genere sopportano meglio di altre specie l'assunzione cronica di elevate quote di rame nell'alimento; l'impiego nella dieta di 200-300 ppm di questo metallo non provoca alcun effetto tossico (Kornegay *et al.*, 1989; Shurson *et al.*, 1990). Per osservare sintomi di tossicosi bisogna superare i 400 ppm.

#### *1.7.4.2. Effetti cancerogeni*

In ultimo, si è visto che anche il rame possiede un certo potere cancerogeno, dimostrato nell'uomo da studi svolti in zone con elevate concentrazioni di rame e zinco nel suolo.

### 1.7.5. Impatto ambientale

Si è già accennato all'importanza del rame come nutriente essenziale e alla sua presenza in sistemi inorganici ed organici animali e vegetali; questi ultimi soprattutto possono rappresentare potenziali pericoli per animali posti ai vertici della catena alimentare.

Sono state identificate zone carenti del metallo nell'Australia Occidentale, in alcune regioni meridionali dell'Europa Occidentale e nel sud-est degli Stati Uniti.

Queste le concentrazioni di rame in alcuni comparti ambientali e nel corpo umano (Venugopal e Luckey, 1978)

<b>Comparto ambientale/organico</b>	<b>Concentrazione</b>
Crosta terrestre	4,5 ppm
Acqua marina	1-25 ppb
Uomo adulto	100 mg
Ostrica	137 ppm

## **1.8.SELEONIO**

Il selenio è stato identificato per la prima volta dal chimico svedese Berzelius nel 1817.

E' stato stabilito essere un nutriente essenziale a basse concentrazioni (0,1 ppm), parte integrante dell'enzima glutatione perossidasi (Harr, 1978), mentre ad alte concentrazioni è stato indicato come elemento tossico (Morris et al., 1984); secondo Venugopal e Luckey (1978) livelli di 0,4 ppm di selenio sono già in grado di esercitare un'azione tossica.

Il selenio presenta un'ampia ma non uniforme distribuzione nel mondo, esistono infatti delle zone dette "selenifere" (alcune regioni degli Stati Uniti, della Colombia, della Gran Bretagna e dell'Irlanda) caratterizzate da terreni di origine scistosa e di natura organica nei quali il suolo può contenere anche più di 1000 ppm (Kakin, 1973) e la vegetazione può presentare livelli da far insorgere tossicosi negli animali e nell'uomo (Gennaro, 1984). La maggior parte delle altre aree (Italia compresa), invece, non presenta alti livelli, sia nei terreni che nei vegetali.

I valori riscontrati sono molto spesso al di sotto di 0,1 ppm (0,09 ppm di media, Venugopal e Luckey, 1978), quantità considerata, come già ricordato, ottimale al fine di evitare la comparsa di fenomeni carenziali (Lotti et al., 1966; Cottenie, 1979).

Il selenio veniva usato nei primi del '900 come pesticida nel controllo dei parassiti delle piante, mentre è ancora in uso come spray nel controllo dei parassiti dei crisantemi e di altre piante ornamentali (Rosenfield e Beath, 1964).

Ancora shampoos contenenti 1% di solfuro di selenio sono utilizzati per il controllo della forfora nell'uomo e di alcune dermatiti nei cani.

Nel campo industriale il selenio è impiegato nell'industria elettronica per la produzione di rettificatori e cellule fotoelettriche; nell'industria del vetro e della ceramica come colorante e nell'industria della gomma come vulcanizzante. E' poi usato nella produzione dell'acciaio inossidabile, nell'industria delle materie plastiche e dei lubrificanti (Gennaro, 1984).

### **1.8.1 Caratteristiche chimico-fisiche**

Il selenio è un metalloide che è molto simile allo zolfo nelle sue caratteristiche chimiche, per altro piuttosto complesse. (NRC, 1980)

E' caratterizzato da un peso atomico di 78.96, un numero atomico di 34, un punto di fusione 271°C e di ebollizione di 685°C e una densità di 4.26-4.79 (Eisler, 1985).

Le sue forme allotropiche comprendono una polvere rossa, cristalli rossi, muschio marrone scuro e una forma grigio argento prodotta dopo un prolungato riscaldamento a 200-220°C (NRC, 1980).

Si presenta con valenze variabili da -2 a +6, tra queste i 3 stati di ossidazione principali sono: -2 (selenuri di idrogeno), +4 (seleniti) e +6 (selenati) (Eisler, 1985). I selenati sono composti relativamente solubili e altamente tossici, simili ai solfati, mentre i seleniti sono praticamente insolubili tanto da poter essere considerati come forme di deposito del selenio (Goyer, 1996), quei pochi che sono invece solubili sono altamente tossici e formano con ferro e alluminio dei composti stabili (NRC, 1980).

La formazione e la stabilità dei selenati (stato di ossidazione +6), è favorita da un ambiente alcalino e ossidante (NRC, 1980).

Nella sua valenza -2, (selenuro di idrogeno), il selenio è un gas altamente tossico (1-4 ppb nell'aria) e reattivo, che in presenza di ossigeno si decompone rapidamente in selenio elementare e acqua.

Nella forma elementare (stato di ossidazione 0), invece, il selenio è insolubile, non tossico, quando bruciato si ossida a diossido di selenio, che sublima e quando disciolto in acqua, forma acidi selenosi.

Il selenio, ancora, forma con i metalli pesanti, come il cobalto, dei composti stabili e insolubili (Venugopal e Luckey, 1978). Anche altri selenuri metallici come i selenuri di arsenico, rame o cadmio sono caratterizzati da una scarsa solubilità che influenza l'assorbimento, la ritenzione e la distribuzione del corpo del selenio e del metallo pesante (Goyer, 1996).

L'insolubilità di questi composti potrebbe essere alla base della detossificazione da metilmercurio con dieta a base di selenio (Harr J.R., 1978).

La seleniometionina e la seleniocisteina, analoghi selenici degli aminoacidi solforici, sono tra i composti organici del selenio più importanti dal punto di vista biologico (Venugopal e Luckey 1978).

Da ricordare infine che il selenio è un componente chiave di diversi enzimi: nella glutatione perossidasi (GSH-Px), il selenio svolge, insieme alla vitamina E, un ruolo nella protezione delle membrane biologiche dai danni provocati dai perossidi (Combs et al, 1975).

### 1.8.2. Comportamento cinetico

Il selenio viene assorbito principalmente a livello intestinale ed in particolare a livello duodenale.

Il grado di assorbimento è influenzato dalla forma chimica dell'elemento dalla presenza di sali metallici e della specie animale (Venugopal B. e Luckey T.D. 1978). Negli animali monogastrici, per esempio l'assorbimento intestinale è superiore a quello dei ruminanti, probabilmente perché a livello ruminale il selenito è convertito in forma insolubile (Goyer, 1996).

La somministrazione di Se per via parenterale comporta un rapido assorbimento e passaggio al sangue come rapido è l'assorbimento a livello polmonare mentre praticamente nullo è l'assorbimento attraverso la pelle (Venugopal e Luckey 1978).

Il Se assorbito e riversato nel sangue si lega principalmente alle proteine plasmatiche (albumine e globulina) ma anche agli eritrociti nei quali è associato alla glutatione perossidasi ed è circa 3 volte più concentrato che nel plasma (Burk R.F., 1976).

Dal sangue il Se si distribuisce a tutti i tessuti (Venugopal e Luckey, 1978). Inizialmente si accumula in maggior quantità nel fegato e nel rene ma si riscontrano livelli apprezzabili anche nel sangue, nel cervello, nel miocardio, nel muscolo scheletrico e nei testicoli.

Va ricordato inoltre che può essere trasferito al feto attraverso la placenta e che è presente anche nel latte in quantità variabili a seconda dell'apporto fornito con la dieta (Goyer, 1996).

La principale via di escrezione del Se è rappresentata dalla via urinaria (Burk R.F. et al., 1973).

L'escrezione dei seleniti assunti in unica dose sembra divisa in due fasi: una prima fase rapida, circa una settimana, che porta all'eliminazione del 15-40% della quota assorbita e una II fase ad andamento esponenziale con un'emivita di 103 giorni (Goyer, 1996).

L'escrezione può avvenire anche attraverso le feci; normalmente si tratta della quota di Se non assorbita alla quale vanno aggiunte piccole quantità escrete con le secrezioni biliari, pancreatiche e intestinali (NRC, 1980).

I prodotti di escrezione del Se compaiono anche nel sudore, nel latte, come già ricordato, e nell'aria espirata (quando la quota assunta supera 1 mg/kg); quest'ultima per la presenza di dimetilselenuro può avere odore di aglio (Goyer, 1996).

Il corpo sembra possedere, entro certi limiti fisiologici, un meccanismo omeostatico per trattenere piccole quantità di Se e allontanare quello in eccesso. I fenomeni di tossicità si verificano quando il Se introdotto supera la capacità di escrezione (Schroeder e Mitchner, 1972).

### 1.8.3. Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico

Il selenio è un componente chiave di diversi enzimi: nella glutatione perossidasi (GSH-Px) ad esempio, il selenio svolge, insieme alla vitamina E, un ruolo nella protezione delle membrane biologiche dai danni provocati dai perossidi (Combs *et al.*, 1975).

Per contro il selenio tende a rimpiazzare lo zolfo formando seleno-analoghi degli aminoacidi solforati. Questo comporta inibizione dei sulfidril-enzimi, in particolare di alcune deidrogenasi come la succinico-deidrogenasi (Ray & Ray, 1975). I seleniti possono reagire con i gruppi tiolici della cisteina o del coenzima A formando selenosolfuri e rendendo inutilizzabili importanti cofattori (Ganther, 1968). Recentemente si è formulata un'ipotesi di legame reversibile con i gruppi -SH dell'acetil-CoA e del malonil-CoA del selenito (Donaldson, 1976). Tutto danneggerebbe i sistemi di respirazione cellulare che comporta una ridotta produzione di ATP (Venugopal e Luckey, 1978).

*In vitro* i seleniti hanno proprietà emolitiche (Crowley *et al.*, 1977) e un'azione analoga sembra l'abbiano i composti organici del selenio *in vivo* (Neethling *et al.*, 1968). Quantità tossiche di selenio provocano anche una diminuzione del glutatione ridotto, in particolare a livello epatico (Le Boeuf e Hoekstra, 1983). Queste alterazioni biochimiche non bastano a spiegare il meccanismo patogenetico della tossicosi da Se: si pensa che un "ipossia istotossica" in cui si ha perturbamento della respirazione cellulare e una ridotta produzione di ATP, possa determinare deficit funzionale dei tessuti ad alto metabolismo energetico quali il tessuto nervoso ed il miocardio (Jahn, 1976).

### 1.8.4. Aspetti tossicologici

Il selenio è un elemento molto tossico, sebbene essenziale: si è visto che quantità di circa 0,1 ppm nella dieta sono necessarie nei mammiferi e negli uccelli, ma livelli di 0,4 ppm sono già in grado di esercitare un'azione tossica (Venugopal e Luckey, 1978).

La tossicità varia con la forma di selenio assunta, in quanto le forme organiche contenute nei vegetali sono molto più tossiche dei seleniti o dei seleniati, mentre seleniuri e selenio elementare sono relativamente poco tossici (Hatch, 1982). Importante è anche la tossicità, infatti aumenta impiegando la via parenterale rispetto alla via orale (Gennaro, 1984).

Si è rilevato che i ruminanti sono più sensibili al  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  per via orale rispetto ad equini, suini e polli. I maschi, inoltre, sembrano tollerare dosi di selenio più elevate

rispetto alle femmine (Shortridge *et al.*, 1971; Pilch *et al.*, 1980; Gennaro *et al.*, 1983).

Un'alimentazione ricca di tocoferoli, antiossidanti e proteine, in particolare caseina e zeina, è in grado di ridurre in modo sensibile la tossicità del Se (Gennaro, 1984).

Clinicamente sono stati identificati tre tipi di intossicazioni: acuta, subacuta e cronica; le ultime due forme sono conosciute rispettivamente come “vertigini cieche” e “malattia degli alcali”. Queste forme possono essere messe in relazione alla quantità e al tipo di selenio ingerito.

**Tab. 1.8** Valori di DL<sub>50</sub> definiti per il selenio a seguito di somministrazione per vie diverse in differenti specie animali (Venugopal e Luckey, 1978).

<b>Composto</b>	<b>Via di somministrazione</b>	<b>Specie</b>	<b>Tossicità</b>	<b>Dose (mg/kg o mg/m<sup>3</sup>*)</b>
<b>Diossido di Selenio</b>	Sottocutanea	Ratto	DL <sub>50</sub>	4
<b>Disolfuro di Selenio</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	370
<b>Cloruro di Selenio</b>	Sottocutanea	Cavia	DL <sub>50</sub>	19
<b>Ossicloruro di Selenio</b>	Sottocutanea	Coniglio	DL <sub>100</sub>	7
<b>Selenuro di sodio</b>	Intraperitoneale	Topo	DL <sub>50</sub>	3.4
<b>Selenito di sodio</b>	Orale	Topo, ratto, cavia, coniglio	DL <sub>50</sub>	2.25-7
	Intraperitoneale	Ratto	DL <sub>50</sub>	7.5
	Intravenosa	Ratto	DL <sub>50</sub>	3.5
	Intravenosa	Cane	DL <sub>100</sub>	3.5
	Sottocutanea	Cane	DL <sub>100</sub>	4.0
<b>Selenato di sodio</b>	Intraperitoneale	Ratto	DL <sub>50</sub>	13.8
	Intraperitoneale	Coniglio	DL <sub>100</sub>	9.6
	Intravenosa	Ratto	DL <sub>50</sub>	8.35
	Intravenosa	Coniglio	DL <sub>100</sub>	2.0
<b>Selenoamino acidi</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	13

#### *1.8.4.1. Tossicità acuta*

La tossicità acuta è dovuta principalmente all'ingestione unica di foraggio o mangime ad elevato contenuto di Selenio o di un superdosaggio di farmaci contenenti Se o, ancora, per ingestione di piante accumulatrici di selenio, intossicazione, questa, piuttosto rara, in quanto normalmente gli animali evitano questo tipo di piante (Shortridge et al., 1971, Bottarelli, 1993).

I sintomi compaiono da poche ore a pochi giorni dopo l'assunzione e sono rappresentati da anoressia, sciallorrea, depressione, dispnea con gemito, digrignamento dei denti, poliuria, coliche, meteorismo, polso debole e celere. L'animale muore per edema polmonare entro pochi giorni (Rosenfeld e Beath, 1946).

Nell'uomo i sintomi di una intossicazione acuta da Selenio sono: irrequietezza, febbre, brusca caduta della pressione sanguigna, spasmi tetanici e clonici e convulsione che portano a morte per blocco respiratorio (Venugopal e Luckey, 1978)

Dal punto di vista anatomo-patologico, emorragia generalizzata, ascite, e atonia della muscolatura liscia rappresentano i reperti più caratteristici di questo tipo di tossicità (Rosenfeld e Beath, 1946).

Esiste anche una forma sub acuta conosciuta con il nome di “barcollamento cieco”. Gli animali tendono ad isolarsi dalla mandria e dal gregge, a vagabondare senza scopo con andatura barcollante, girando in circolo ed urtando gli ostacoli che incontrano come se fossero ciechi; presentano scialorrea, lacrimazione, diaspnea, paralisi o paresi, la morte sopravviene spesso bruscamente dopo qualche giorno di malattia (Bottarelli, 1993).

#### *1.4.8.2. Tossicità a lungo termine*

La forma cronica di intossicazione da selenio è conosciuta come “malattia degli alcali”, in quanto, come suggerisce il nome, era un tempo attribuita all’assunzione di acque alcaline.

Secondo Knight e Beath (1937) e Williams et al. (1941) è invece causata dall’ingestione di cereali, erba e altre piante foraggere contenenti piccole quantità di selenio (5ppm-40 ppm per settimana).

I primi sintomi sono rappresentati dalla perdita dei crini della criniera e della coda nei cavalli, del fiocco della coda nei bovini, delle setole del dorso nei suini.

Compare poi zoppicatura per deformazione dello zoccolo ed erosioni superficiali degli arti ed infine anemia intensa associata a dimagrimento e cheratite.

Nei volatili la forma cronica è caratterizzata da anemia e rigidità degli arti (Bottarelli, 1993)

#### *1.8.4.3. Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi*

Gli effetti riproduttivi possono essere primari o secondari ad emaciazione e vanno annoverati tra le conseguenze di una intossicazione cronica.

Le sperimentazioni condotte su ratti e topi hanno dimostrato che per il ratto, i piccoli nati da femmine intossicate sono emaciati e incapaci di riprodursi, mentre topi a cui viene somministrato selenio con l’acqua da bere sono in grado di riprodursi fino alla terza generazione, i loro piccoli sono piccoli e pochi, con una elevata mortalità nel periodo pre-svezzamento e infertilità (Schroeder e Mitchner, 1971).

Il selenio è, inoltre, embriotossico in quanto interferisce con lo sviluppo dell’embrione perché riduce la disponibilità di ossigeno e di energia e teratogeno come ben documentato nelle ovaiole alimentate con mangimi seleniferi o con diete arricchite con 7-9 ppm di Se come  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (54), a cui venivano somministrate per

via parenterale quantità variabili di selenito sodico nella camera d'aria delle uova embrionale (Sukra *et al.*, 1976) . I pulcini nati da questi animali presentano edema del collo e del capo, idrocefalo, aplasia o malformazioni del becco, microoftalmia o anoftalmia, gastroschisi, fusione, curvatura o mancanza delle dita.

#### *1.8.4.4. Effetti cancerogenici e anti-carcinogenici*

La cancerogenità del selenio non è stata ancora provata con certezza (Gennaro, 1984) e le uniche prove esistenti si basano su studi condotti da Nelson *et al.* nel 1943, da Tscherkes *et al.* nel 1961-1963 e da Volgarev e Tscherkes nel 1967.

Nelson e collaboratori hanno indotto tumori epatici non metastatizzanti in ratti alimentati con grani seleniferi contenenti 5-10 ppm di Se con un periodo di latenza di circa 18 mesi. Negli studi di Tscherkes carcinomi e adenomi epatici sono stati osservati nel 25% di ratti alimentati con 4,3 ppm di Se sottoforma di selenati. Questi dati sulla cancerogenicità dei selenati sono stati supportati da successivi studi condotti nel 1971 da Schroeder e Mitchner.

Ben più chiaro è invece l'effetto anticarcinogenico svolto dal Selenio.

Ricerche epidemiologiche, infatti, hanno indicato una diminuzione della mortalità per cancro in associazione ad un aumento di selenio nella dieta (Shamberger, 1983).

Inoltre sperimentalmente è stato evidenziato un effetto anti-neoplastico nei confronti di tumori della pelle indotti nei topi dal benzo-(a)-pirene e dal benzoantracene, di tumori provocati nei ratti dalla N-2-fluotenilacetamide e dal dietilaminoazobenzene e verso tumori mammari spontanei dei topi.

Gli effetti protettivi del selenio potrebbero in questo caso coinvolgere l'inibizione della malonildialdeide, un prodotto del danneggiamento perossidativo dei tessuti caratterizzato da effetto cancerogeno (Goyer, 1996).

#### *1.8.4.5. Effetti immunodepressivi*

L'azione negativa sul sistema immunitario del selenio è legata, ancora una volta alla sua carenza più che ad episodi di tossicosi.

La carenza di selenio, infatti, altera sia la capacità fagocitaria che quella killer nei confronti degli agenti patogeni, dei neutrofili; tali difetti funzionali sono correlabili agli sconvolgimenti enzimatici che una carenza di selenio può causare a carico delle cellule (Serfass & Garthner, 1975; Boyne & Arthur, 1981 e Arthur *et al.*, 1981).

Esistono considerevoli prove che se da un lato la carenza causa un'alterazione della risposta immunitaria, dall'altro la somministrazione di dosi supplementari di selenio aumenta la risposta dell'immunità umorale negli animali. Studi condotti da Spallholz *et al.* nel 1973 e da Shackelford e Martin nel 1980 hanno evidenziato,

infatti, come topi a cui venga somministrata una dose di 1-3 ppm di selenio possano produrre aumentate quantità di anticorpi IgM e IgG anti-globuli rossi di pecora.

La stessa modulazione del sistema immunitario in risposta ad una carenza o ad una somministrazione suppletiva di selenio la si riscontra anche nell'attività cellulomediata, con soppressione della stessa nel primo caso e aumento nel secondo (Sheffy & Schultz, 1979; Parnham et al., 1983, Eskew et al., 1985 e Koller et al., 1986).

### 1.8.5. Impatto ambientale

Come già ricordato, il selenio presenta un'ampia ma non uniforme distribuzione nel mondo, esistono infatti delle zone dette "selenifere" (alcune regioni degli Stati Uniti, della Colombia, della Gran Bretagna e dell'Irlanda) caratterizzate da terreni di origine scistosa e di natura organica nei quali il suolo può contenere anche più di 1000 ppm (Kakin, 1973) e la vegetazione può presentare livelli sufficientemente alti da far insorgere tossicosi negli animali e nell'uomo (Gennaro, 1984). La maggior parte delle altre aree (Italia compresa), invece, non presenta elevati livelli, nei terreni e nei vegetali.

L'aria e le acque generalmente contengono concentrazioni di selenio non pericolose. Aumenti significativi di selenio in aree specifiche sono attribuiti esclusivamente a fonti industriali e al dilavamento di terreni seleniferi. Negli Stati Uniti, per esempio, sono rilasciati annualmente nell'ambiente circa 4.6 milioni di kg di Se: il 33% proveniente dalla combustione di carburanti fossili, il 59% da perdite industriali e l'8% da rifiuti urbani. Del totale circa il 25 % è in forma di emissioni atmosferiche e il resto in ceneri.

Per quanto riguarda il mondo vegetale in rapporto alla proprietà di accumulare quantità variabili di selenio, le piante possono essere suddivise in 3 categorie:

- accumulatrici obbligate o indicatrici, che per una normale crescita necessitano di alti quantitativi di Se;
- accumulatrici facoltative, che non necessitano di alti tenori di Se, ma possono accumularne quantità pericolose (30-70 ppm) se crescono su terreni seleniferi;
- indifferenti (la maggior parte).

Nei vegetali il selenio è presente soprattutto in forma organica, nelle piante accumulatrici predomina la selenometilcisteina, mentre nelle altre si ritrovano la selenocistina, la selenometionina e la metilselenometionina (Peterson & Butler, 1962; Virupaksha & Shrift, 1965, Trelease, 1960).

Nella tabella seguente sono riassunte le concentrazioni di Se nell'ambiente (Eisler, 1985):

Crosta terrestre	0,05 ppm
Terreni	0,2-1000 ppm
Acqua potabile	0,12- 0,44 ppm
Acqua dolce	<0,002- 480 ppb
Acqua di mare	0,009-0,045 ppb
Aria	0,001- 6,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

## 1.9.ZINCO

Lo zinco è un metallo non facilmente reperibile in natura; si pensi che nella graduatoria degli elementi più abbondanti sulla crosta terrestre si trova solo al 27° posto; tuttavia nelle matrici biologiche, dopo il ferro, è il metallo pesante che raggiunge le più alte concentrazioni, trovandosi stabilmente legato ad enzimi o proteine come catione bivalente, in quantità minori libero in soluzione.

Nonostante la sua “scarsità” in natura, lo zinco viene adoperato in modo ordinario nelle industrie siderurgiche per la creazione di leghe come bronzo e ottone, di lamine di ferro galvanizzato, che viene utilizzato nell’edilizia, nella produzione di tappi di barattolo e di condutture d’acqua, e nei rivestimenti per altri metalli. Inoltre sali di questo metallo vengono sottoposti alle più svariate lavorazioni nella produzione di ceramiche, linoleum, cosmetici, vernici e tessili; alcuni di essi trovano impiego anche nel settore sanitario e terapeutico, essendo rodenticidi (fosfato di zinco), fungicidi (zinco caprilato), entrando nella composizione chimica di unguenti (zinco stearato), antisettici topici (zinco cloruro), e così via (Venugopal e Luckey, 1978).

### 1.9.1. Caratteristiche chimico-fisiche

Lo zinco appartiene al gruppo II, sottogruppo IIB; ha peso atomico 65,37, numero atomico 30, punto di fusione 419,5°C, di ebollizione 906°C, densità 7,14 g/cm<sup>3</sup> e si presenta come un reticolo cristallino esagonale.

Allo stato di ossidazione 2+, tende a reagire con composti inorganici acidi o alcalini, ma a pH prossimo alla neutralità si converte in idrossido [Zn(OH)<sub>2</sub>], che ha comportamento anfotero; può, quindi, formare numerosi sali, fra cui nitrati, solfati, clorati e cloriti, che sono solubili in acqua, mentre ossidi, carbonati, fosfati, silicati e i complessi organici sono insolubili.

### 1.9.2. Comportamento cinetico

Lo zinco possiede una discreta biodisponibilità a partire da numerose fonti, compreso lo zinco elementare ed i sali insolubili; questi ultimi, infatti, vengono solubilizzati dalla mucosa gastrica ed assorbiti nell’intestino tenue, soprattutto nel tratto duodenale.

L’assorbimento gastrointestinale varia grandemente a seconda dei composti ingeriti e della concentrazione di metallo nell’alimento: per i sali solubili, ad esempio, basse quote di zinco possono essere assorbite per un buon 80%. La presenza nell’alimento di elevate aliquote di calcio, fosforo e rame riduce l’assorbimento di zinco, così

come il cadmio compete con questo metallo per gli stessi meccanismi di trasporto (Becker and Hoekstra, 1971).

Altri composti che influenzano l'assorbimento gastroenterico di zinco sono, ad esempio, i fitati, che inibiscono o ritardano il fenomeno in tutte le specie salvo nei Ruminanti, dove addirittura lo facilitano, gli agenti chelanti sintetici, come l'EDTA, alcuni amminoacidi e i peptidi, che lo favoriscono (Miller *et al.*, 1970; Venugopal e Luckey, 1978).

Importante risulta, inoltre, il ruolo della prostaglandina E<sub>2</sub> che promuove il passaggio del metallo attraverso la mucosa gastrointestinale, e delle metallotioneine, prodotte in corso di infiammazione, che regolano gli scambi di zinco tra i vari organi (Sobocinski *et al.*, 1978; Starcher *et al.*, 1980). Anche la IL-1, che si libera in corso di flogosi e soprattutto nelle endotossiemie e negli stati infettivi, stimola la sintesi epatica e renale di metallotioneina, con seguente sequestro del metallo in questi tessuti e relativa ipozinchemia (Etzel *et al.*, 1982; Klasing, 1984).

Lo zinco viene assorbito, seppure in minima quantità, anche dal parenchima polmonare, dove si osserva un accumulo transitorio, e per via transcutanea.

Una volta in circolo, lo zinco si distribuisce per l'80% negli eritrociti, comparando nella anidrasi carbonica, per il 12-20% nel plasma, legato soprattutto alle  $\alpha$ -globuline e meno alle albumine, e per un restante 3% nei leucociti.

Negli organismi viventi lo zinco ha una distribuzione ubiquitaria, ma tende a concentrarsi soprattutto in muscoli, ossa, pelle, corioide degli occhi e liquido seminale maschile (Venugopal e Luckey, 1978). Le concentrazioni di metallo nel cervello sono abbastanza costanti, forse perché la barriera emato-encefalica si comporta come un "filtro", limitando il transito di oligoelementi. Sembra, inoltre, che anche lo zinco svolga un certo ruolo importante nel processo di neurotrasmissione (Xie e Smart, 1991).

Lo zinco assunto con la dieta e non assorbito e quello endogeno pervenuto in ambiente intestinale con la bile, col succo pancreatico e altre secrezioni, è eliminato con le feci; tuttavia una piccola parte del metallo è escreta anche attraverso le urine.

### 1.9.3. Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico

Lo zinco, in virtù delle succitate proprietà chimico-fisiche, compare in moltissime classi di enzimi e cofattori biologici: ossidoreduttasi, transferasi, idrolasi, liasi, isomerasi e ligasi. In base al legame che si crea tra il metallo e la componente proteica si distinguono due tipi di composti: 1-*metalloproteine*, in cui il legame è forte, 2-*complessi metallo-proteici*, in cui è labile.

Oltre a suddetti composti, lo zinco entra a far parte di *metallotioneine*, implicate anche nei fenomeni di disintossicazione, e di *proteine regolatrici di geni*, che facilitano o impediscono la trascrizione di un gene.

Altri esempi di fattori di trascrizione costituiti da zinco-proteine sono i recettori nucleari di alcuni ormoni, come mineralcorticoidi, estrogeni, ormoni tiroidei, acido retinico (Vallee e Falchuck, 1993).

Tutti questi esempi di composti contenenti zinco trovano ragione di esistere grazie alla possibilità che ha questo elemento di assumere diverse geometrie, con numeri di coordinazione che vanno da 2 a 8, e grazie alla sua capacità di interagire con l'ossigeno e con numerosi altri ligandi elettronegativi; nei complessi che più comunemente si ritrovano nei sistemi biologici lo zinco assume numero di coordinazione 4, 5 o 6. Queste sue proprietà si espletano nell'unione con molte macromolecole proteiche, ma anche con amminoacidi e peptidi; ne derivano metalloenzimi nei quali lo zinco non subisce né ossidazioni, né riduzioni, e il cui legame con il metallo è essenziale nel determinarne la conformazione e quindi l'attività (Vallee e Falchuck, 1993).

Lo zinco è in grado di legarsi anche con nucleotidi e lo si può ritrovare negli acidi nucleici; possiede, inoltre, affinità per gruppi tiolici e idrossilici e, in qualità di donatore, per ligandi contenenti azoto (Venugopal e Luckey, 1978); questo comportamento ricorda quello del cadmio, che appartiene, infatti, allo stesso gruppo dello zinco.

Fra le innumerevoli capacità di questo metallo, se ne ricorda, ancora, la capacità stabilizzante sulle membrane cellulari, nonché alterante la loro fluidità, da cui deriva l'attitudine a modificare gli scambi ionici, le interazioni ormone-recettore, l'attività del citoscheletro, l'attivazione degli enzimi di membrana e la partecipazione dei lipidi di membrana alle reazioni con i radicali liberi (Adams, 1999).

Molti degli effetti tossici dello zinco derivano dalle sue complesse interazioni con altri nutrienti fondamentali, come Cu, Fe, Mg e Ca. Effetti antagonisti sul metabolismo sono stati dimostrati da alcuni studi svolti su ratti a cui veniva somministrata una quota pari allo 0,5% di zinco con la dieta. Le modificazioni indotte erano una riduzione di Fe, Cu, ferritina ed emosiderina nel fegato e in altri tessuti, diminuzione delle attività del citocromo e delle catalasi, associate ad una riduzione dei livelli di fosfolipidi P nel cervello e della ceruloplasmina e del Cu nel siero (Grant-Frost e Underwood, 1958; Magee e Matrone, 1960; Cox e Harris, 1960, 1962; Lee e Matrone, 1969; Chu e Cox, 1972; Murthy *et al.*, 1974). Van Campen e Scafe (1967) studiarono come eccessi di zinco nella dieta riducessero

l'assorbimento intestinale del Cu. Il metallo inoltre inibisce l'ATPasi Mg-dipendente.

Un'intossicazione da zinco altera il metabolismo del Fe favorendone il suo turnover, diminuendo il tempo di vita degli eritrociti e l'accumulo del Fe come ferritina nel fegato (Settemire e Matrone, 1969 a, b).

Lo zinco è pure implicato nella modulazione del sistema immunitario, risultando da numerosi studi che carenze di zinco provocano una ridotta risposta immunitaria cellulo-mediata, diminuzione dell'intensità delle reazioni di ipersensibilità ritardata, a cui consegue maggiore suscettibilità a infezioni e patologie negli animali e nell'uomo (Adams, 1999).

#### 1.9.4. Aspetti tossicologici

L'intossicazione da zinco si osserva nell'uomo e negli organismi viventi in seguito all'ingestione di cibi o bevande acidule preparate e tenuti in contenitori zincati, e nei cani per l'ingestione di monetine o oggetti metallici o ancora, creme per la protezione solare (Latimer et al., 1989). La cattiva abitudine di alcune persone di gettare monetine nelle gabbie degli animali negli zoo o nei parchi dovrebbe essere considerata una potenziale fonte di avvelenamento da zinco per gli animali in cattività, i pennies conati prima del 1982 contengono il 95% di rame e il 5% di zinco, ma alcune monete coniate dopo il 1981 contengono gli stessi metalli ma in percentuali invertite, in quanto erano zinco placcato rame (Ogden et al., 1988)

Lo zinco è tossico per gli organismi a concentrazioni molto più elevate rispetto agli altri metalli; i meccanismi che ne regolano l'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione sono, infatti, molto efficienti. Tuttavia si possono avere alterazioni dell'omeostasi di questo metallo con accumulo di quantità tossiche per un eccessivo apporto con la dieta o per malnutrizione con scarsa assunzione di proteine.

I giovani risultano più sensibili rispetto ad i soggetti adulti (Bottarelli, 1993); Grimmet et al (1937) e Sampson, Graham e Hester (1942) hanno infatti descritto un'intossicazione in giovani maiali la cui dieta era stata somministrata con la dieta, costituita in maggior misura da latte, zinco allo 0.1%, sottoforma di lattato, mentre gli stessi autori hanno fallito nel produrre segni clinici in maiali adulti che sembrano tollerare bene fino a 35 gr di lattato di zinco al giorno e carbonato di zinco 0.1% nella razione (Brink et al., 1959)

In realtà il fattore di sicurezza per lo zinco è abbastanza ampio; concentrazioni di 600 ppm non determinano effetti avversi nella maggior parte delle specie studiate e soltanto livelli di 1000 ppm o più possono provocare riduzione dell'assunzione di

alimento e della crescita ponderale, alterata mineralizzazione ossea, anormalità ossee e cartilaginee e ridotte concentrazioni tissutali di Fe, Mn e Cu (NCR 1980).

I sali insolubili di zinco non possiedono tossicità per assunzione orale perché non sono assorbibili nel tratto gastroenterico e vengono eliminati con le feci; è anche vero, però, che alcuni sali, come il cloruro di zinco, sono irritanti per le mucose e possono indurre emesi.

Nella tabella 1.9 sono riportati i valori di DL per lo zinco.

**Tab. 1.9** La tossicità è riassunta nella tabella seguente (Venugopal e Luckey, 1978):

<b>Composto</b>	<b>Via di somministrazione</b>	<b>Specie</b>	<b>Tossicità</b>	<b>Dose (mg/kg o mg/m<sup>3</sup>*)</b>
<b>Cloruro di Zinco</b>	Orale	Topo Ratto, cavia	DL <sub>50</sub>	250-350
	Endovenosa	Ratto	DL <sub>100</sub>	75
<b>Fosforo di Zinco</b>	Orale	ratto	DL <sub>50</sub>	45.7
<b>Solfato di Zinco</b>	Intraperitoneale	Topo, Ratto	DL <sub>50</sub>	50-53
	Orale	Ratto, Coniglio	DL <sub>100</sub>	2100-2200
	Sottocutanea	Ratto, coniglio, cane	DL <sub>100</sub>	78-385
	Endovenosa	Ratto, coniglio, cane	DL <sub>100</sub>	44-66
<b>Acetato di Zinco</b>	Orale	Ratto	DL <sub>50</sub>	2460

\* Esposizione per 4 h

#### *1.9.4.1. Tossicità acuta*

Sintomi dell'intossicazione acuta da zinco sono: anoressia, debolezza, dolori addominali, scialorrea, vomito, diarrea, depressione del sensorio con tremori e paralisi; altre manifestazioni tipiche sono l'anemia ipocromica microcitica, calo della produzione di eritrociti e leucociti, morte embrionale, ipotrofia testicolare e infertilità.

Inalazioni di alcuni sali di zinco, come cloruri e ossidi, come conseguenza di una esposizione di tipo industriale, provocano polmoniti nell'uomo, spesso ad esito letale, e una sindrome caratterizzata da depressione, nausea, secchezza della gola e emicrania, sintomi simili a quelli della malaria. Cani e gatti si sono dimostrati immuni da queste sindromi da inalazione, ma i primi hanno presentato glicosuria, mentre i secondi degenerazione fibrosa pancreatica (Johnson e Stonehill, 1961, Goyer, 1996).

#### *1.9.4.2. Tossicità a lungo termine*

I primi segni di un'avvelanamento cronico da zinco nel maiale sono: dimagrimento, ridotto appetito e riduzione del coefficiente di conversione alimentare. Inoltre si

osservano artriti, gastriti, enterite catarrale, congestione del mesentero ed emorragie dei ventricoli cerebrali dei linfonodi e della milza (Brink et al., 1959).

Forme croniche di intossicazione da zinco sono state osservate anche nei bovini e si manifestano nei vitelli con diarrea verdastra fetida, esoftalmo, nistagmo, meteorismo e convulsioni mentre i bovini adulti presentano dimagrimento, edemi sottocutanei ed anemia.

Infine nei cani è stata osservata la comparsa di ematuria (Bottarelli, 1993).

#### *1.9.4.3. Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi*

Un eccesso di zinco si è dimostrato avere effetti teratogenetici su embrioni di rana e pesci, probabilmente per inibizione della sintesi del DNA (). Al contrario non esistono ancora conferme che un eccesso di zinco possa produrre effetti teratogeni nei mammiferi mentre sembra avere effetti protettivi contro alcune sostanze teratogene come il calcio EDTA (Dawson et al, 1988; Fort et al., 1989; Leonard and Gerber, 1989). Analogamente è stato dimostrato che la somministrazione in criceti di sali zinco in associazione a sali di cadmio può ridurre gli effetti teratogenici di quest'ultimi (NAS, 1979).

Se non è stato ancora dimostrato che l'eccesso di zinco possa avere effetti teratogenici sui mammiferi, chiaramente teratogenica è la carenza (Dawson et al, 1988; Leonard and Gerber, 1989). Gli studi di Ferriera et al. (1989) hanno dimostrato che nei ratti una grave carenza materna di zinco può portare a malformazioni fetali in tutti i tessuti anche se le malformazioni scheletriche risultano le più comuni, probabilmente a causa di una riduzione della proliferazione cellulare e della attività della fosfatasi alcalina dell'osso (Leonard and Gerber, 1989).

Inoltre la carenza di zinco sembra poter accentuare gli effetti di molti agenti teratogenici (Leonard and Gerber, 1989).

Studi condotti su ratti da Uriu-Hare et al. nel 1989 hanno infine messo in evidenza come patologie metaboliche quali il diabete possano amplificare gli effetti teratogenici della carenza materna di zinco, anche se non eccessiva.

#### *1.9.4.4. Effetti mutageni*

I risultati di studi di mutagenicità dello zinco su organismi interi sono stati normalmente negativi in quanto i meccanismi che ne regolano l'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione sono, infatti, molto efficienti. Tuttavia lo zinco può essere un efficiente mutageno se somministrato a popolazioni di cellule sensibili sotto determinate forme; così lo zinco acetato si è dimostrato produrre risposte positive, dose-dipendenti in cellule linfatiche del topo o cellule ovariche di cavia;

mentre studi sulla mutagenicità dello zinco inorganico su *Salmonella* spp hanno dato esito negativo (Thompson et al., 1989).

Aberrazioni cromosomiche strutturali, sono state osservate in cellule di midollo osseo di ratto dopo 14 giorni di esposizione a 24 mg/l di Zn nell'acqua da bere. La somministrazione di 5000 mg Zn/Kg con la dieta in topi ha portato alla comparsa di aberrazioni a carico del midollo spinale che potrebbero essere associate a carenza di calcio (Leonard and Gerber, 1989). Lo zinco si sostituisce al calcio in condizioni di carenza di quest'ultimo con conseguenti rotture cromosomiche e interferenza nei processi riparativi. (Eisler, 1993).

Una più alta incidenza di anomalie cromosomiche è stata rilevata a carico di linfociti di lavoratori esposti allo zinco ma questa potrebbe essere dovuta ad altri fattori mutageni non specificati presenti nell'ambiente di lavoro (Leonard and Gerber, 1989; Elinder, 1986).

Va comunque sottolineato come lo zinco si dimostri un agente protettivo anche nei confronti dell'azione mutagena di alcuni cancerogeni in quanto costituente di un enzima detossificante o in quanto agisce direttamente sulla monoossigenasi mitocondriale che forma il cancerogeno terminale (Leonard and Gerber, 1989). Così, per esempio, riduce gli effetti genotossici del piombo sulle cellule del midollo osseo del ratto.

#### *1.9.4.5. Effetti cancerogeni*

Gli esteri carbammati di zinco si sono dimostrati avere effetti cancerogeni sugli animali, effetti attribuibili però più all'azione dell'estere carbamato che non allo zinco (Elinder, 1986).

Esistono prove evidenti che ripetute iniezioni intratesticolari di sali di zinco possano indurre sarcomi testicolari negli uccelli e nei ratti (NAS, 1979; Elinder, 1986; Goyer, 1986; PHS, 1989). Non esistono, al contrario, prove in campo o sperimentali dimostranti l'attività cancerogena dello zinco e dei composti zincati attraverso altre vie di esposizione se non iniettati direttamente nei testicoli (NAS, 1979; Philips e Kindred, 1980; Elinder, 1986; Leonard e Gerber, 1989; PHS 1989).

Essendo lo zinco elemento essenziale per la crescita di cellule a proliferazione rapida come quelle tumorali, le richieste elevate di zinco da parte di queste ultime può risultare in una carenza latente del metallo stesso. Ciò può essere in accordo con il fatto che la crescita di tumori animali può essere stimolata dallo zinco e ritardata da una sua carenza (Prasad 1979; Leonard e Gerber, 1989).

Ancora non chiari sono invece i meccanismi con cui lo zinco, e non la sua mancanza, possa inibire la crescita tumorale (Philips e Kindred, 1980).

#### 1.9.4.6. Effetti immunodepressivi

Le conoscenze sin ad ora acquisite circa gli effetti dello zinco sul sistema immunitario sono riferibili essenzialmente alla carenza di zinco e non imputabili ad una sua tossicosi.

Dagli studi condotti da Luecke et al. nel 1978 su topini, è emerso che una dieta carente di zinco non ha effetti significativi sulla risposta immunitaria anticorpo-mediata nei confronti di globuli rossi di pecora anche se gli animali mostrano una pronunciata perdita di capacità immunitaria.

Gli effetti sul sistema immunitario sembrano, inoltre, legati all'età in cui questa carenza si manifesta. Beache et al. (1982) hanno dimostrato che una carenza di zinco in topini di 10 settimane di età può portare ad una riduzione della proliferazione linfatica decisamente più accentuata di quella osservata in topini di 4 settimane.

Ancora animali da laboratorio in carenza di zinco hanno dimostrato avere ridotti livelli del "fattore timico sierico" ed, *in vitro*, è stata osservata una significativa soppressione della mitogenesi dei linfociti nel circolo sanguigno periferico (Depasquale-jardieu e Fraker, 1979, 1980; Iwata et al., 1979; Chandra et al., 1980; Carlomagno e McMurray, 1983).

#### 1.9.5. Impatto ambientale

I minerali in seno ai quali lo zinco si trova in natura sono spesso contaminati da cadmio, in un rapporto Cd:Zn di 200:1. Nonostante questo, si considera che lo zinco sia il 17° più abbondante elemento nella crosta terrestre.

Si ricorda, inoltre, la sua massiccia presenza come metallo traccia nei sistemi biologici animali e vegetali.

Le sue concentrazioni in alcuni comparti ambientali e organici sono le seguenti (Venugopal e Luckey, 1978):

<b>Comparto ambientale/organico</b>	<b>Concentrazione</b>
Crosta terrestre	65 ppm
Acqua marina	9-21 ppb
Uomo adulto	2300 mg

## **1.10.FATTORI CHE CONDIZIONANO L'ASSORBIMENTO DEI METALLI PESANTI NELLE SPECIE SELVATICHE**

Diversi possono essere i fattori che influenzano l'accumulo di metalli pesanti nei tessuti delle specie selvatiche. In questo capitolo vengono discussi e approfonditi alcuni di questi quali l'ambiente e l'alimentazione, il clima e le stagioni, l'età e il sesso e la presenza e quindi l'interazione tra diversi metalli.

### **1.10.1.Ambiente e alimentazione**

Nei fenomeni di accumulo di metalli pesanti nei vari organi e tessuti, l'ambiente in cui vivono gli animali gioca un ruolo fondamentale; questo parametro influenza anche l'alimentazione degli animali. L'ambiente comprende l'aria che viene respirata dagli animali, il suolo su cui gli animali si muovono e nel quale cercano il cibo (ricordiamo al proposito l'attività del "rooting" tipica proprio del cinghiale), la vegetazione, i corsi d'acqua e quant'altro si trovi "intorno" all'animale.

Il suolo, in termini biologici, rappresenta un fattore di primaria importanza capace di caratterizzare un ecosistema (Jones, 2002); l'eventuale contaminazione del suolo può, infatti, condizionare la dieta di molte specie animali, soprattutto quelle erbivore, influenzando la crescita di alcune popolazioni vegetali, risultando dipendenti da esse anche le quote di metalli rintracciabili nei tessuti animali. I dati reperibili in letteratura riportano, infatti, concentrazioni organiche di metalli più elevate in zone industrializzate rispetto a zone più "pulite".

Altro parametro importante è il pH del suolo; quando, ad esempio, in seguito a precipitazioni acide, esso diminuisce, la solubilità e la tendenza alla mobilizzazione di molti metalli aumenta (De Voogt *et al.*, 1980; Løbersli *et al.*, 1991); di conseguenza l'assunzione di queste sostanze da parte delle piante subisce incrementi che si riflettono direttamente sulla salute degli animali.

La qualità dell'aria respirata viene, ovviamente, influenzata dall'esistenza di industrie, miniere o altre fonti d'inquinamento nelle vicinanze di luoghi frequentati da animali. Questo elemento, tuttavia, svolge un ruolo di maggiore importanza in medicina umana a causa dell'esposizione continua a cui sono sottoposti alcuni individui lavoratori nelle industrie. Ciò nonostante, la via di esposizione più importante ai diversi metalli e metalloidi sembra essere, anche negli animali, la contaminazione diretta della vegetazione da parte di inquinanti dell'aria (Frøslie *et al.*, 2001); d'altra parte, però, anche zone non industrializzate possono essere contaminate da particelle di cadmio e composti contenenti piombo, così come da polveri contaminate, in quanto in grado di essere trasportate attraverso lunghe

distanze (Peterson e Alloway, 1979; Frosly *et al.*, 1984; Frank, 1986; Tsuchiya, 1986).

La presenza di corsi d'acqua in un habitat si traduce anche in presenza di metalli traccia e inquinanti. La liberazione di dette sostanze dall'acqua viene influenzata dal pH e dall'esistenza di composti organici; un aumento del pH dell'acqua, in particolare, determina la formazione di precipitati inorganici (ad esempio precipitati di AlOH ricchi di zolfo) e organici, che assorbono quote di metalli (Zn, Cu, Pb e Ni) e possono trasportarli lungo il corso del fiume (Munk *et al.*, 2002). Santiago *et al.* (1998) danno conferma di questi fatti in quanto ritrovano livelli di cadmio e piombo più alti in cinghiali e caprioli provenienti da zone maggiormente bagnate dalle acque del fiume Guadalquivir, piuttosto che in animali di altre aree della Spagna meno o affatto attraversate dal corso d'acqua.

Ancora di fondamentale importanza sono l'alimentazione e i fattori che la condizionano; in relazione al grado di inquinazione presente nelle materie prime di cui si ciba, l'animale assume quote variabili di metalli pesanti e altre sostanze (Friberg *et al.*, 1986); ecco perchè le specie onnivore risultano esposte a numerose fonti di contaminazione. Le piante, ad esempio, assorbono dal terreno piccole quantità di metalli come piombo e mercurio; il cadmio, viceversa, è più facilmente assorbito dalle piante e le radici, così importanti nell'alimentazione del cinghiale (Klein-Langenhoff e Vetter, 1986; WHO 1992).

### 1.10.2.Clima e stagione

Il clima e la stagione possono influire entrambi sulla dieta e, quindi, di conseguenza, sull'assunzione di metalli pesanti da parte dell'animale. Bisogna tenere presente, infatti, che questi due parametri subiscono cambiamenti paralleli l'uno all'altro; in ogni stagione, difatti, assistiamo a climi diversi, ciascuno contraddistinto da fenomeni atmosferici caratteristici. Così le maggiori precipitazioni si osservano normalmente in inverno e autunno e queste, come visto in precedenza, possono alterare il pH del suolo e determinare dilavamento delle rocce; mentre la primavera e l'estate consentono, grazie all'aumento delle ore di luce e delle temperature e la diminuzione delle precipitazioni, lo sviluppo di determinate popolazioni vegetali che assorbono dal terreno metalli e altre sostanze diversamente da quelle invernali. Ad esempio, in autunno si sviluppano alcuni tipi di piante e di funghi che accumulano metalli pesanti più di quanto lo facciano altre specie vegetali (Tataruch, 1993).

Tutto ciò è valido solo per quei metalli, come il piombo e il mercurio, caratterizzati da brevi periodi di ritenzione negli organismi animali; per altri, come il cadmio ad

esempio, le differenze stagionali vengono mascherate dall'elevata emivita biologica e dall'accumulo crescente con l'età. In questo modo, come è stato osservato da Pokorny e Ribarič-Lasnik (2002) in uno studio sui caprioli, i tassi di piombo e mercurio nei tessuti animali possono risultare elevati a fine estate-inizio autunno rispetto a quelli riscontrabili in inverno.

D'altra parte è conosciuta la tendenza che hanno alcune specie animali, soprattutto quelle che vivono alle latitudini elevate, ad accumulare riserve corporee durante l'estate e adattare il proprio organismo alle basse disponibilità alimentari, in termini di energia e proteine, durante l'inverno (Parker *et al.*, 1996); questo aspetto si riflette direttamente sull'ingestione di alimento e, quindi, sull'assunzione di metalli pesanti e altre sostanze.

### 1.10.3. Età e sesso

Le concentrazioni di alcuni metalli pesanti nei tessuti animali subiscono un incremento con l'età. Questo fenomeno, ad esempio, è ritenuto quasi costante per il cadmio ed è, ad ogni modo, indice di esposizione cronica a basse dosi di metallo (Wolkers *et al.*, 1994). Il cadmio, infatti, possiede un lungo periodo di emivita sia nell'ambiente (circa 12 anni; Kreuzer e Rosopulo, 1981) che negli organismi viventi (dai 10 ai 30 anni; Pokorny e Ribarič-Lasnik (2002); in questi ultimi si assiste, infatti, ad una lentissima escrezione e ad una ritenzione prolungata di metallo, ciò fa ritenere che non esista alcun meccanismo omeostatico che regoli le concentrazioni di cadmio negli animali (Decker *et al.*, 1958; Cotzias *et al.*, 1961; Miller *et al.*, 1969).

La tendenza del cadmio ad accumularsi con l'età in diverse specie animali è confermata da numerosi Autori (Frank *et al.*, 1981; Hödrejärv e Ott, 1983; Frank, 1986; Wolkers *et al.*, 1994; Falandysz, 1994; Kottferova e Korenekova, 1998; Beiglböck *et al.*, 2002). Le opinioni sugli altri metalli sono, invece, discordanti; Hödrejärv e Ott (1983) affermano, in uno studio svolto sugli alci, che anche il piombo e lo zinco incrementano le proprie concentrazioni renali con l'età, cosa che, per il piombo, viene smentita, o perlomeno non osservata, da Frank *et al.*, (1981) e da Wolkers *et al.* (1994).

Gli altri metalli traccia (Zn, Cu e Fe) non subiscono incrementi dei livelli organici in funzione dell'età; possono risentire di questo fenomeno solo i tassi di rame a livello del fegato, che è l'organo principale di accumulo del metallo. Così riportano Hyvarinen e Nygren (1993) in uno studio sulle alci in Finlandia.

Non esistono, per quanto riguarda il sesso, prove sicure di accumulo differenziale di metalli pesanti nei due sessi. Beiglböck *et al.*, (2002) ritrovano livelli di cadmio

maggiori in caprioli femmine che in maschi della stessa età. Hyvarinen e Nygren (1993), nelle alci, rilevano concentrazioni di rame più alte in fegati di maschi rispetto a quelli di femmine, spiegando questo col passaggio di metallo ai feti negli individui di sesso femminile. Hödrejärv e Ott (1983), al contrario, non riscontrarono, in alci di sesso diverso, nessuna differenza nelle concentrazioni di metalli.

Se discordanti sono le opinioni sulla diversa distribuzione e accumulo dei metalli pesanti nei due sessi, i danni irreversibili, provocati da alcuni di essi, come cadmio e piombo, a livello di testicolo e di apparato genitale femminile, accolgono un unanime consenso (Venugopal e Luckey, 1978; Friberg et al., 1986; Xu *et al.*, 1996; Damek-Poprawa e Sawicka-Kapusta, 2003).

#### 1.10.4. Presenza di altri metalli

E' noto come lo zinco eserciti un'influenza sull'assorbimento di cadmio da parte dell'organismo (Venugopal e Luckey, 1978). Allo stesso modo il cadmio e il piombo, anche se in minor misura, possono interferire nell'assorbimento e nel metabolismo di zinco, ferro e rame, oltre che di altre sostanze fondamentali come il calcio (Lee e Jones, 1976; Doyle e Spaulding, 1978; Webb, 1979; Friberg et al., 1986; Tsuchiya, 1986; Huebers *et al.*, 1987; Kunifuji *et al.*, 1987). Solo elevate concentrazioni di cadmio inducono cambiamenti nei livelli di rame, zinco e ferro, come indicato dal ritrovamento di livelli normali di metalli essenziali associato a quote non trascurabili di cadmio (Wolkers *et al.* 1994).

Questi concetti si rendono notevolmente importanti anche nell'eventualità in cui sia necessario impostare programmi di detossificazione da metalli tramite l'utilizzo di varie sostanze, tra cui metalli essenziali e vitamine.

## **1.11.PIOMBO E ANATIDI**

### **1.11.1.Distribuzione ambientale del piombo**

Il Saturnismo è una delle più frequenti intossicazioni presenti in natura, come risultato di molti anni di attività cinegetiche dell'uomo che hanno portato ad una dispersione nell'ambiente di pallini da caccia e piombini per la pesca, riconosciuti oggi come i maggiori responsabili di questo tipo d'intossicazione.

Dal 1800 è conosciuto, in Nord America, come causa di morte negli uccelli acquatici (Cook and Trainer, 1966). La perdita annuale di uccelli acquatici in Nord America è stata stimata da Bellrose (1959) aggirarsi tra il 2-3% della popolazione presente, circa 2 milioni di animali (Friend, 1987).

Per capire quanto possa essere rilevante la problematica del saturnismo derivante dall'ingestione di pallini da caccia e quindi quale possa essere l'impatto sulle dinamica di popolazione e la conservazione dell'avifauna acquatica, ricordiamo che il Canadian Wildlife Service ha stimato che sino a 6 milioni dei circa 60 milioni di anatidi di interesse venatorio che migrano dal Canada negli Stati Uniti sono soggetti all'ingestione di uno o più pallini da caccia e di questi, ogni anno, muoiono in media 200.000-360.000 individui per gli effetti di saturnismo o sono soggetti (diversi milioni) ad effetti subletali (Scheuhammer & Norris, 1995). Annualmente vengono disperse nell'ambiente, solo in Canada, circa 2.000 tonnellate di cartucce, con diverse centinaia di migliaia di pallini per ettaro presenti nei primi 20 cm di terreno ai quali alcune specie di uccelli con becco lungo possono accedere, e circa 2 miliardi a livello mondiale (Scheuhammer, 1991). Questi dati, così rilevanti, hanno portato gli Stati Uniti, fin dal 1991, a vietare l'uso di pallini di piombo per la caccia all'avifauna acquatica (anatidi, folaga americana e specie che con queste ultime concorrono a formare limiti di carniere aggregati), costituendo aree designate "*Non-toxic shot zones*" nelle quali è ammesso l'utilizzo di cartucce a pallini con certificazione "*Non-toxic*" (acciaio, bismuto/stagno, tungsteno/ferro). Se la ditta produttrice di queste leghe "alternative" supera una pubblica procedura di accertamento e raccolta dati, basata su metodologie standardizzate disciplinate per legge, per valutare la non tossicità del materiale esaminato nei confronti della fauna, in comparazione con pallini di piombo e acciaio, l'U.S. *Fish & Wildlife Service* ne autorizza l'utilizzo. Test di dosaggio differenziato con utilizzo di Germani Reali domestici per periodi di 4 e 14 settimane, test comparati *in vitro* per studiare la corrosione dei pallini in ambiente acido predeterminato, e analisi degli organi delle anatre trattate rappresentano i successivi accertamenti da compiere.

La concentrazione di piombo varia, nel Parco Naturale del delta dell'Ebro (Spagna), da 60 a 748 pallini per ettaro. Il 27% della popolazione di Germano Reale risulta colpita da avvelenamento, ciò significa, in termini assoluti, che 10.000 individui su una popolazione di 36.500 germani risultano affetti da saturnismo, di questi si stima che circa 2.500 muoiano per avvelenamento ([www.provincia.rovigo.it](http://www.provincia.rovigo.it))

Se venissero riferiti alle specie di anatre tuffatrici che per motivi ecoetologici risultano ancor più soggette all'ingestione dei pallini di piombo, questi dati e le relative stime potrebbero essere ancora più elevati.

In Italia la situazione non è certamente trascurabile, annualmente vengono disperse nell'ambiente sino a 25.000 tonnellate di pallini, in seguito alla sola attività venatoria, ed in alcune aree campionate è stata rilevata la presenza di livelli elevati di questi, fino ad oltre 120/m<sup>2</sup> (Tinanelli e Tirelli, 2000).

<b>LOCALITA'</b>	<b>ANNO CAMPIONATO</b>	<b>DENSITA' PALLINI (n/mq)</b>
<b>Saline Margherita di Savoia (FG)</b>	1993	63-127
<b>Stagni contigui Saline di Cervia (RA)</b>	1995	47-71
<b>Valli di Comacchio (RA,FE)</b>	1995	4-43
<b>Laguna di Marano (UD)</b>	1994	42
<b>Laguna di Orbetello (GR)</b>	1994	32
<b>Palude Diaccia Botrona (GR)</b>	1994	8-20
<b>Delta del Po (RO,FE)</b>	1995	0-20
<b>Valle Bertuzzi (FE)</b>	1995	0-19
<b>Laguna di Grado (GO)</b>	1994	0

([www.provincia.rovigo.it](http://www.provincia.rovigo.it))

Sebbene, a seconda delle condizioni chimico-fisiche locali, possano essere necessarie decine di anni affinché avvenga la degradazione totale, il piombo metallico dei pallini da caccia depositato sul suolo e nei sedimenti delle zone umide non è inerte né dal punto di vista chimico né da quello ambientale.

Il tasso di erosione, ossidazione e scioglimento dei pallini di piombo è funzione di molte variabili ambientali: condizioni aerobiche in ambiente acido accelerano il tasso di dissoluzione, mentre condizioni alcaline e anaerobiche lo diminuiscono. Il piombo, quindi, in condizioni di basso pH, contenuto organico, concentrazioni di sedimento sospeso e concentrazioni di sali di vari elementi quali calcio, ferro,

manganese, zinco e cadmio, risulta maggiormente solubile e disponibile per l'assorbimento (Eisler, 1988).

Il piombo che deriva dai pallini da caccia può essere trasferito alla componente biologica dell'ambiente, soprattutto agli invertebrati del suolo e del sedimento acquatico, nonché essere assorbito dalle piante e salire ai livelli superiori della catena trofica.

Quantità significative di piombo possono essere accumulate dagli invertebrati acquatici, tra i quali Molluschi Bivalvi (per es. *Modiolus demissus*, *Mya arenaria*, *Anodonta implicata*) e Gasteropodi, Crostacei e Insetti (per es. *Chironomus*), che possono arrivare a concentrare livelli sino a 1000-9000 volte superiori rispetto alla presenza di piombo nella colonna d'acqua circostante (Spehar et al., 1978, Peterson et al. 1993, SAAMI 1993).

Nelle acque è di solito presente in forma solubile ( $PbCl_2$ ) o insolubile ( $PbCO_3$ ), e in maggior concentrazione nei fiumi rispetto al mare.

Nell'aria la solubilità aumenta in correlazione alle dimensioni delle particelle stesse, raggiungendo, al diminuire del diametro di queste, il 90%,

Allo stesso tempo, solitamente in forma insolubile come carbonato ( $PbCO_3$ ), solfato ( $PbSO_4$ ) o solfuro ( $PbS$ ), il piombo è comunemente presente nei sedimenti atmosferici (Whitten, 1987; Manninen & Tansakanen, 1993).

### 1.11.2. Modalità di penetrazione

Riconoscendo i pallini da caccia come una delle principali cause di saturnismo negli anatidi, due sono le principali modalità di assunzione di questi ultimi: la prima strettamente legata alle abitudini etologiche e alimentari degli uccelli che vivono in ambiente umido, in modo particolare degli Anseriformi (anatre, oche, cigni), che ricercano l'alimento setacciando col becco il fondale fangoso. Questo si traduce nell'ingestione accidentale di pallini di piombo, simili al grit per dimensione, specialmente in habitat deficitari di gastroliti, con conseguente avvelenamento dell'animale.

Il pallino viene quindi degradato dall'acidità gastrica, e successivamente assorbito a livello intestinale entrando nella circolazione sistemica attraverso il sistema portale. Conseguenza della diretta attività venatoria dell'uomo è, invece, la seconda modalità.

Il piombo, dopo il passaggio a livello ematico, si accumula in organi vitali (fegato, rene) e nelle ossa dalle quali, in particolari stati metabolici come l'ovodeposizione, può essere successivamente mobilizzato per demineralizzazione, inducendo episodi di tossicità acuta.

Si può quindi parlare, per questi animali, di saturnismo primario senza dimenticare che le specie predatrici, ad esempio gli uccelli rapaci, possono andare incontro ad una forma secondaria, a seguito dell'ingestione di animali feriti da cartucce ed abbandonati e quindi facili prede. In questo caso il piombo ingerito diviene altamente solubile poiché il pH a livello di ventriglio si aggira tra 1.0 e 2.0. (Benson et al., 1974).

### 1.11.3. Segni clinici

L'intossicazione da piombo può manifestarsi, clinicamente, in forma acuta o in forma cronica; la prima si ha dopo ingestione di un'ingente quantità di pallini (oltre 6) in breve tempo e porta a morte l'animale in pochi giorni, spesso senza comparsa di segni clinici; la forma cronica, invece, si manifesta a seguito d'ingestione di un esiguo numero di pallini, in un arco di tempo relativamente lungo.

La gravità e la presenza della sintomatologia sono proporzionali alla quantità di piombo ingerita, al tempo di permanenza a livello gastroenterico e alla superficie della particella.

La quantità di piombo dissolta dal pallino e il quadro clinico conseguente possono, inoltre, essere influenzati direttamente dalle caratteristiche qualitative dell'alimento. Quando gli animali sono trattati con 4 pallini di piombo e successivamente alimentati con mangimi molli commerciali (come piante acquatiche), essi manifesteranno una intossicazione di tipo cronico, senza calo del peso corporeo e con mortalità non elevata, poiché questo tipo di alimento ha una scarsa azione sull'attività del ventriglio e di conseguenza una minor quantità di piombo viene erosa ed assorbita. Si osserva, invece, un'intossicazione ad andamento acuto, con perdita di peso e mortalità elevata negli animali, ugualmente dosati, ma alimentati con alimenti solidi come frumento; questo avviene in dipendenza della notevole quantità di piombo liberato dalla sollecitazione del ventriglio, causata dalla tipologia dell'alimento stesso. La somministrazione giornaliera di 10 g di "terriccio" è in grado di portare a 76,6% la quota di piombo escreta negli animali alimentati con mangime e solo al 30% in quelli alimentati con granaglie (Sanderson et Irwin, 1976).

La forma d'intossicazione più comune negli Anseriformi e negli uccelli selvatici in genere, è quella cronica. Nelle popolazioni selvatiche, poiché non sempre è possibile evidenziare un quadro clinico riconducibile a intossicazione da piombo, il più comune effetto riscontrato è una diminuzione della densità di popolazione.

Anoressia, letargia, debolezza muscolare, alterazioni posturali di testa e/o collo, edema a livello cefalico con tumefazione sottomandibolare, cadute a terra

accidentali, alterazione dei vocalizzi e depressione con diminuzione della risposta agli stimoli, rappresentano i primi segni riferibili a saturnismo. Sintomo caratteristico di questo quadro è la presenza delle penne della cloaca imbrattate di materiale verdastro come risultato di una profusa diarrea.

Dopo due settimane compare la paralisi dell'apparato digerente che impedisce la digestione di qualsiasi alimento ingerito, l'animale si presenta debole con conseguente difficoltà sia a volare che a camminare (con frequenti barcollamenti). La punta delle ali viene trascinata sul terreno o fatta galleggiare in acqua. Conseguenza del progressivo peggioramento dello stato paralitico delle ali e dei muscoli degli arti, è la perdita della capacità di camminare a lungo. Gli animali, in questa fase, sono facili bersagli di predatori in quanto oltre ad essere impossibilitati a fuggire data l'inedia fisica, rimangono isolati dai conspecifici fuori dall'acqua o tra la vegetazione senza seguire l'ondata migratoria.

Gli animali colpiti perdono progressivamente peso (dal 10% al 30%) ed appetito, lo sterno si fa prominente, si presenta atassia prima lieve poi grave; può comparire vomito o, occasionalmente un "gocciolo" giallastro dal becco che rimane aperto per lungo tempo, con la presenza di un lieve crepitio proveniente dalla gola. Nelle fasi più avanzate possono comparire convulsioni e cecità.

La morte sopraggiunge da 2 a 3 settimane dopo l'esposizione in caso di intossicazione cronica o in pochi giorni per la forma acuta.

In alcuni casi l'ingestione di pallini non porta a morte l'animale. Nei soggetti sopravvissuti si riscontrano, però, deviazioni comportamentali permanenti quali: incapacità di trovare un compagno, di costruire il nido durante l'accoppiamento, di deporre o occuparsi della prole (Pain, 1992).

#### 1.11.4. Anatomia patologica

Le lesioni anatomo-patologiche variano in funzione della specie considerata, del tempo di esposizione, della quantità di tossico ingerita, dei fattori ambientali e della dieta (Hoff e Davis, 1982).

Queste alterazioni sono quindi maggiormente presenti e gravi in casi d'intossicazione cronica rispetto all'acuta.

All'esame necroscopico gli animali sono emaciati, si può presentare edema sottocutaneo a livello di testa e collo ed atrofia a livello della muscolatura pettorale con un aspetto generale pallido. Questo imponente stato atrofico sembra una delle cause della notevole perdita di peso associato all'anoressia (Clemens et al., 1975).

In alcuni casi si riscontrano erosioni lineari multiple a livello della mucosa del ventriglio (Kelly et al., 1998).

Il tessuto muscolare si presenta atrofico e flaccido con assenza di grasso di deposito; la vescicola biliare si presenta con parete ispessita e dilatata di cinque volte rispetto al normale, mentre il fegato è atrofico con stasi biliare.

Il proventricolo è impacchettato, lo stomaco muscolare atrofico con superficie esterna friabile e contenente pallini di diverse forme e dimensioni date dall'effetto abrasivo locale. Può essere presente enterite anche con andamento necro-emorragico per infezione secondaria da *Clostridium perfringens*; degenerazione miocardica multifocale e idropericardio, depositi di urati a livello renale; anemia e pallore generale del corpo.

Il saturnismo deve essere sospettato in presenza, presso un'area interessata da pesante area venatoria, di un gruppo di animali emaciati, con diarrea verdastra e testa edematosa, rilevata in autunno o inizio inverno (Hoff et Davis, 1982).

#### *1.11.4.1. Isto-patologia*

A livello renale si rileva nefrite da necrosi tubulare acuta, cellule tubulari epiteliali sfaldate ed inclusi intranucleari eosinofili a livello di cellule del tubulo contorto prossimale.

Le lesioni istologiche epatiche sono caratterizzate da congestione, necrosi, pigmenti contenenti ferro a livello di epatociti e cellule del Kupffer, gradi variabili di edema e degenerazione epatica (Hoff et Davis, 1982).

Può essere presente stasi biliare, con gravità variabile, considerata come indicatore morfologico del danno epatocellulare. (Kelly et al., 1998).

Il polmone presenta congestione ed emorragie.

A livello cardiaco troviamo necrosi puntiforme associata a necrosi ialina o fibrinoide della parete dei grossi vasi.

Lo stomaco muscolare è caratterizzato da necrosi puntiforme a livello dello strato muscolare, il pancreas presenta aree necrotiche irregolari.

Ai segni di danno neurologico sono correlabili demielinizzazione del nervo sciatico e del plesso brachiale.

I danni indotti dal piombo sono legati alla perossidazione lipidica che induce; le conseguenze maggiori di questa azione sono: danno alle membrane cellulari con anemia emolitica, aumento della permeabilità capillare con encefalopatie acute, alterazione della trasmissione sinaptica o demielinizzazione (Mateo et al., 2003).

Il quadro istopatologico è molto variabile e spesso le lesioni non compaiono nel loro insieme.

#### 1.11.5. Alterazione dei parametri ematici

Poiché il 90% del piombo circolante si trova a livello di globuli rossi, l'esame dei parametri ematici è un valido strumento per la diagnosi di intossicazione da piombo. In letteratura vengono considerati normali nelle anatre valori compresi tra 50 e 390 ppb (Ritchie et al., 1994).

A livello ematico è presente anemia con anisocitosi, poichilocitosi e riduzione del numero degli eritrociti. Lo stato anemico è causato dall'aumento della fragilità della membrana eritrocitaria e dalla diminuzione dell'emivita di questo.

E' evidenziabile un'alterazione dell'HCT che diminuisce significativamente del 36% in animali dosati con 4 pallini di piombo e deceduti; mentre ritorna su valori pretestati in quelli sopravvissuti al dosaggio (Kelly et al., 1998).

Si riscontra un aumento di AST e LDH correlabile al danno epatico associato all'incremento del valore di CPK riconducibile al danno neurologico indotto dal piombo.

La diminuzione dell'attività ALAD è un sensibile indicatore di intossicazione nelle anatre, relazionabile alle concentrazioni di piombo a livello ematico ed encefalico; a concentrazioni di 0,5 ppm nel cervello e 200 ppm nel sangue è correlato un decremento dell'attività ALAD del 75%. (Ritchie et al., 1994).

La riduzione della sintesi dell'eme ed un aumento della concentrazione ematica di protoporfirina IX sono le conseguenze a cui porta l'interferenza indotta dal piombo sull'attività ALAD

I livelli di Protoporfirina eritrocitaria (FEPP) e zincoprotoporfirina eritrocitaria (ZPP) sono considerati parametri attendibili per una valutazione di intossicazione da piombo nelle anatre, correlabili a intossicazione acuta per FEPP e cronica per ZPP. Il livello totale di protoporfirina non è considerato un effettivo indicatore di guarigione; si trova comunemente nelle intossicazioni con valori superiori a 400 ppm, mentre la sintomatologia nervosa compare per valori superiori a 500 ppm (Ritchie et al., 1994).

**TAVOLA SINOTTICA DEI PROVVEDIMENTI DI PREVENZIONE DEL SATURNISMO E DI  
TUTELA DELL'AVIFAUNA ACQUATICA IN ALCUNI STATI ESTERI**

<b>PAESE</b>	<b>DISPOSIZIONI IN VIGORE</b>
<b>Australia</b>	Istituite zone di caccia agli acquatici con uso di solo munizionamento non tossico; bando totale del piombo per la caccia agli acquatici nella regione del South Australia; allo studio un bando per l'intera Australia.
<b>Canada</b>	Bando totale, da parte del Ministero dell'ambiente, dell'uso di cartucce con pallini di piombo nella caccia agli acquatici, attraverso la regolamentazione federale sulle specie migratrici, a partire dal 1997.
<b>Danimarca</b>	Bando totale dell'impiego di cartucce con piombo nelle zone umide. Analogo bando per il tiro al bersaglio presso aree allagate e terreni agricoli.
<b>Finlandia</b>	Bando totale dell'uso di cartucce con piombo nelle zone umide, a partire dal 1996.
<b>Gran Bretagna</b>	Sperimentazione su base volontaria di forme di autoregolazione, con impiego di munizionamento non tossico a partire dal settembre 1995.  Dal settembre 1999 è proibito l'uso di cartucce a pallini di piombo sulla battigia, nei biotopi di conservazione speciale inclusi in apposito elenco, o per la caccia ad anatre, oche, beccaccino, piviere dorato in qualunque località.  Probabile estensione di queste norme in Galles, Scozia ed Irlanda del Nord.
<b>Norvegia</b>	Bando totale dell'impiego di cartucce con piombo nella caccia agli acquatici; L'Associazione dei Cacciatori Norvegesi ha acconsentito a future graduali riduzioni circa l'uso di munizionamento con piombo per altre forme di caccia.
<b>Olanda</b>	Bando totale dell'impiego di cartucce con pallini di piombo in tutte le forme di caccia.
<b>Svezia</b>	Istituite aree con impiego di munizionamento non tossico nelle zone umide; bandite le cartucce con piombo in tutti i siti della Convenzione di Ramsar.  Accordo con l'Associazione Svedese di Caccia Sportiva per l'esclusione delle cartucce con piombo in tutte le forme di caccia ricreativa (esclusi gli eventi olimpici), a partire dal 2000.

**TAVOLA SINOTTICA DEI PROVVEDIMENTI DI PREVENZIONE DEL SATURNISMO E DI  
TUTELA DELL'AVIFAUNA ACQUATICA IN ALCUNI STATI ESTERI (CONTINUA).**

<b>PAESE</b>	<b>DISPOSIZIONI IN VIGORE</b>
<b>Stati Uniti</b>	Bando totale di cartucce con piombo nella caccia agli acquatici in vigore in tutti gli Stati Uniti a partire dal 1991. Previsti futuri divieti delle cartucce con piombo nella caccia a fagiani, scoiattoli ed altre specie nelle zone umide dei Rifugi Federali ove è ammessa l'attività venatoria.
<b>Messico</b>	Istituite aree di caccia agli acquatici con munizionamento non tossico nello stato dello Yucatan, per la salvaguardia dei fenicotteri.
<b>Svizzera</b>	Definizione di zone di divieto di caccia con pallini di piombo sul lago di Costanza; il governo federale ha raccomandato l'uso di munizioni non tossiche per la caccia agli acquatici.
<b>Italia</b>	L'attuale legislazione venatoria italiana evita di prendere in considerazione il problema, giacchè le disposizioni sulla tutela degli habitat delle specie migratrici e sui mezzi per l'esercizio della caccia, contenute nella legge n.157/92, non contemplano regole per prevenire l'accumulo di notevoli quantità di pallini di piombo sul fondo dei laghi, stagni ed acquitrini. Sono in produzione munizioni a pallini di materiale diverso dal piombo (acciaio), che attualmente hanno un costo superiore a quelle tradizionali del 10-30%.

(www.gondrano .it)

## **1.12.METALLI PESANTI E TARTARUGHE MARINE**

Nonostante l'esistenza di una vasta letteratura riguardante il monitoraggio dei metalli pesanti negli organismi viventi, poco si sa su residui in tartarughe marine (Witkowski e Frazier, 1982; Davenport e Wrench, 1990). La maggior parte dei lavori riguarda il monitoraggio ambientale attraverso le uova di tartarughe marine (Stoneburner *et al.*, 1980; Clark e Krynitsky, 1985; Blumton *et al.*, 1990; Bishop *et al.*, 1991; Sakai *et al.*, 1995 Vazquez *et al.*, 1997).

Le ricerche sono soprattutto incentrate sullo studio di mercurio, cadmio e piombo valutati in fegato, muscolo e rene.

Le concentrazioni più alte sono rilevate in animali giovani, nei quali è stata trovata una buona correlazione tra i metalli pesanti (in particolare mercurio e cadmio) e il peso degli organi, mentre nessuna correlazione è stata rinvenuta negli adulti (Storelli *et al.*, 1998). Quello che gli autori hanno concluso è che il fattore condizionante le concentrazioni degli inquinanti è la maturità sessuale: la *Caretta caretta* raggiunge la maturità sessuale a circa 80 kg di peso. Questo periodo coincide con un aumento dell'attività ormonale, inducendo cambiamenti biochimici che possono alterare i processi metabolici responsabili dell'assorbimento e distribuzione dei metalli nei differenti tessuti (Bustard, 1972; Bruno, 1986; Storelli *et al.*, 1998). Sakai *et al.*, (1995) hanno monitorato i metalli pesanti nei tessuti e nelle uova di *Caretta caretta* dal Giappone, scoprendo che i metalli essenziali, quali ferro, zinco, manganese e rame, sono trasferiti dalla madre nelle uova. Questa cinetica era seguita, anche se con minore intensità, anche dai metalli tossici, come mercurio e cadmio. Walker (1976) stabilì che questo meccanismo di trasferimento poteva parzialmente spiegare perché femmine che depongono presentino concentrazioni di inquinanti (principalmente mercurio) più basse rispetto agli animali giovani.

Poiché tutte le tartarughe marine sono animali in pericolo, gli strumenti più largamente usati per la valutazione dei metalli pesanti sono le uova non schiuse. Ferro, zinco, manganese, cadmio e mercurio possono accumularsi nel tuorlo, mentre il rame è presente principalmente nel guscio; normalmente piombo, nichel e cobalto sono presenti a livelli inferiori al limite di determinazione (LOD). Perciò il tuorlo sembra essere la parte dell'uovo più importante dal punto di vista tossicologico.

Le concentrazioni di metalli nel tuorlo sono generalmente omogenee nella stessa nidiata; le variazioni tra i livelli di zinco, rame, cadmio e mercurio nei tessuti delle femmine e nel tuorlo non sono significativamente differenti, perciò

potrebbe essere possibile valutare le concentrazioni tessutali delle femmine usando le loro uova (Sakai *et al.*, 1995). In molti studi gli elementi più abbondanti sono stati zinco e ferro, probabilmente perché devono soddisfare le richieste di sviluppo embrionale; lo stronzio è altrettanto presente ad alti livelli, in quanto si comporta come il calcio, seguendo le stesse vie metaboliche e la stessa cinetica (Storelli & Marcotrigiano, 2000).

Anche il carapace è stato usato per il monitoraggio dei metalli: mercurio, zinco e manganese, aumentano le loro concentrazioni in buona correlazione con i livelli degli organi (Sakai *et al.*, 2000a).

Nelle tartarughe marine sono state studiate anche le variazioni in rapporto alla crescita e sono state individuate correlazioni con la lunghezza del carapace. Rame, zinco e cadmio mostrano livelli più alti in soggetti giovani di *Chelonia mydas* (animali più piccoli) e una diminuzione nelle tartarughe più vecchie; il ferro non ha fluttuazioni e per il mercurio non sono state trovate correlazioni. Una spiegazione per tali differenze potrebbe essere data dalle variazioni nella dieta tra animali giovani ed adulti: i giovani sono principalmente carnivori mentre gli adulti sono erbivori. La concentrazione di cadmio nelle piante è minore di quella presente nello zooplancton (Sakai *et al.*, 2000a). Una situazione simile è stata rilevata in *Caretta caretta* riguardo la concentrazione di Pb, Cr, Cd, Hg and Se, con giovani mostrandoti livelli più alti che gli adulti; solo l'As sembra, invece, avere un andamento inverso (Storelli *et al.*, 1998).

Essendo le tartarughe marine animali che vivono a lungo, esse possono essere considerate buone indicatrici della contaminazione del mare, anche se la mancanza di informazioni sull'età e il sesso dei soggetti rende difficile l'interpretazione dei dati (Caurant *et al.*, 1999).

## **2.INTERFERENTI ENDOCRINI**

(ENDOCRINE DISRUPTORS CHEMICALS- EDC)



## **2.1. DEFINIZIONE**

Negli ultimi decenni si è assistito ad un crescente interesse della comunità scientifica e dell'opinione pubblica relativamente ai potenziali effetti negativi derivanti da un'esposizione incontrollata ad un gruppo di sostanze chimiche classificate come tossiche ed inquinanti per l'ambiente, suscettibili di alterare il normale funzionamento del sistema endocrino degli animali e di quello umano. Tali sostanze chimiche vengono denominate con l'acronimo IE, dall'inglese ***Endocrine-Disrupting Chemicals*** o con l'acronimo IE ovvero **Interferenti Endocrini**

Con il termine di IE si intende quindi “una sostanza esogena, oppure una miscela, in grado di alterare la/e funzione/i del sistema endocrino, e di conseguenza provoca effetti avversi sulla salute in un organismo intatto, o sulla sua progenie, o su (sub)popolazioni” (European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife, 1996). Un potenziale IE, invece, è una sostanza esogena, oppure una miscela, che possiede proprietà che potrebbero essere sospettate di provocare un'alterazione del sistema endocrino in un organismo intatto, o sulla sua progenie, o su (sub)popolazioni (IPCS, 2002).

Le preoccupazioni riguardanti l'esposizione agli interferenti endocrini sono legate essenzialmente ad effetti avversi osservati in alcune specie selvatiche ed ecosistemi, ad un'aumentata incidenza di alcune malattie dell'uomo correlate al sistema endocrino e ad alterazioni di quest'ultimo osservate su specie da laboratorio dopo esposizione ad alcune sostanze chimiche presenti nell'ambiente. Queste evidenze sperimentali allarmanti hanno stimolato molti governi, organizzazioni internazionali, comunità scientifiche, industrie chimiche e gruppi di individui operanti a livello di pubblico interesse a stabilire programmi di ricerca, organizzare conferenze e workshops internazionali e ad istituire gruppi di esperti e commissioni per definire e valutare tutto ciò che può essere correlato all'azione degli IE, consentendo quindi di aumentare le conoscenze relative ai meccanismi d'azione e agli effetti di queste sostanze. Un esempio di questo impegno a livello globale è rappresentato dall'International Programme on Chemical Safety incaricato di procedere alla stesura di una valutazione dello stato dell'arte sull'effetto alterante che deriva dall'esposizione a sostanze inquinanti presenti nell'ambiente sul sistema endocrino dell'uomo e delle specie selvatiche e di laboratorio.

Gli effetti degli IE sulla salute umana e della vita selvatica furono resi noti per la prima volta nel 1962 da Rachel Carson e a partire da questa data le conoscenze sull'argomento sono notevolmente aumentate e con esse le preoccupazioni che ne derivano (IPCS, 2002).

## 2.2. GENERALITÀ

Gli IE comprendono un'ampia gamma di composti chimici che includono ormoni naturali e di sintesi, costituenti delle piante, pesticidi, reagenti impiegati nell'industria dei polimeri, sostanze contenute in prodotti di largo consumo e tutta una serie di sottoprodotti industriali ed inquinanti. Gli IE sono ampiamente dispersi nell'ambiente: alcuni sono persistenti, come i POPs (persistent organic pollutants, i più tossici sono le diossine), e caratterizzati da un'elevata mobilità per cui possono essere virtualmente ritrovati in ogni regione geografica; altri sono degradati rapidamente nell'ambiente o negli organismi viventi o possono essere presenti solo per brevissimi periodi ma in fasi critiche dello sviluppo.

Quando si valutano gli effetti di agenti interferenti del sistema endocrino è necessario valutare una complessa serie di parametri (Ashby, 1998; Ashby, 2000). Studi che chiaramente dimostrano una relazione del tipo esposizione–effetto hanno un valore elevato nel determinare l'impatto degli IE sulla salute umana e degli animali. Sfortunatamente molti degli studi e sistemi non sono caratterizzati da misure di esposizione veramente attendibili, comportando quindi un vero limite alla possibilità di trarre conclusioni scientificamente accettabili. Questo problema è soprattutto vero per quegli IE che vengono degradati rapidamente nell'ambiente o nel corpo umano: l'esposizione, quindi, che potrebbe avere causato un effetto avverso (per esempio un deficit riproduttivo) non sarà rilevabile al momento in cui la sua manifestazione clinica diventa evidente. Per tale ragione molti degli IE per i quali è possibile stabilire una connessione causa – effetto sono quelli biologicamente ed ecologicamente persistenti (come già visto le diossine, e poi ancora PCBs e DDT). I POPs sono noti per la loro tossicità e pericolosità per la salute umana e per gli ecosistemi: 12 di questi sono stati messi al bando da un trattato stipulato a livello mondiale e controfirmato da 115 Nazioni a Stoccolma nel Maggio 2001. La lista dei POPs non è esaurita: sono in corso processi per implementarla con altre sostanze pericolose, basandosi sempre su dati certi ed inequivocabili che dimostrano una relazione esposizione – effetto avversa, ovvero su dati che evidenziano o permettono di ipotizzare un'azione di questi composti attraverso un meccanismo multiplo di alterazione endocrina.

Uno dei maggiori aspetti da considerare quando si valuta l'impatto degli IE sulla salute umana e della vita selvatica, è se gli effetti riportati in letteratura rappresentano casi isolati od una risposta più generalizzata. Per esempio la diminuzione di popolazioni selvatiche adiacenti ad una sorgente puntiforme

significativa può non essere indicativa di risposte globali. Al contrario, effetti relativamente poco rilevanti sulla salute umana e della fauna potrebbero comportare un impatto elevato se questi fossero generalizzati nell'ambiente naturale. Si aggiunga, inoltre, il fatto che alcuni inquinanti hanno dimostrato di avere anche un'incidenza su malattie comuni di eziologia multifattoriale come infertilità, cancro, deficits neurocomportamentali. Risulta perciò ancora più difficile attribuire gli effetti, negli studi di epidemiologia tradizionale, agli IE, a meno che, questi effetti non siano riscontrati in un sufficientemente alto numero di individui.

Come già accennato, gli IE possono modulare il sistema endocrino attraverso una serie di meccanismi diversi.

E' largamente accettato il paradigma secondo il quale le risposte recettore-mediate coinvolgono il legame di un ormone al suo recettore specifico sulle superficie della cellula, nel citoplasma o nel nucleo, cui segue una serie complessa di eventi che portano a cambiamenti nell'espressione genica caratteristica per un ormone specifico (Birnbaum, 1994). Si pensa che questi cambiamenti nell'espressione genica rappresentino un evento cruciale nella regolazione della normale funzione biologica, inclusa la proliferazione cellulare e le risposte di differenziazione essenziali per il normale sviluppo e funzionamento di sistemi multi-organo. Poco, comunque, ancora si conosce sulla relazione tra questi eventi molecolari e gli effetti avversi sulla salute quali cancro o tossicità riproduttiva. Questa mancanza di conoscenza rappresenta forse il fattore più limitante nel valutare la relazione esposizione- risposta, in particolare dopo bassi livelli di esposizione a potenziali IE. L'impiego di approcci innovativi nell'epidemiologia molecolare e nei sistemi a modello animale potenzialmente possono portare informazioni addizionali ed attendibili per delucidare il ruolo di questi determinanti meccanicistici della specificità dell'esposizione a basse dosi a potenziali IE e per aggiornarne le valutazioni di rischio sugli effetti avversi.

Ci sono molti sistemi sperimentali disponibili per la valutazione delle interazioni tra composti chimici esogeni o di sintesi ed i sistemi ormonali, in particolare quelli che interagiscono con estrogeni, androgeni, tiroide e recettori per idrocarburi aromatici (AhRs) (Bolander, 1994). Comunque nel campo degli IE sono importanti anche interazioni tra sostanze chimiche ed altri sistemi recettoriali che includono il recettore dell'acido retinoico, sistemi a citochina e un numero di cosiddetti recettori orfani. In generale questi sistemi recettoriali sono molto conservati filogeneticamente suggerendo che i dati provenienti da modelli sperimentali e animali dovrebbero essere utili, sebbene non necessariamente definitivi, per stimare i rischi all'esposizione di IE.

Il meccanismo o il modo di azione degli IE non è limitato a quegli agenti che interagiscono direttamente con i recettori degli ormoni. Altri meccanismi di interesse riguardano l'inibizione della sintesi, del trasporto o del metabolismo di ormoni e l'attivazione di recettori attraverso diversi precursori.

Ci sono molti fattori che andrebbero considerati quando si utilizzano le informazioni sul meccanismo di azione degli IE nella valutazione del loro effetto sulla salute. Di particolare interesse è la specie specificità, la specificità interindividuale e quella verso i tessuti nelle vie di funzionamento endocrino. La risposta differenziale agli IE è stata osservata non solo tra specie differenti ma si estende a differenze inter individuali all'interno di una stessa specie come pure tra differenti tessuti. I meccanismi biologici e molecolari alla base di questa specificità sono molto diversi. I determinanti della specie specificità includono differenze che esistono tra le specie nel legare recettori, nell'espressione genica e nelle risposte cellulari verso composti ad attività endocrina. Le differenze interindividuali nelle risposte possono essere determinate a livello di polimorfismo genetico negli enzimi che metabolizzano ormoni e nei recettori ormonali. Fattori estrinseci come la dieta possono comunque influenzare la sensibilità dell'individuo verso IE.

### **2.3. MECCANISMI D'AZIONE**

La ricerca ha chiaramente dimostrato che gli IE possono agire a livelli diversi attraverso un meccanismo multiplo di azione (IPCS, 2002). Meccanismi recettore-mediati sono stati oggetto di molti studi, sebbene altri meccanismi (per esempio, legati alla sintesi, trasporto e metabolismo di ormoni) siano ugualmente importanti. Per molte delle associazioni riportate in letteratura relative all'esposizione agli IE e alle loro conseguenze biologiche, i meccanismi di azione sono ancora scarsamente compresi: questo fatto rende difficile la distinzione tra effetti diretti ed indiretti ed tra effetti primari e secondari, nonché indica che una certa cautela è necessaria nell'estrapolazione dai dati *in vitro* agli effetti *in vivo*, nella previsione degli effetti da serie di dati limitati *in vivo* e dall'estrapolazione da dati sperimentali alla situazione umana. Risulta quindi di fondamentale importanza determinare in quali condizioni gli effetti osservati risultanti da un'esposizione ad IE avvengono tramite meccanismi endocrino-mediati. Allo scopo sono stati delineati dei criteri che possono essere impiegati come base per attribuire un effetto ad un meccanismo endocrino-mediato. Nonostante una generale mancanza di conoscenza dei meccanismi di azione degli IE, ci sono molti esempi dove tale meccanismo è chiaramente correlato alle perturbazioni dirette della funzione endocrina e,

recentemente, agli effetti negativi registrati *in vivo*. Queste evidenze sperimentali hanno permesso, in prima istanza, di poter affermare che l'esposizione ad IE durante il periodo di "programmazione" del sistema endocrino può generare una disfunzione permanente di questo oppure della sensibilità a segnali stimolatori/inibitori, che l'esposizione in individui adulti può essere compensata da un normale meccanismo omeostatico senza quindi risultare in effetti rilevabile, che l'esposizione ad uno stesso livello di segnale endocrino durante differenti periodi di vita oppure durante stagioni diverse può produrre effetti differenti e che a causa di cross-talk tra le diverse componenti dei sistemi endocrini non è possibile prevedere a priori gli effetti in tessuti target endocrini. Data la mancanza della disponibilità di dati sperimentali, rimane difficile e controverso attribuire effetti avversi dovuti a meccanismi endocrino-mediati.

L'argomento più controverso riguardante gli IE è quello relativo alla relazione dose-risposta. Una ragione è che gli IE spesso si comportano simulando o opponendo resistenza all'azione di ormoni presenti naturalmente. Questi ormoni (frequentemente più potenti degli IE esogeni) sono presenti in concentrazioni fisiologiche, cosicché considerazioni dose-risposta per gli IE sono spesso differenti da quelle relative ad altri inquinanti chimici che non agiscono direttamente sul sistema endocrino. Le relazioni dose-risposta probabilmente variano a seconda delle diverse sostanze chimiche e dei meccanismi endocrini. Il tempo di esposizione è assolutamente fondamentale per la comprensione della relazione dose-risposta per gli IE sia per gli esseri umani che per la vita selvatica (IPCS, 2002).

#### **2.4. RELAZIONE DOSE-RISPOSTA**

L'argomento relativo alla relazione dose - risposta è forse il più controverso tra quelli riguardanti gli IE. Una delle ragioni è che gli IE spesso, come già detto, agiscono imitando o vanificando le azioni di ormoni presenti naturalmente. Questi ormoni sono già presenti a concentrazioni fisiologiche, così considerazioni di tipo dose-risposta per gli IE differiscono spesso da quelle per altre sostanze chimiche che non agiscono direttamente sul sistema endocrino (IPCS, 2002). Un recente workshop sull'argomento ha concluso che sebbene possano manifestarsi degli effetti a basse dosi, quegli effetti spesso non vengono replicati in modo consistente, perciò il loro significato tossicologico non è conosciuto (NTP, 2001).

Il tempo di esposizione è anch'esso un parametro critico della comprensione delle relazioni dose risposta per gli IE. L'eterogeneità della popolazione è un altro fattore importante nella valutazione dose-risposta.

La valutazione di questa relazione per gli effetti degli alteratori endocrini sarà più credibile quando l'informazione proviene da più fonti (per esempio studi di tossicità, studi meccanicistici ed epidemiologici e studi in campo).

## **2.5. FATTORI DI ESPOSIZIONE**

Ci sono molte sostanze chimiche nell'ambiente (pesticidi, prodotti chimici industriali e prodotti naturali) che sono attive dal punto di vista ormonale e che possono essere rilevate sia nella popolazione umana sia nella vita selvatica così come in campioni ambientali. Alcuni di questi persistono nell'ambiente, altri no; alcuni sono lipofili, sequestrati nei tessuti adiposi e secreti nel latte, altri possono essere presenti solamente per brevi periodi di tempo ma in fasi critiche dello sviluppo. La conoscenza dell'influenza dell'esposizione sulla vita umana e quella selvatica è ancora molto limitata (IPCS, 2002).

Gli inquinanti ambientali attivi a livello ormonale sono molto diversi tra loro per struttura e potenza. Per esempio, alcuni organo alogenuri (policlorobifenili (PCBs), diclorodifeniltricloroetano (DDT), policlorodibenzodiossine (PCDDs) e policlorodibenzofurani (PCDFs)), sospetti ECDs, mostrano, anche all'interno della stessa classe chimica, profonde differenze in potenza, persistenza biologica, ecologica e nel meccanismo di azione. Questa diversità rende estremamente complesso definire con precisione l'impatto di queste molecole sui sistemi endocrini degli organismi viventi. In natura inoltre esistono sostanze presenti nei vegetali che influenzano l'equilibrio ormonale (per esempio i fitoestrogeni), diffuse in modo ubiquitario e che in molti casi raggiungono concentrazioni molto più elevate rispetto ad agenti chimici di sintesi ad effetto simil-ormonale. Da un punto di vista di potenza i fitoestrogeni esercitano un maggiore impatto sul sistema endocrino rispetto a sostanze chimiche di sintesi. E' quindi importante considerare il grado di esposizione che la relativa potenza degli IE presenti nell'ambiente considerato (IPCS, 2002).

La vulnerabilità di differenti gruppi della popolazione sarà influenzata da fattori legati allo stile di vita, da fattori genetici (per esempio differenze metaboliche che possono determinare sensibilizzazione), da abitudini legate alla dieta e dall'età. Sebbene in linea generale si concordi sul fatto che la dieta probabilmente rappresenta la principale via di esposizione agli IE, la comunità scientifica ha intrapreso un approccio basato su una valutazione integrata dell'esposizione per cui vengono considerate anche la via dermica, quella inalatoria ed orale. L'esame dell'esposizione degli umani o della vita selvatica a sostanze chimiche multiple che

possono funzionare come IE è critica a causa di potenziali effetti sinergici, additivi od antagonisti: bisogna eseguire sia misure esterne (livelli nell'acqua, aria, suolo, alimenti...) che misure interne (concentrazione ematica, nelle urine, e in campioni di tessuti). A tal proposito le misure interne sono spesso sottostimate a causa del rapido metabolismo di qualche EDC (Elsby *et al.*, 2001). Questo significa che la quantificazione dei metaboliti o dei prodotti di degradazione nei campioni biologici è necessaria per la ricerca nel campo degli IE. Alcuni composti chimici rapidamente metabolizzati sono esteri ftalici, alchilfenoli, qualche PCBs, fitoestrogeni.

Ulteriori complicazioni nella corretta valutazione dei dati comprendono l'intervallo di tempo trascorso tra l'esposizione e l'effetto e la stagionalità (intesa come insieme dei fattori ambientali, fase del ciclo riproduttivo, ecc.), molto importante per quanto riguarda la vita selvatica, in particolar modo quando gli IE sono presenti nell'ambiente acquatico.

## **2.6. EFFETTI SULLA VITA SELVATICA**

Una completa o parziale inversione sessuale delle gonadi può essere causata da una precoce esposizione di uova, larve o animali giovani a estrogeni o androgeni (Burns, 1961; Hayes, 1998a, 1998b).

Inoltre, gli androgeni normalmente inibiscono lo sviluppo dei dotti femminili mentre favoriscono quello dei dotti maschili, viceversa per quanto riguarda gli estrogeni (Norris, 1997).

Gli estrogeni possono, poi, stimolare la sintesi delle ovoalbumine da parte delle cellule degli ovidotti degli uccelli (Schlinger and Saldanha, 1998) e anche la sintesi della vitellogenina (precursore usato dalle ovaie per sintetizzare le proteine del tuorlo che sono incorporate nell'uovo) da parte del fegato (LeFleur, 1998; Meyer, 1999).

Da ciò si deduce come gli interferenti endocrini che mimano gli estrogeni e abbiano azione antiandrogenica possano avere drastici effetti sulla vita selvatica durante lo sviluppo e la negli animali giovani. Tali effetti possono variare da blandi cambiamenti nella fisiologia e nel comportamento sessuale delle specie sino a differenziazioni sessuali alterate e permanenti (IPCS, 2002).

Molti dei dati provengono dal Nord America e dall'Europa. Le specie acquatiche (al vertice della catena alimentare) sono le più colpite, sebbene anche le specie terrestri non siano immuni da questo problema. Qualcuno degli effetti avversi osservati in certe specie sono probabilmente endocrino-mediati ma, in molti casi, il legame casuale tra esposizione e interferenza a livello endocrino non è ancora chiaro.

## **2.7. ENDOCRINOLOGIA E TOSSICOLOGIA ENDOCRINA**

Il sistema endocrino svolge un ruolo essenziale nella regolazione sia a corto che a lungo termine dei processi metabolici. La nutrizione, il comportamento e la riproduzione sono intrinsecamente regolati dal sistema endocrino, così come lo sono la crescita (scheletrica e muscolare), i visceri, il sistema cardiovascolare, il sistema renale e le risposte dell'organismo a tutte le forme di stress. Disordini di qualsiasi genere al sistema endocrino, comprendenti anche una sotto- o sovra-secrezione ormonale, comportano inevitabilmente l'insorgere di malattie che possono colpire anche più organi differenti e funzioni. Risulta chiaro, quindi, che la minaccia insita negli inquinanti ambientali che possiedono attività endocrina è potenzialmente seria. Comunque, il fatto che l'uomo e la vita selvatica siano esposti a tali sostanze non necessariamente significa che clinicamente manifestino disturbi rilevanti al sistema endocrino: molto dipende, infatti, dal livello e dalla durata dell'esposizione e dalla fase di sviluppo in cui questa è avvenuta.

In origine, si riteneva che il sistema endocrino consistesse solamente di ghiandole che secernevano gli ormoni nel sangue, che si dirigevano verso il tessuto target, si legavano a specifici recettori cellulari e producevano l'effetto desiderato. Ora, il concetto di "endocrino" è stato allargato a comprendere anche una serie di regolatori chimici come le sostanze secrete nel sangue da parte dei neuroni, definiti, talvolta, neurormoni (IPCS, 2002).

Il ruolo fondamentale di tutti i sistemi endocrini è quello di permettere una risposta dinamica e coordinata di un tessuto target distante a segnali originatisi in altri organi, ed in qualche caso, a stimoli esterni al di fuori del corpo. L'obiettivo primario è quello di mantenere una qualche forma di "omeostasi", evitando l'insorgere di oscillazioni pericolose nel sistema livello/risposta ormonale che possono altrimenti provocare effetti dannosi al metabolismo (Norman e Litwak, 1998).

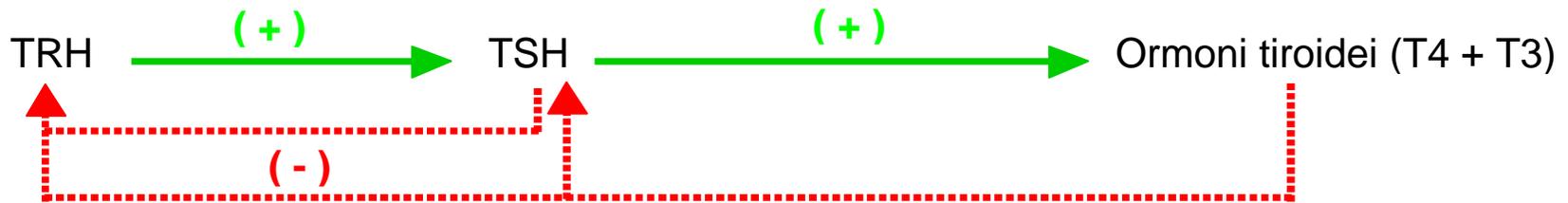
Il sistema endocrino funziona, in linea del tutto generale, sul principio del feed-back per il quale le cellule target inviano segnali feedback, di solito negativo, alle cellule regolatrici, con il risultato che la secrezione di ormoni stimolanti viene modificata da uno o più prodotti delle cellule target (Darlington e Dallman, 1995).

In particolare, i tre principali assi endocrini (tav. 2.7.1) che regolano lo sviluppo e l'attività riproduttiva sono l'asse HPG (ipotalamo-ghiandola pituitaria-gonade), l'asse HPT (ipotalamo-ghiandola pituitaria-tiroide) e quello HPA (ipotalamo-ghiandola pituitaria-ghiandola interrenale). Molte manifestazioni di un'alterazione endocrina colpiscono il sistema riproduttivo, soprattutto durante le sue fasi critiche di sviluppo.

Riguardo il potenziale impatto degli IE, è possibile giungere quindi alle seguenti considerazioni:

- l'esposizione negli individui adulti può venire compensata da un normale meccanismo omeostatico e può perciò non provocare alcun effetto rimarcabile;
- l'esposizione durante il periodo di sviluppo del sistema endocrino può invece provocare un cambiamento permanente di funzione o sensibilizzazione a segnali stimolatori / inibitori;
- l'esposizione ad uno stesso livello di segnale endocrino in differenti stadi di sviluppo od in diverse stagioni può provocare effetti differenti;
- a causa di interazioni (cross-talk) tra differenti sistemi endocrini, gli effetti possono non essere prevedibili.

**Asse Ipotalamo-ipofisi-tiroide (HPT)**



**Asse Ipotalamo-ipofisi-gonadi (HPG)**



**Asse Ipotalamo-ipofisi-ghiandola interrenale (HPA)**



Tav. 2.7.1.

### 2.7.1. L'asse HPG in specie non mammifere

I vertebrati non mammiferi differiscono enormemente dai mammiferi e tra loro per il modo di riprodursi, con casi di ermafroditismo, partenogenesi, viviparità e gonocorismo (van Tienhoven, 1983).

Inoltre, essi possono avere una frequenza di riproduzione più limitata. Alcune specie, per esempio, si riproducono una volta sola (semelpari), quando, altre, possono riprodursi una o più volte (iteropari).

Inoltre, il periodo di attività delle gonadi può essere molto corto in tal caso queste rimangono quiescenti per la maggior parte dell'anno. Come è ancora possibile osservare, in numerose specie, la riproduzione dissociata, dove lo sviluppo testicolare e ovarico avvengono in momenti diversi dell'anno (Houck and Woodley, 1994).

Tuttavia, gli assi HPG di questi animali sono sorprendentemente simili per il modo in cui agiscono, per i meccanismi di feedback e per gli ormoni coinvolti, a quelle che si osservano nei mammiferi (Norris, 1997; Bentley, 1998).

Il rilascio dell'ormone GTH è controllato in tutti i non mammiferi da un GnRH, molecola decapeptide simile a quella dei mammiferi (Sherwood et al., 1994; Sower, 1998).

Esistono almeno due forme di GnRH, ma la seconda (normalmente indicata come GnRH-II del pollo perché isolata la prima volta in questa specie) funziona principalmente come neurotrasmettitore o neuromodulatore e influenza probabilmente i comportamenti riproduttivi più che l'asse HPG.

Inoltre molti teleostei presentano nel cervello tre forme di GnRH.

Una maggiore differenza si osserva nel trasporto del GnRH nei pesci teleostei che mancano di un sistema portale ipotalamo-ipofisi tra l'ipotalamo e la ghiandola pituitaria e mostrano una diretta penetrazione degli assoni GnRH nell'adenipofisi.

Un sistema portale manca anche nei pesci agnati, nei quali la diffusione è il metodo di trasporto del GnRH (Gorbman et al., 1999).

Esistono due diversi ormoni GTH non direttamente omologhi a LH e FSH dei mammiferi. Il primo, chiamato GTH-I, è responsabile della crescita delle gonadi e della formazione dei gameti. Il secondo, GTH-II, è coinvolto nel rilascio dei gameti. Tra i tetrapodi (anfibi, rettili, uccelli e mammiferi), solo i rettili squamati (lucertole e serpenti) sembrano avere un singolo GTH FSH-simile, mentre tutti gli altri producono entrambi i GTH FSH-simili e LH-simili.

In generale, il testosterone è il principale androgeno prodotto da tutti i vertebrati come l' E2 è il principale estrogeno.

Molti teleostei maschi producono anche il 11-ketotestosterone che in molte specie rappresenta l'androgeno circolante predominante. Le femmine di teleosteo producono anche testosterone, tanto da poter avvicinare i livelli in circolo dell'E<sub>2</sub>.

I teleostei producono, inoltre, importanti molecole progesterone-simili, 17 $\alpha$ , 20 $\beta$ -P e 17, 20 $\beta$ ,21 tridrossi-4-pregnen-3-one che causano la maturazione finale dell'ocita e l'ovulazione, che in altri sono stati dimostrati essere indotti dal corticosteroide desossicorticosterone prodotto dalle cellule della corteccia delle surrenali.

I tetrapodi non mammiferi producono testosterone, E<sub>2</sub> e progesterone che giocano tutti un ruolo riproduttivo simile a quello osservato nello sviluppo e riproduzione dei mammiferi. tutti i tetrapodi producono poi un androgeno secondario che è il DHT.

Le femmine di anfibio, come i teleostei, al contrario di rettili e uccelli, mostrano alti livelli sia di androgeni che di estrogeni durante il periodo riproduttivo. I meccanismi dell'azione degli steroidi sulle cellule bersaglio e le caratteristiche degli stessi sembrano essere simili a quelle dei sistemi dei mammiferi anche se esistono numerose differenze. Per esempio, accanto al ER-  $\alpha$  e ER- $\beta$ , nei teleostei è stato identificato un terzo sottotipo l'ER-  $\gamma$  (Hawkins et al., 2000).

Inoltre i recettori progestinici dei teleostei differiscono da corrispondenti mammiferi nella loro affinità di legame per gli steroidi e non legano molti degli EDC che si legano ai recettori progestinici dei mammiferi (Pinter and Thomas, 1997).

### 2.7.2. L'asse HPA in specie non mammifere

Nelle specie non mammifere l'organo omologo della corteccia surrenale è la ghiandola interrenale, anche definita, proprio per sottolinearne l'analogia funzionale, adrenocorticale (Vinson *et al.*, 1993; Bentley, 1998). In seguito a segnali di varia natura l'ipotalamo rilascia dei fattori di stimolazione CRH-simili che inducono l'adenipofisi a produrre ACTH al quale le interrenali rispondono con il rilascio di cortisolo (nella maggiorparte dei pesci) o di corticosterone (nella maggiorparte degli anfibi, uccelli e rettili e una piccola quantità anche nei pesci teleostei). Da ciò l'asse HPA è chiamato asse ipotalamico-pituitario-interrenale. L'asse HPA regola la risposta allo stress ed ha un effetto immunodepressivo, analogamente a quanto avviene nei mammiferi (Iwama *et al.*, 1997; Schreck, 1996; Gaillard, 1994). L'organismo può anche adattarsi alla presenza di stress ed avere normali livelli di concentrazione ormonale. Normalmente, finché persiste lo stimolo, l'asse HPA risponde con l'emissione di cortisolo. In casi estremi ciò potrebbe portare ad esaurimento dell'asse HPA e a morte; animali cronicamente

stressati possono presentare l'asse HPA attivato ma livelli di glucocorticoidi normali o solo leggermente aumentati. Anche se molti non mammiferi hanno dimostrato secernere un CRH mammifero-simile, nei pesci, anche altri peptidi CRH-simili sono stati scoperti essere in grado di aumentare la secrezione di ACTH. Un particolare corticosteroide, l'1-idrossicorticosterone, è stato trovato tra gli elasmobranchi (squali e razze) anche se essi producono anche corticosterone. Nei teleostei, il cortisolo assolve anche il ruolo di mineralcorticoide e controlla l'equilibrio del Na<sup>+</sup> e del K<sup>+</sup>.

Anche se tutti i tetrapodi producono aldosterone, il suo ruolo nell'equilibrio salino non è ben studiato nei non mammiferi. I mammiferi presentano due recettori generalizzati per i corticosteroide localizzati in differenti cellule bersaglio, rispettivamente per i glucocorticoidi e per i mineralcorticoidi. Il numero dei tipi di recettori per i corticosteroidi negli altri vertebrati non è stato ancora esaminato a fondo.

### 2.7.3. L'asse HPT in specie non mammifere

L'asse HPT è molto simile per funzioni e struttura a quello dei mammiferi (Mc Nabb, 1993; Norris, 1997). L'attivazione dell'asse HPT inizia con il rilascio di TRH da parte dell'ipotalamo, stimolato da vari tipi di input. L'ormone giunto all'adenoipofisi induce la liberazione di TSH che promuove la sintesi di T3 e di T4 nella tiroide. A sua volta il rapporto T3/T4 circolante agisce con feed back negativo sull'ipotalamo e sull'ipofisi inibendo il rilascio di TRH e di TSH. Anche la somatostatina ipotalamica inibisce il rilascio di TSH (Reed e Pangaro, 1995).

Ciò che differenzia il tessuto tiroideo dei pesci ossei da quello dei mammiferi è il fatto che nei primi i follicoli tiroidei non si organizzano in un unico organo ma sono distribuiti nel tessuto connettivo compreso tra il secondo ed il quarto arco aortico. Un'altra peculiarità dei pesci è che a livello ipotalamico il TRH non è il principale ormone stimolante il rilascio di TSH.

T4 e T3 sono fondamentali per la metamorfosi degli avannotti in forme giovanili, che comporta decisi cambiamenti non solo morfologici ma anche biochimici, controllati proprio da questi ormoni. Inoltre nei Vertebrati il normale sviluppo del sistema nervoso risente fortemente dell'equilibrio tiroideo tanto che nell'uomo l'ipotiroidismo, in particolare in fase prenatale, può causare cretinismo (Dickhoff *et al.*, 1990; Galton, 1992; Kikuyama *et al.*, 1993; Porterfield, 1994; Shi, 1994).

Ancora gli ormoni tiroidei lavorano in sinergia con l'ormone GH per fornire i maggiori gradi di crescita nei pesci negli anfibi adulti, negli uccelli e probabilmente

anche nei rettili anche se quest'ultimi sono stati meno studiati (Norris, 1997) e controllano la muta di salamandre e rettili. Infine, gli ormoni tiroidei sono importanti stimolatori della maturazione sessuale ed essenziali per gli eventi riproduttivi stagionali in una vasta varietà di animali (Norris, 1999).

#### 2.7.4. Cross-talk ed alteratori endocrini

La previsione delle conseguenze sulla riproduzione di una data sostanza chimica dall'attività od inattività sugli ormoni steroidei sessuali è tutt'altro che facile e chiara; infatti, quando un inquinante ambientale possiede una seppur debole attività steroidea, può anche manifestare altri effetti rilevanti. Così, l'attività tireotropica dei PCBs può risultare anche più importante di quella di deboli effetti estrogenici-antiestrogenici di questi composti quando si considera il loro potenziale impatto sul sistema riproduttore. Altri inquinanti, invece, possono esibire effetti sia antiandrogenici che estrogenici (per esempio i vari isomeri del DDT ed alcuni ftalati), che alterano la corretta interpretazione dei dati *in vivo*.

#### 2.7.5. IE e vita selvatica

##### 2.7.5.1. IE e rettili

La classe dei rettili è composta da una grande diversità di gruppi, compresi gli squamati (lucertole e serpenti), le tartarughe, i coccodrilli, gli alligatori e gli sfenodonti (tuatara). La loro storia evolutiva ha dato loro un'enormità di caratteristiche filogenetiche, anatomiche, fisiologiche e ecologiche uniche, che devono essere considerate quando si valutano i potenziali effetti degli IE (Lamb et al, 1995; Palmer et al, 1997; Crain e Guillette, 1998). Inoltre, i sistemi endocrini sono altamente diversificati all'interno di questa classe, rendendo particolarmente difficile prevedere le risposte fisiologiche di questa classe.

Questo background filogenetico ha portato ad una diversità di caratteristiche riproduttive e di sviluppo. Per esempio, anche se tutti i tuatara, le tartarughe e i coccodrilli sono ovipari, gli squamati si sono dimostrati essere sia ovovipari che vivipari (Palmer et al., 1997). Persino tra le specie ovipare, c'è una differenza significativa nell'anatomia dei tratti riproduttivi femminili (Palmer e Guillette, 1988, 1990, 1992). In tutte le specie di rettili, i nascituri sono copie in miniatura degli adulti, e non presentano stadi larvali. Le uova della maggior parte dei rettili ovipari sono seppellite; tale comportamento espone già in fase embrionale i piccoli: anche se un guscio circonda l'embrione, infatti, composti disciolti penetrano prontamente nell'uovo.

I rettili mostrano una varietà di meccanismi per la determinazione del sesso, compresa quella genetica e ambientale, come la TSD (Temperature Sex Determination), presente in tutti i coccodrilli, nella maggior parte delle tartarughe e in molte lucertole (Lance, 1994). Nei rettili con TSD, la temperatura di incubazione delle uova determina se i nascituri saranno maschi o femmine. Tuttavia esiste una grande variabilità di processi di TSD tra i rettili (Wibbels et al., 1998). Questa variabilità complica la comprensione delle potenziali influenze che gli IE potrebbero avere sulla determinazione del sesso nei rettili.

Gli ormoni steroidei (estrogeni e testosterone) si sono dimostrati capaci di sopravanzare gli effetti della temperatura sulla determinazione del sesso nelle specie TSD (Wibbels e Crews, 1995). Per esempio, la somministrazione di estrogeni esita nella determinazione del sesso femminile, sebbene le uova siano incubate a temperatura produttrice di tutti maschi. Allo stesso modo, diversi composti chimici ambientali (PCB, trans-nonacloro, cis-nonacloro, clordano, e p,p'-DDE) si dimostrano in grado di alterare la determinazione del sesso nelle tartarughe (Bergeron et al, 1994; Crews et al, 1995, Willingham et al, 2000). In più, PCB e clordano alterano anche i profili degli ormoni steroidei nei piccoli di tartaruga (Willingham et al, 2000).

Non del tutto chiaro risulta il meccanismo attraverso il quale ormoni e i presunti IE influenzano la determinazione dei sessi. Poiché il testosterone rappresenta il precursore di entrambi le E2 e il  $5\alpha$ -diidrotosterone, è stato ipotizzato che il fenomeno della TSD nei rettili risulti dalla competizione tra la  $5\alpha$ -reduttasi e la aromatasi (Crews e Bergeron, 1994; Jeyasura e Place, 1998). L'attività dell'aromatasi è associata a temperature che producono femmine in *Emys orbicularis*, *Dermochelys coriacea*, *Chelidra serpentina* e *Trachemys scripta* (Desvages e Pieau, 1992; Desvages et al., 1993; Rhen e Lang, 1994; Crews e Bergeron, 1994).

Inoltre, il trattamento con inibitori dell'aromatasi indica che questo è l'enzima chiave coinvolto nella determinazione del sesso in molti rettili (Jeyasuria et al., 1994; Richard-Mereier et al., 1995; Rhen e Lang, 1994 e Crews e Bergeron, 1994).

Oltre alla temperatura, altri fattori ambientali giocano un ruolo nella determinazione del sesso dei rettili e questi potrebbero ulteriormente mascherare le relazioni causa-effetto tra i potenziali IE e le alterazioni della funzione endocrina. Questi fattori comprendono alterazioni dell'ambiente idrico, i livelli di CO<sub>2</sub> e le alte temperature che portano ad una diminuzione del pH all'interno dell'uovo (Gutzke e Paukstis, 1983; Jeyasura e Place, 1998). Poiché la  $5\alpha$ -redattasi è fortemente pH- dipendente, la temperatura potrebbe agire indirettamente sulla differenziazione sessuale

alterando i livelli di Ph, che conseguentemente hanno effetti sulle attività degli enzimi chiave del metabolismo steroideo (Erchberger et al., 1992).

Le strategie alimentari dei rettili potrebbero aumentare la loro capacità di bioaccumulare le tossine ambientali. L'ecologia alimentare dei rettili spazia infatti dagli erbivori ai carnivori, con alcuni di questi ultimi che si trovano in cima alla catena alimentare.

Molti rettili, inoltre, come tartarughe, coccodrilli e grandi serpenti hanno un vita lunga, con aspettative di vita in natura che superano i 30 anni (Gibbons e Semlitsch, 1982; Congdon et al, 1983); questo fornisce il tempo necessario per una significativa bioaccumulazione di contaminanti ambientali nei loro tessuti. Infatti, i rettili hanno dimostrato di bioaccumulare e biomagnificare contaminanti a livelli uguali o superiori a quelli degli uccelli e dei mammiferi (Olafsson et al., 1983; Hall e Henry, 1992; Cobb e Wood, 1997).

#### *2.7.5.2 IE e pesci*

I pesci sono il gruppo di vertebrati più di successo, e mostrano un alto grado di eterogeneità nella loro fisiologia, anatomia, comportamento ed ecologia. Ci sono più di 3000 specie di pesci cartilaginei (elasmobranchi e chimere), oltre 20000 specie di pesci ossei (teleostei, dipnoi, e olostei) e poche specie di antichi pesci senza mandibola. Solo una piccola parte delle specie di pesci sono state studiate a fondo e i dati su ciprinidi e salmonidi (entrambi degli teleostei) dominano la letteratura.

I pesci si sono evoluti per abitare un range di ambienti acquatici (acqua dolce e marina) che differiscono per proprietà osmotiche. Sia la respirazione acquatica che la osmoregolazione possono contribuire ad un aumento dell'esposizione dei pesci agli IE. Il più alto grado di ventilazione dei pesci paragonato agli umani può aumentare l'esposizione della superficie respiratoria delle branchie ai contaminati acquatici (Van Der Kraak et al., 2001). Inoltre, altre caratteristiche delle branchie (il sistema di flusso contro corrente del sangue e dell'acqua, le sottili membrane epiteliali) possono incrementare l'assunzione dei composti dall'acqua e il loro trasferimento al torrente sanguigno.

I teleostei marini, data la loro natura ipotonica, bevono acqua di mare, il che può contribuire ad aumentare la loro esposizione ai contaminanti acquatici. Al contrario i pesci d'acqua dolce, iposmotici, non devono, muovono l'acqua contro il corpo, creando così una via di esposizione ai contaminati presenti nell'acqua.

I pesci presentano un alto grado di diversità nelle strategie riproduttive (Kime, 1998). La maggior parte dei pesci è ovipara, ma specie ovovivipare e vivipare sono largamente diffuse.

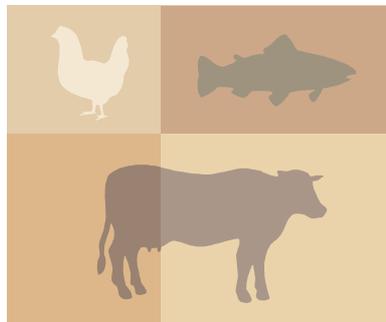
Una via di esposizione per gli avannotti è attraverso il trasferimento materno di xenobiotici idrofobici sequestrati nelle riserve lipidiche. Tale via può comportare un assorbimento maggiore rispetto a quello diretto dalla colonna d'acqua.

Inoltre, la limitata attività di biotrasformazione e degli enzimi escretori nei primi stadi di vita possono accentuare l'esposizione durante i periodi critici dello sviluppo (Der Kraak et al., 2001).

La plasticità sessuale rappresenta un'altra strategia riproduttiva di certe specie. Anche se i pesci sono normalmente gonocoristi (sessi separati), esistono anche gli emarfroditi funzionali (Serranidi e Sparidi), fenomeno non comune tra i vertebrati (Chan e Yeung, 1983).

In alcune specie di teleostei, in particolare nei pesci della barriera corallina, gli individui possono reversibilmente passare da un sesso funzionale all'altro in risposta all'ambiente (temperatura) e a segnali sociali (feromoni) (Stahlschmidt-Allner e Reinboth, 1991). Non è chiaro come la plasticità sessuale di alcune specie di pesce possa essere influenzata da contaminanti ambientali con proprietà di interferenti endocrini. Comunque, l'esistenza di questo cambio sessuale naturale implica come nei pesci non esista un imprinting ormonale irreversibile come avviene nel cervello fetale dei mammiferi.

### **3.VITELLOGENINA E VITELLOGENESI**



### **3.1. SINTESI DELLA VITELLOGENINA (VTG)**

L'embrione animale si sviluppa con successo se durante lo sviluppo gli viene fornito un quantitativo sufficiente di nutrienti (K. Rüdiger Mewes et al, 2002). La componente maggiore di questi nutrienti sono sostanze proteiche che gli animali ovipari accumulano negli oociti (Okuno A. et al, 2000).

Precursore di queste proteine è la Vitellogenina, una fosfo-glicoproteina che è sintetizzata principalmente nel fegato materno, eccezione fatta per gli insetti nei quali viene sintetizzata a livello di grasso corporeo (Raikhel A. S., 1987; Okuno A. et al, 2000) e trasportata per via ematica all'ovaio (K. Rüdiger Mewes et al, 2002)

La produzione di vitellogenina avviene normalmente nelle sole femmine in risposta alle variazioni fisiologiche del  $17\beta$ -estradiolo ( $E_2$ ) che avvengono durante l'oogenesi; nei maschi tale produzione è, in condizioni normali, assente, in quanto il gene preposto alla sintesi della proteina è mantenuto silente (Nancy C. Denslow et al., 1999).

La produzione di vitellogenina risulta quindi essere sotto un controllo ormonale.

Durante la stagione riproduttiva, infatti, l'ipotalamo produce GRH che agendo sulla ghiandola pituitaria determina la secrezione degli ormoni gonadotropici. Questi ormoni stimolano le cellule follicolari a produrre estrogeni (Skipper j.k., Hamilton T.H., 1977) e tra questi l'estradiolo  $17\beta$  agirà a livello epatico determinando la secrezione di vitellogenina (K. Rüdiger Mewes et al, 2002). Accanto all'estradiolo, altri ormoni sembrano entrare in gioco nella sintesi della VTG rivestendo il ruolo di modulatori; questi sono il progesterone, il testosterone, la prolattina e l'ormone della crescita (Rosanova et al, 2002)

Una volta secreta, la vitellogenina subisce, prima di riversarsi nel torrente ematico, considerevoli modificazioni post-transduzionali che comportano l'aggiunta di zuccheri, fosfati e lipidi collegati alla struttura peptidica, i primi con legami covalenti mentre i lipidi con legami non covalenti (Rosanova et al, 2002) La proteina si riversa quindi nel torrente ematico dove, nei maschi, permane fino alla degradazione e alla escrezione renale, mentre nelle femmine è portata agli oociti in via di sviluppo nei quali penetra mediante un processo di endocitosi mediato da recettori specifici (Nancy C. Denslow et al., 1999)

Alcuni autori (Craik 1978 a, b, c, d, 1979; Perez et al 1992, Prisco et al 2004) hanno proposto l'ipotesi che la sintesi della vitellogenina, in pesci cartilaginei, avvenga anche nelle cellule follicolari. Questa ipotesi può essere avvalorata dalla presenza di grandi vacuoli simili ai granuli di tuorlo presenti negli oociti e di un citoplasma caratterizzato dalla presenza di numerose cisterne di reticolo endoteliale rugoso e di

un esteso complesso del Golgi che suggeriscono un'intensa sintesi proteica e particolarmente di VTG. La partecipazione dei follicoli ovarici alla vitellogenesi è stata riportata anche da alcuni autori per anfibi e rettili (Ghiara e Limatola, 1980; Wallace, 1985; Andreuccetti, 1992). Il passaggio agli oociti sarebbe in questo caso garantito da "ponti" intracellulari (Prisco et al, 2004).

Una volta penetrata negli oociti, per endocitosi dal sangue se prodotta a livello epatico o attraverso ponti endocellulari dai follicoli, la vitellogenina viene scissa, mediante l'azione di alcuni enzimi quali la catepsina, nelle proteine del tuorlo, la lipovitellina e la fosfatina che vengono in seguito immagazzinate in granuli.

La produzione di vitellogenina, come detto, avviene di norma nelle femmine, durante la stagione riproduttiva ma i processi fin qui descritti possono aver luogo ugualmente sia nei maschi che nei soggetti immaturi per esposizione ad estrogeno esogeno o a sostanze che mimano l'azione degli estrogeni. Da qui la possibilità di utilizzare la vitellogenina come biomarker d'inquinamento da sostanze estrogeno simili (Fukada H. et al, 2003).

### **3.2. INDUZIONE DELLA VITELLOGENESI NEI PESCI DURANTE LA FASE DI CRESCITA O IN MASCHI ADULTI**

La produzione di VTG nei pesci, indotta in soggetti durante la fase di crescita o in maschi sessualmente maturi, è stata una delle più evidenti ed attendibili risposte biologiche alla loro esposizione agli IE (per esempio composti estrogenici) (Tyler e Routledge, 1998; Kime *et al.*, 1999). Attualmente sono stati studiati numerosi casi d'induzione di VTG nei pesci d'acqua dolce presenti in Europa, Giappone e Nord America. Le implicazioni di queste risposte, anche nelle specie marine in termini di vitalità e successi riproduttivi sono al momento ancora sconosciuti.

In Inghilterra è stato trovato che esemplari maschi di trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*) provenienti da acque contaminate da reflui industriali hanno elevati valori plasmatici di VTG (superiori a 147 mg/ml) uguali o addirittura al di sopra di quelli presenti nelle femmine mature (Purdom *et al.*, 1994). Lo stesso, anche se in termini meno accentuati, è stato osservato per carpe (*Cyprinus carpio*) immature. Lavori successivi a queste scoperte hanno dimostrato che numerosi fiumi del Regno Unito contenevano una concentrazione sufficientemente alta di composti estrogenici tali da indurre vitellogenesi nei maschi di trota arcobaleno (Harries *et al.*, 1996; Harries *et al.*, 1997). Oltre all'induzione di VTG, i pesci esposti ad acque reflue qualche volta hanno esibito epatomegalia ed una ridotto sviluppo testicolare. Nei casi esaminati il livello di vitellogenesi diminuiva progressivamente nei pesci

pescati a distanza via via maggiore dalla sorgente d'inquinamento, dove, cioè, i contaminanti attivi erano più diluiti (Harries *et al.*, 1999). E' stata osservata l'induzione di VTG nel plasma anche nel cavedano (*Leuciscus cephalus*) nel fiume Mosella in Francia nei pressi di scarichi di aree urbane (Flammarion *et al.*, 2000).

Ci sono molti esempi d'induzione di VTG in pesci d'acqua dolce esposti a scarichi fognari municipali. In Svezia nella bile di trote arcobaleno giovani, lasciate dimorare in reflui urbani per due settimane, si è riscontrata la presenza degli estrogeni naturali E<sub>2</sub> (17β-estradiolo) ed estrone e dell'estrogeno sintetico 17α-etinilestradiolo, mentre i livelli plasmatici di VTG erano particolarmente elevati, dell'ordine di 1.5 mg/ml (Larsson *et al.*, 1999).

Le alterazioni endocrine che colpiscono le popolazioni ittiche selvatiche dell'Europa, dell'Asia, dell'Australia e del Nord America sono quindi provocate da una varietà di meccanismi che includono oltre alle interazioni con i recettori ormonali, anche interferenze con la biosintesi di steroidi sessuali e perturbazioni nel controllo ormonale da parte della ghiandola pituitaria sui processi riproduttivi e surrenali (Norris, 1999; Scott e Sumpter, 1989). Comunque in molti casi il meccanismo preciso di azione è ancora scarsamente compreso. I composti responsabili degli effetti osservati possono essere sia naturali che di sintesi. Al momento quindi la conoscenza su come gli alteratori endocrini influenzino il benessere della popolazione ittica e non è ancora limitata.

## PARTE SPERIMENTALE



#### 4.STUDIO DEI METALLI PESANTI NEL CINGHIALE (*Sus scrofa*)



## 4.1 CENNI DI BIOLOGIA DEL CINGHIALE (*Sus scrofa*)

Il cinghiale appartenente alla famiglia dei **Mammiferi**, superordine degli **Ungulati**, ordine degli **Artiodattili** e famiglia dei **Suidi**, è un robusto animale progenitore di molte razze di maiale ([www.islepark.it/natura/fauna/cinghiale.htm](http://www.islepark.it/natura/fauna/cinghiale.htm)).

Vive nei boschi dell'Europa centrale e meridionale, in vaste zone dell'Asia e dell'Africa nord-occidentale. In Europa, in particolare, esistono tre sottospecie e più precisamente il cinghiale **Maremmano** (*Sus scrofa majori*), quello **Sardo** (*Sus scrofa meridionalis*) e quello **Centroeuropeo** (*Sus scrofa scrofa*) che rappresenta la sottospecie nominale. (<http://www.agraria.org/selvaggina/cinghiale.htm>).

Recentemente, il cinghiale si è imposto anche sul panorama naturalistico del nostro Paese, diffondendosi in ogni regione, con una maggiore presenza sul versante occidentale della penisola, specie nel settore centrale (Toscana-Umbria-Alto Lazio). (Corbett & Overden, 1985). (fig.4.1.)



Fig.4.1 Distribuzione del cinghiale a livello nazionale.

Da sempre è fortemente cacciato per la sua carne saporita e le prime testimonianze di caccia risalgono addirittura all' Età del ferro (IX secolo a.C.). questo però a fatto sì che il cinghiale giungesse, agli inizi del '900, sull'orlo dell'estinzione; fortunatamente, nel corso dell'ultimo secolo, anche per finalità sportive, questo animale è stato reintrodotta in molte regioni, con importazioni di razze più grosse e prolifiche e protetto da severe norme venatorie (Corbett & Overden, 1985).

Un maschio adulto, alto alla spalla circa 80 cm e lungo 150 cm, può raggiungere e facilmente superare i 100 kg di peso; la femmina, invece, è più piccola e il suo peso medio si aggira sui 60-70 kg (<http://www.onfc.org/territorio/specieanimalivegetali/specieanimali/ungulati.htm>).

Le zampe sono corte e sottili, la testa è allungata con occhi piccoli e orecchie grandi, la vista è poco acuta, ma l'olfatto e l'udito sono molto sviluppati (Corbett & Overden, 1985).

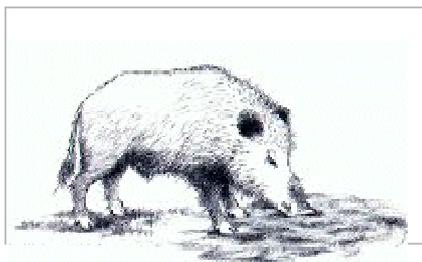
Il disco terminale del muso detto "Grifo", è rinforzato da una cartilagine durissima ed è molto mobile. Con questo strumento il cinghiale scava buche e solchi profondi in media 10-15 cm (<http://www.onfc.org/territorio/specieanimalivegetali/specieanimali/ungulati.htm>).

Le zanne, chiamate in termine tecnico "Difese", sono le due coppie di canini molto allungati ed incurvati (<http://www.onfc.org/territorio/specieanimalivegetali/specieanimali/ungulati.htm>) che nei maschi sporgono da entrambe le mascelle, possono raggiungere i 12-14 cm di lunghezza e sono utilizzati sia per "difesa" che per "offesa" (Corbett & Overden, 1985). La pelliccia si compone della **borra**, rappresentata da peli più sottili, folti, corti e lanosi che si sviluppano durante l'inverno, e dalla **giarra**, cioè setole scure e spesse, lunghe e setoliformi. Sulla nuca si trova una criniera e la coda è stretta e pendula.

Il mantello dell'adulto appare generalmente di colore nero-bruno scuro con brinature argentee sul muso e sulle spalle nei soggetti adulti od anziani (Bertusi M.G. e Tosetti T., 1986) i piccoli, invece, presentano, fino ai sei mesi, una colorazione rossastra con strie longitudinali giallastre ([www.romanatura.roma.it/flora\\_fauna/cinghiale.htm](http://www.romanatura.roma.it/flora_fauna/cinghiale.htm)) che facilita il mimetismo ([www.deliziatartufi.com/cinghiale.htm](http://www.deliziatartufi.com/cinghiale.htm)).

E' una specie prevalentemente notturna e crepuscolare, ma in luoghi appartati pascola anche di giorno.

Onnivoro, si nutre di ghiande, castagne, tuberi, bulbi, rape, cereali, frutta, piccoli invertebrati, uova, nidiacei di uccelli e anche ratti,anfibi,carogne, topi e conigli ([www.valnerinaonline.it/natura/cinghiale.asp](http://www.valnerinaonline.it/natura/cinghiale.asp)). Tipico è il "rooting", cioè l'abitudine di cercare cibo nel suolo usando il grugno per rivoltare il terreno (<http://www.agraria.org/selvaggina/cinghiale.htm>)



**Fig.4.2** Tipico comportamento di rooting

I maschi adulti vivono generalmente solitari e raggiungono le femmine, unite in branchi (un gruppo di 10 individui tra femmine, piccoli e subadulti (Corbett & Overden, 1985) nel periodo dell'accoppiamento.

Il periodo riproduttivo è dilatato nel tempo; i primi accoppiamenti avvengono già in novembre e gli ultimi in estate inoltrata. I piccoli nascono quindi fra dicembre e settembre.

I maschi sono alla continua ricerca di femmine in calore, di cui seguono i richiami olfattivi. Per la conquista ingaggiano lotte cruente, tramite spallate vigorose, spintoni e morsi sul collo. Terminato il periodo del calore i grossi maschi ritornano a fare vita solitaria mentre le femmine si appartano per partorire. Esse costruiscono il nido ammucciando foglie, erbe e zolle, fino a fare un ammasso del quale si infilano per partorire dopo 4 mesi di gestazione (<http://www.onfc.org/territorio/specieanimalivegetali/specieanimali/ungulati.htm>).

Partoriscono da 3-4 a 8-12 cuccioli che vengono svezzati a 2-3 mesi di età, a 5-6 mesi si rendono indipendenti pur continuando a seguire la madre fino al compimento del primo anno di età ([www.valnerinaonline.it/natura/cinghiale.asp](http://www.valnerinaonline.it/natura/cinghiale.asp)).

La maturità sessuale è raggiunta ad un anno e mezzo di età mentre i maschi raggiungono quella sociale a 4-5 anni.

Il cinghiale vive in natura fino ai 12-15 anni mentre in cattività può raggiungere i 20-25 anni ([www.valnerinaonline.it/natura/cinghiale.asp](http://www.valnerinaonline.it/natura/cinghiale.asp)).

## 4.2 MATERIALI E METODI

### 4.2.1. Campionamento:

Nell'ambito dei piani di controllo della specie con tecnica della battuta di caccia, l'abbattimento di cinghiali ha reso disponibili gli esemplari utilizzati per l'indagine. Gli interventi sono stati eseguiti tra i mesi di novembre 2001 e febbraio 2002 in zone appartenenti al comune di Monterenzio in provincia di Bologna, situate in bassa collina sulla parte destra del fiume Idice (fig. 4.3)

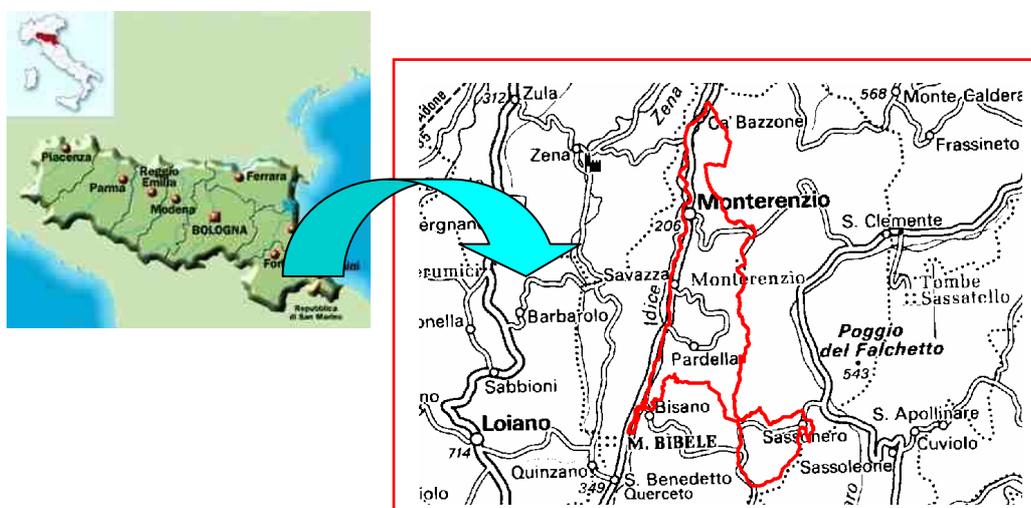


Fig.4.3 Localizzazione dell'area di studio

Tali aree sono caratterizzate da un'ampia copertura boschiva a latifoglie (58.3%), cui fanno seguito come percentuale di copertura le aree a seminativo (11.68%), eterogenee (11.68%), intese come aree in cui il 30% della superficie è cespugliato e la restante parte è zona aperta, e cespugliate (10.23%), come evidenziato in fig. 13. Queste caratteristiche rendono l'area estremamente vocata per il cinghiale. Va

inoltre tenuto presente che la presenza di aree urbanizzate e ancora di più di quelle industrializzate è estremamente ridotta (rispettivamente 4.63% e 0.69%).

Questi interventi hanno portato ad ottenere 21 esemplari, immediatamente eviscerati dopo l'abbattimento.

In sede autoptica, da ogni esemplare, ciascuno accompagnato da una scheda informativa indicante il luogo di provenienza, il sesso, l'età, la presunta causa di morte e i tutti i rilievi anatomico-patologici, sono stati prelevati campioni di organi, quali fegato, reni, testicoli, cervello, polmoni, milza, muscoli diaframma, massetere, della coscia, occhi e cuore, che, regolarmente identificati, sono stati posti in congelatore a -20°C in attesa delle analisi.

#### 4.2.2. Analisi dei metalli pesanti

I saggi analitici sono stati condotti su quantitativi di campione liofilizzato pari a 200±10 mg che, posti in provette di plastica opportunamente lavate con acido nitrico ed acqua, venivano successivamente addizionati di 2 ml di HNO<sub>3</sub> e 0,5 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In seguito venivano sottoposti a processo digestivo rapido con applicazione di calore in fornello microonde modello MLS 1200 della ditta Milestone; questo procedimento prevede 5 fasi termiche, riassunte in tabella 4.1.

Al termine del processo digestivo i campioni venivano portati a un volume di 10 ml per aggiunta di acqua bidistillata e le soluzioni ottenute erano mantenute in frigorifero a +4°C fino all'esecuzione delle letture analitiche.

Fase	Parametro		
	Potenza (W)	Tempo (min)	Azione
1	250	1	Ossidazione
2	/	1	/
3	250	5	Completamento dell'ossidazione
4	400	5	Completamento dell'ossidazione
5	650		Completamento dell'ossidazione

**Tab.4.1**

Tali analisi sono state condotte in spettrofotometria per assorbimento atomico utilizzando uno strumento Varian modello SpectrAA 600 corredato da un fornello di grafite ed uno strumento IL-11 Instrumentation Laboratories a fiamma di acetilene.

Le condizioni analitiche adottate sono riportate in tabella 4.2.

Per ogni singolo metallo si è provveduto a valicare la metodica analitica utilizzata ed in tabella 3 sono riportati, per tutti gli elementi, i valori dei principali parametri di validazione considerati: limite di sensibilità (LOD), percentuale di recupero (%) e coefficiente di variazione (CV).

Parametro	Metallo				
	Cadmio	Piombo	Rame	Ferro	Zinco
Lunghezza d'onda ( $\lambda$ ) nm	228.8	283.3	324.7	248.3	213.9
Temperatura di atomizzazione ( $^{\circ}$ C)	1500	2300	/	/	/
Volume del campione	20 $\mu$ l	20 $\mu$ l	7 ml	7 ml	7 ml
Modificatore di matrice	Palladio	Palladio	/	/	/

Tab. 4.2- Condizioni analitiche applicate.

Elemento	LOD (ng/g)	Recupero (%)	CV (%)
Cadmio	0.2	90	< 10
Piombo	0.5	90	< 10
Rame	5	98	< 10
Ferro	40	95	< 10
Zinco	10	95	< 10

Tab. 4.3- Principali parametri considerati nella validazione delle metodiche applicate.

#### 4.2.3. Analisi anatomo-istopatologiche

Campioni di fegato, rene, polmone, testicoli, milza e linfonodi degli animali abbattuti sono stati fissati in formalina di Carson, inclusi in paraffina, sezionati a 5 $\mu$  e colorati con ematossilina-eosina ai fini dell'esame istologico.

Come controllo sono stati visionati 10 preparati istologici di rene e fegato appartenenti a suini allevati che avevano fino ad 1 anno di età ed erano in buone condizioni di salute.

#### 4.2.4. Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata condotta con il programma SPSS mediante il test dell'analisi della varianza (ANOVA) applicato ai valori riscontrati in ogni singolo tessuto in funzione del sesso e della classe di età di appartenenza dei soggetti. Ogni qualvolta un dato analitico fosse risultato inferiore al LOD, a questo, per i soli fini statistici, veniva sostituito un valore pari alla metà del LOD stesso, al fine di poter

eseguire l'analisi statistica su tutti i dati disponibili. La significatività statistica è stata posta allo 0.05.

### **4.3.RISULTATI E DISCUSSIONE**

In tabella 4.4 viene riportata la composizione del campione in funzione dell'età (espressa come classe di appartenenza) e del sesso dei 22 soggetti utilizzati. Si ricorda che la classificazione in funzione dell'età degli animali è basata su quanto definito dall'Istituto Nazionale della Fauna selvatica e di seguito riportato: **classe 0**: lattinzoli, da 0 a 4 mesi, cuccioli che presentano un mantello a fasce longitudinali giallastre e marrone scuro (striati) mantenuto fino all'età di circa quattro mesi; **classe 1**: animali con età compresa fra 4 e 12 mesi (cosiddetti "rossi" o porcastri) caratterizzati dal mantello rossiccio che permane fino all'età di circa un anno; **classe 2**: soggetti con età compresa fra 1 e 2 anni (porcastroni/e); **classe 3**: soggetti da 2 anni a 5/6 anni (adulti, verri e scrofe), con mantello bruno scuro, che rappresentano la classe dei riproduttori; **classe 4**: soggetti da 6/7 anni in poi, definiti anziani (solenghi e scrofe).

<b>Parametro</b>		<b>N. soggetti</b>	
<b>Sesso</b>	<b>Classe di età</b>	<b>Per classe</b>	<b>Totale</b>
<b>Maschi</b>			14
	Classe 0	/	
	Classe 1	9	
	Classe 2	/	
	Classe 3	1	
	Classe 4	2	
<b>Femmine</b>			7
	Classe 0	/	
	Classe 1	2	
	Classe 2	/	
	Classe 3	1	
	Classe 4	4	
			21

Tab. 4.4- **Composizione per sesso e classe di età del campione utilizzato.**

La maggior presenza di soggetti di classe 1 è legata al fatto che la tecnica di caccia adottata, la braccata, comporta l'inseguimento di branchi di cinghiali, composti,

come già illustrato nella sezione riguardante la biologia della specie, da femmine accompagnate dai piccoli dell'anno e di quello precedente. È quindi più facile l'abbattimento di questi soggetti e ciò spiega questa relativa disomogeneità del campione; in realtà questa composizione riflette la reale struttura per età dei branchi, che prevede una certa preponderanza di soggetti giovani rispetto agli adulti.

Per quanto riguarda la strutturazione per sesso, va sottolineato come la preponderanza di maschi sia dovuta ad un'elevata presenza di questi nel campione di classe 1 (9 vs. 2 femmine); a testimonianza di come la tecnica di caccia possa influenzare la composizione del campione, ma rifletta d'altronde quella dei branchi braccati, si deve sottolineare come vi sia una notevole preponderanza di femmine nelle classi 3 e 4 (5 vs. 3 maschi in totale), a testimonianza dell'estrema difficoltà di abbattimento di soggetti maschi adulti (che vivono solitari) con questa tecnica di caccia.

#### 4.3.1. Risultati tossicologici

Le concentrazioni di metallo sono espresse sempre sulla base del peso secco e sono riportate come valore medio  $\pm$  errore standard; qualora, nel raffronto con la bibliografia, si presenti l'esigenza di confrontare dati relativi a concentrazioni espresse su peso fresco, queste ultime venivano convertite applicando coefficienti numerici prestabiliti e specifici per ciascun organo, secondo quanto indicato da Strand *et al.* (1995) e riportato fedelmente da Frøslie *et al.* (2001) e pari a **3,66** per il **rene**, **2,76** per il **fegato** e **3** per tutti gli **altri tessuti**.

I valori medi  $\pm$  e.s. e i range di variazione rilevati nei tessuti analizzati sono riportati in tabella 4.5 e nelle figure 4.3 e 4.4, mentre le tabelle 4.6 e 4.7 riportano gli stessi dati suddivisi in base all'età e al sesso dei soggetti.

Tessuto	Metallo				
	Cadmio (ng/g)	Piombo (ng/g)	Ferro (µg/g)	Rame (µg/g)	Zinco (µg/g)
Fegato	1099±125,9	2139,3±680,59	415,92±24,41	27,16±3,28	94,76±6,11
	568,4-2181,8	2,31-9793,5	250,85-659,24	11,41-51,76	67,21-155,37
Rene	7029,7 ± 1044,5	5,79 ± 2,71	303,01 ± 18,37	30,49 ± 2,59	74,35 ± 3,87
	1418,4-23939	< LOD-54,9	114,27-488,3	11,80-67,35	33,98-109,7
Cuore	53,69±11,46	399,09±147,37	188,84±13,58	16,93±0,51	52,84±2,68
	12,98-170,78	< LOD-2856,9	97,92-361,33	12,18-20,89	25,17-73,52
Cervello	8,21±3,68	25,7±10,19	72,36±8,27	16,19±1,16	46,16±7,17
	< LOD-38,44	0,62-89,66	40,47-120,4	6,47-21,68	30,23-121,4
Testicoli	16,77±6,94	23,78±3,98	113,99±13,98	6,71±0,93	53±4,71
	< LOD-52,2	8,73-40,5	79,18-177,07	3,42-10,19	40,35-71,43
Diaframma	16,10±4,19	347,36±145,64	167,2±19,15	7,48±0,58	93,75±7,22
	1,3-63,49	12,35-2389,9	64,77-363,68	2,53-11,18	29,6-132,17
Massetere	18,79±2,74	137,53±29,08	118,68±11,48	5,95±0,46	77,27±4,81
	2,75-42,66	0,25-321,85	57,07-248,1	2,97-10,58	36,96-113,3
Coscia	15,06±3,64	201,67±79,11	116,72±11,64	6,97±0,48	66,35±6,05
	< LOD-50,31	< LOD-1128,6	39,8-245,59	4,68-11,93	30,21-145,81
Occhio	29,71±7,03	319,85±133,94	118,56±13,89	10,08±1,55	42,09±4,24
	< LOD-105,76	< LOD-1897	38,12-273,27	1,76-24,34	10,44-69,76

**Tab. 4.5-** Concentrazioni medie ± e.s. e range di variazione rilevate nei tessuti di cinghiale analizzati.

Tessuto	Metallo				
	Cadmio (ng/g)	Piombo (ng/g)	Ferro ( $\mu$ g/g)	Rame ( $\mu$ g/g)	Zinco ( $\mu$ g/g)
<b>CLASSE 1</b>					
<b>Fegato</b>	736,1 $\pm$ 59,5- 568,4-1155,8	3229,4 $\pm$ 1089,8 6,32-9793,5	401,24 $\pm$ 30,04 250,85-534,05	20,5 $\pm$ 2,44 11,41-34,78	104,929,30 67,21-155,37
<b>Rene</b>	5025,6 $\pm$ 849 1418,4-16177	10,56 $\pm$ 4,69 < LOD-54,9	275,54 $\pm$ 23,91 114,27-488,29	36,97 $\pm$ 3,59 15,6-67,35	79,2 $\pm$ 5,08 43,26-109,69
<b>Cuore</b>	40,19 $\pm$ 8,06 12,98-94,81	568,35 $\pm$ 235,79 < LOD-2856,9	186,02 $\pm$ 21,11 97,92-361,33	16,86 $\pm$ 0,72 12,18-20,62	48,82 $\pm$ 4,07 25,17-73,51
<b>Cervello</b>	4,3 $\pm$ 3,86 < LOD-19,68	31,19 $\pm$ 17,51 0,81-89,66	57,92 $\pm$ 10,73 40,47-98,24	15,51 $\pm$ 2,37 6,47-19,96	60,85 $\pm$ 15,58 33,66-121,4
<b>Testicoli</b>	18,73 $\pm$ 11,17 < LOD-52,2	28,4 $\pm$ 5,47 8,73-40,5	123,58 $\pm$ 22,56 79,18-177,07	5,01 $\pm$ 0,82 3,42-6,17	43,64 $\pm$ 1,9 40,35-48,78
<b>Diaframma</b>	11,3 $\pm$ 2,86 1,3-34	512,73 $\pm$ 218,29 15,87-2389,9	191,57 $\pm$ 27,26 65,75-363,68	7,89 $\pm$ 0,81 2,53-11,18	89,15 $\pm$ 8,6 40,08-122,02
<b>Massetere</b>	16,93 $\pm$ 2,44 8,61-31,25	203,08 $\pm$ 32,83 6,55-321,85	124,43 $\pm$ 17,75 57,07-248,1	5,68 $\pm$ 0,68 2,97-10,58	75,70 $\pm$ 5,82 36,96-100
<b>Coscia</b>	17,5 $\pm$ 5,04 < LOD-50,31	279,57 $\pm$ 113,16 < LOD-1128,6	107,97 $\pm$ 11,81 39,80-164,23	7,04 $\pm$ 0,68 4,68-11,93	59,15 $\pm$ 4,67 30,21-82,82
<b>Occhio</b>	33,97 $\pm$ 9,07 < LOD-105,76	459,36 $\pm$ 190,17 < LOD-1197	106,32 $\pm$ 17,76 38,11-273,27	12,44 $\pm$ 2 1,76-24,34	45,86 $\pm$ 5,44 16,55-69,76

**Tab. 4.6-** Concentrazioni medie  $\pm$  e.s. e range di variazione rilevate nei tessuti di cinghiale analizzati suddivise in funzione dell'età dei soggetti.

Tessuto	Metallo				
	Cadmio (ng/g)	Piombo (ng/g)	Ferro ( $\mu\text{g/g}$ )	Rame ( $\mu\text{g/g}$ )	Zinco ( $\mu\text{g/g}$ )
<b>CLASSE 3</b>					
<b>Fegato</b>	1504,9	800,35	455,8	48,98	72,33
<b>Rene</b>	3361,3 $\pm$ 809,4 1748,3-4285,7	< LOD	444,61 $\pm$ 18,27 410,48-473	26,61 $\pm$ 5,95 17,2-37,62	59,42 $\pm$ 13,17 45-85,71
<b>Cuore</b>	31,06 $\pm$ 2,05 29-33,11	77,41 $\pm$ 77,41 0-154,83	191 $\pm$ 27,84 163,16-218,84	16,27 $\pm$ 0,64 15,63-16,91	58,2 $\pm$ 0,23 57,98-58,42
<b>Cervello</b>	< LOD	1,88	< LOD	17,32	33,69
<b>Testicoli</b>	20,14	17,4	93,88	7,09	71,43
<b>Diaframma</b>	37,32 $\pm$ 22,54 14,78-59,87	26,86 $\pm$ 14,51 12,35-41,36	160,82 $\pm$ 1,01 159,8-161,8	8,4 $\pm$ 1,49 6,91-9,89	119,96 $\pm$ 6,51 113,44-126,47
<b>Massetere</b>	12,87 $\pm$ 10,11 2,75-22,98	7,44 $\pm$ 7,19 0,25-14,64	130,08 $\pm$ 16,48 113,6-146,56	7,03 $\pm$ 0,21 6,83-7,24	86,39 $\pm$ 7,03 79,37-93,42
<b>Coscia</b>	1,76	63,1	106,8	7,23	91,75
<b>Occhio</b>	75,38	136,38	183,91	3,00	10,44

**Tab. 4.6 (continua)**- Concentrazioni medie  $\pm$  e.s. e range di variazione rilevate nei tessuti di cinghiale analizzati suddivise in funzione dell'età dei soggetti.

Tessuto	Metallo				
	Cadmio (ng/g)	Piombo (ng/g)	Ferro ( $\mu$ g/g)	Rame ( $\mu$ g/g)	Zinco ( $\mu$ g/g)

<b>CLASSE 4</b>					
<b>Fegato</b>	1575,5 $\pm$ 167,1	727,22 $\pm$ 199,87	431,28 $\pm$ 49,37	34,2 $\pm$ 5,55	83,26 $\pm$ 4,14
	928-2181,8	2,31-1261,1	335,91-659,24	19,9-51,76	74,19-96,36
<b>Rene</b>	11127 $\pm$ 2177,1	< LOD	307,23 $\pm$ 26,46	21,53 $\pm$ 2,82	70,92 $\pm$ 6,51
	1504,9-23939		220-459,71	11,80-36,25	33,98-104,87
<b>Cuore</b>	85,99 $\pm$ 30,82	196,03 $\pm$ 132,96	193,28 $\pm$ 20,26	17,26 $\pm$ 1,03	58,42 $\pm$ 2,61
	13,59-170,78	< LOD-811,92	118,23-253,57	14,98-20,89	51,24-69,08
<b>Cervello</b>	12,85 $\pm$ 6,36	24,98 $\pm$ 15,11	84,39 $\pm$ 10,51	16,57 $\pm$ 1,41	36 $\pm$ 1,72
	0,11-38,44	0,62-82,16	61,11-120,4	11,67-21,68	30,23-42,78
<b>Testicoli</b>	10,16 $\pm$ 6,5	15,46 $\pm$ 1,09	104,86 $\pm$ 24,9	9,07 $\pm$ 1,13	62,52 $\pm$ 2,87
	3,67-16,17	14,35-16,52	80,77-128,795	7,94-10,19	59,65-65,39
<b>Diaframma</b>	19,15 $\pm$ 11,59	78,68 $\pm$ 23,58	111,26 $\pm$ 14,99	6,14 $\pm$ 0,83	94,32 $\pm$ 17,79
	1,42-63,49	20,97-145,16	67,77-143,77	3,37-7,62	29,59-132,17
<b>Massetere</b>	25,25 $\pm$ 7,5	45,35 $\pm$ 28,72	101,49 $\pm$ 12,27	6,13 $\pm$ 0,65	77,07 $\pm$ 12,41
	4,43-42,66	0,25-158,1	69,11-143,58	4,38-7,64	45,6-113,3
<b>Coscia</b>	11,87 $\pm$ 4,48	42,42 $\pm$ 17,17	137,94 $\pm$ 30,29	6,76 $\pm$ 0,7	78,56 $\pm$ 17,78
	2,91-28,72	< LOD-100,37	75,35-245,59	5,07-9,06	44,03-145,81
<b>Occhio</b>	10,34 $\pm$ 1,87	21,71 $\pm$ 14,59	134,86 $\pm$ 22,38	6,31 $\pm$ 1,21	39,36 $\pm$ 4,51
	5,83-17,16	< LOD-73,26	85,18-219,3	3,27-9,23	28,12-53,86

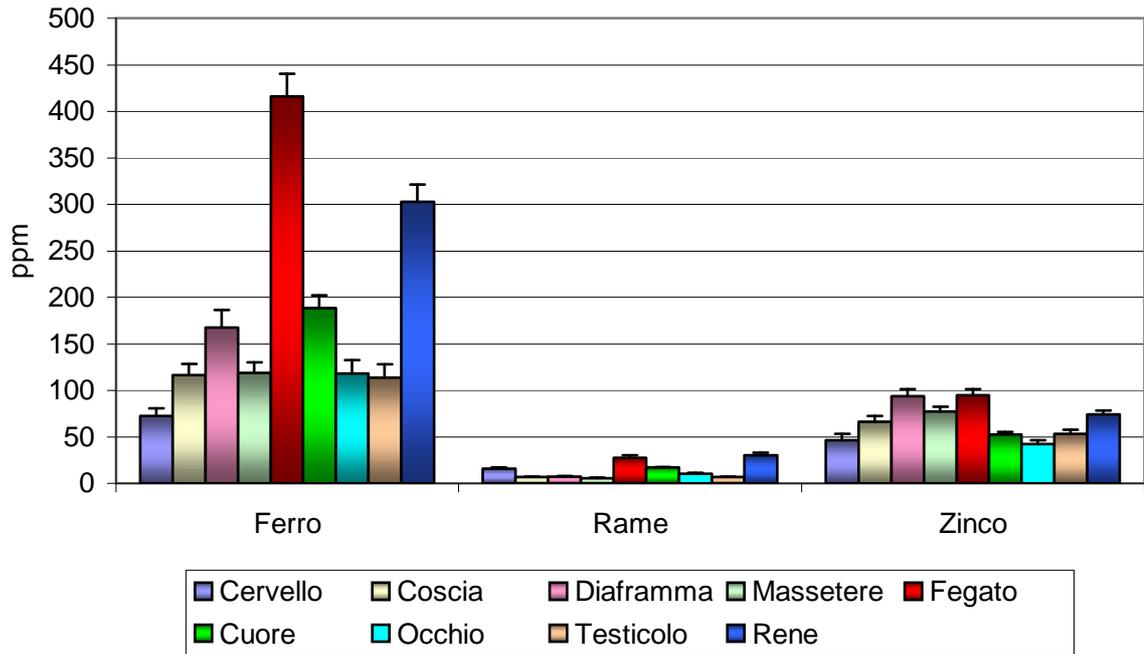
**Tab. 4.6 (continua)**- Concentrazioni medie  $\pm$  e.s. e range di variazione rilevate nei tessuti di cinghiale analizzati suddivise in funzione dell'età dei soggetti.

Tessuto	Metallo				
	Cadmio (ng/g)	Piombo (ng/g)	Ferro ( $\mu$ g/g)	Rame ( $\mu$ g/g)	Zinco ( $\mu$ g/g)
<b>MASCHI</b>					
<b>Fegato</b>	948,1 $\pm$ 123	2315,3 $\pm$ 932,1	422,85 $\pm$ 37,7	27,24 $\pm$ 4,31	98,30 $\pm$ 8,95
	568-1708	2,31-9793,5	250,86-659,24	13,05-51,76	67,2-155,37
<b>Rene</b>	5185,6 $\pm$ 832,4	9,85 $\pm$ 4,48	284,83 $\pm$ 26,61	29,37 $\pm$ 3,45	69,45 $\pm$ 4,98
	1504,9-16177	< LOD-54,9	114,27-488,297	11,8-67,35	33,98-109,69
<b>Cuore</b>	30,71 $\pm$ 5,52	262,53 $\pm$ 64,21	183,58 $\pm$ 12,05	16,12 $\pm$ 0,51	49,27 $\pm$ 3,77
	12,98-73,3	< LOD-606,9	97,92-237,43	12,18-18,31	25,17-73,52
<b>Cervello</b>	6,65 $\pm$ 6,36	31,05 $\pm$ 17,42	65,9 $\pm$ 14,35	15,11 $\pm$ 1,76	52,24 $\pm$ 14,36
	< LOD-38,44	0,62-89,66	40,46-120,39	6,47-17,77	30,23-121,4
<b>Diaframma</b>	13,4 $\pm$ 4,4	345,82 $\pm$ 200,95	164,04 $\pm$ 22,34	6,77 $\pm$ 0,71	86,57 $\pm$ 9,8
	1,3-59,86	12,35-2389	64,77-359,07	2,53-10,09	29,59-132,17
<b>Massetere</b>	16,64 $\pm$ 1,97	170,92 $\pm$ 36,18	126,48 $\pm$ 16,78	5,49 $\pm$ 0,65	78,43 $\pm$ 4,63
	8,9-31,12	0,25-291,99	64,44-248,1	2,97-10,58	53,88-100
<b>Coscia</b>	13,72 $\pm$ 4,72	193,2 $\pm$ 90,67	103,2 $\pm$ 9,99	6,93 $\pm$ 0,63	71,72 $\pm$ 7,65
	< LOD-50,31	< LOD-1128,6	39,8-164,23	4,68-11,93	30,21-145,81
<b>Occhio</b>	31,92 $\pm$ 7,29	312,64 $\pm$ 139,06	98,13 $\pm$ 11,85	11,3 $\pm$ 2,3	39,24 $\pm$ 5,64
	5,83-83,47	< LOD-1736,9	38,12-183,91	1,76-24,34	10,44-69,76

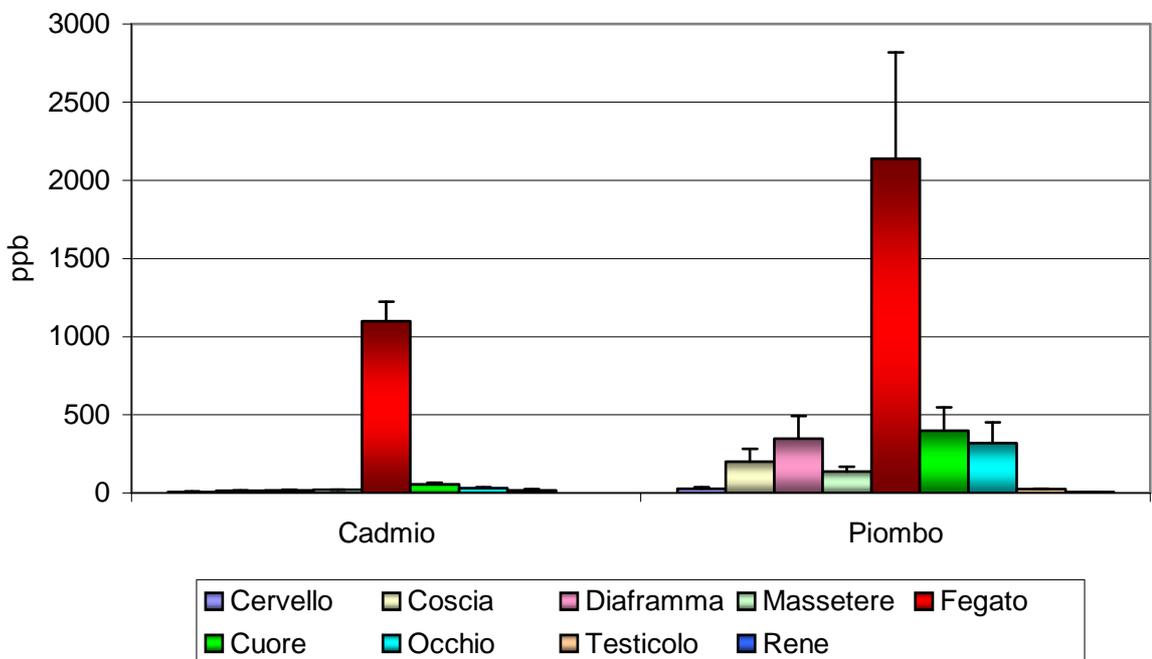
**Tab. 4.7-** Concentrazioni medie  $\pm$  e.s. e range di variazione rilevate nei tessuti di cinghiale analizzati suddivise in funzione del sesso dei soggetti.

Tessuto	Metallo				
	Cadmio (ng/g)	Piombo (ng/g)	Ferro (µg/g)	Rame (µg/g)	Zinco (µg/g)
<b>FEMMINE</b>					
<b>Fegato</b>	1350,4±247,4	1845,9±1035,2	404,36±21,43	27,04±5,5	88,86±6,87
	637,3-2181,8	406,54-6963,1	335,91-449,71	11,4-47,73	74,19-119,12
<b>Rene</b>	9583,1±2051,7	0,16±0,16	330,27±21,7	32,03±4,02	81,13±5,84
	1418,4-23939	< LOD-2,2	250,74-450,35	15,34-59,47	43,26-105,26
<b>Cuore</b>	93,1±23,76	633,2±386,55	197,85±32	18,2±0,9	58,96±1,95
	13,59-170,78	< LOD-2856,9	118,23-361,33	14,98-20,89	54,07-69,08
<b>Cervello</b>	9,78±4,25	19,28±9,85	77,74±10,04	17,27±1,53	40,08±2,38
	0,11-25,59	0,81-53,48	45,04-108,85	11,67-21,68	33,51-48,06
<b>Diaframma</b>	21,97±9,45	350,69±178,4	174,06±39,65	9,05±0,77	109,32±4,83
	1,42-63,49	29,91-1046,6	89,52-363,68	6,96-11,18	86,98-118,83
<b>Massetere</b>	22,17±6,44	85,05±44,51	106,43±13,48	6,68±0,5	75,45±10,58
	2,75-42,66	0,25-321,85	57,06-154,88	4,95-8,28	36,96-113,3
<b>Coscia</b>	18,54±4,9	223,67±177,38	149,16±28,5	7,09±0,67	52,4±6,1
	6,65-31,62	< LOD-930,21	75,35-245,59	5,06-8,68	35,86-72,09
<b>Occhio</b>	25,27±16,25	334,26±312,78	159,42±29,15	7,85±0,94	47,78±5,85
	< LOD-105,76	< LOD-1897	85,18-273,27	4,71-10,17	28,11-68,32

**Tab. 4.7 (continua)**- Concentrazioni medie ± e.s. e range di variazione rilevate nei tessuti di cinghiale analizzati suddivise in funzione del sesso dei soggetti.



**Fig. 4.3-** Concentrazioni medie  $\pm$  e.s. di ferro, rame e zinco ( $\mu\text{g/g}$  tessuto secco) rilevate nei tessuti di cinghiale analizzati.



**Fig. 4.4-** Concentrazioni medie  $\pm$  e.s. di cadmio e piombo ( $\text{ng/g}$  tessuto secco) rilevate nei tessuti di cinghiale analizzati.

#### 4.3.1.1.Ferro

Il ferro è il metallo essenziale più rappresentato negli organismi animali e, come tale, risulta il più concentrato nei tessuti dei cinghiali, come si evince dalla tabella 4.5 e dalla figura 4.3. L'analisi statistica evidenzia come le sole differenze significative ( $p < 0,05$ ) rilevabili per quanto riguarda questo metallo sono quelle relative ai contenuti di ferro a livello renale in funzione della classe di età dei soggetti e a quelli nell'occhio in funzione del sesso degli stessi. In particolare i soggetti di classe 3 presentano concentrazioni renali medie pari a  $444,61 \pm 18,27$  ppm, contro un valore di  $275,54 \pm 23,91$  e di  $307,23 \pm 26,46$  ppm rispettivamente negli esemplari di classe 1 e di classe 4 (tab. 6). A livello oculare (tab 7) invece le femmine presentano concentrazioni quasi doppie di metallo ( $159,42 \pm 29,15$  ppm vs.  $98,13 \pm 11,85$  ppm).

E' il **fegato** (tab. 4.5, fig. 4.3) l'organo principale di accumulo di questo metallo, con concentrazioni medie pari a 415,92 ppm; difatti è noto che il ferro si deposita a livello epatico sotto forma di ferritina e emosiderina. Valori medi decisamente più elevati, variabili da 638 ppm in cinghialetti di meno di 6 mesi, fino a 1216 ppm in adulti di più di 5 anni, sono riportati da Wolkers *et al.* (1994); tassi inferiori, pari a 171 ppm, sono stati ottenuti invece in Polonia da Falandysz (1994). Un livello medio di ferro nel fegato pari a 798 ppm è stato ritrovato in cinghiali olandesi in seguito a cessazione di supplementazione alimentare in aree ritenute poco adatte alle specie selvatiche, laddove prima della interruzione venivano registrate concentrazioni medie di 569,6 ppm (Groot Bruinderink *et al.*, 2000).

Nel suino domestico Falandysz (1993b) ha ottenuto livelli epatici simili a quelli dei cinghiali della stessa area (149 ppm). In altre specie selvatiche invece i tassi di ferro epatico sono inferiori rispetto a quelli del cinghiale. Nel capriolo, infatti, sempre Falandysz (1994) osservò livelli pari a 124,2 ppm; Holm *et al.* (1987), tuttavia, riportano concentrazioni medie di 331 ppm in Germania dell'ovest. Nel cervo sono descritti valori variabili da 351 a 506 ppm in animali di età diverse (Wolkers *et al.*, 1994); Falandysz (1994) trovò livelli fino a 140 ppm in cervi polacchi, mentre in Olanda Groot Buinderink (2000) ha recentemente riportato concentrazioni pari a 432 e 407 ppm prima e dopo la cessazione della supplementazione alimentare, rispettivamente.

Subito dopo il fegato, l'organo contenente più ferro è il **rene** (tab. 4.5, fig. 4.3), con una concentrazione media pari a 303 ppm. Si osserva, inoltre, una ripartizione omogenea di metallo fra corticale e midollare; un unico valore molto basso e discostante dalla media ( $55,31$  ppm) e per questo non inserito nel conteggio della

stessa, si reperta nella corticale renale di un animale femmina di classe 4, senza che, peraltro, esista una corrispondenza col valore della midollare del medesimo rene (285,85 ppm).

Falandysz (1994) riporta concentrazioni molto simili che vanno da 296,46 a 318 ppm, mentre Wolkers et al. (1994) ritrovarono livelli maggiori di ferro nei reni, variabili da 362 a 696 ppm in animali di età diverse.

Nei reni di maiali domestici si riportano tassi medi di ferro pari a 230,58 ppm (Falandysz, 1993b); i caprioli, parimenti, possiedono livelli renali simili a quelli del cinghiale (312,9 ppm), così come i cervi, con valori che vanno da 231 a 322 ppm secondo Wolkers *et al.* (1994) e da 234 a 248 ppm secondo Falandysz (1994).

Una concentrazione media di ferro pari a 188,84 ppm si rinviene nel **cuore** (tab. 4.5, fig. 4.3), organo muscolare contenente mioglobina, molecola proteica simile alla emoglobina, ma più piccola di essa, contenente ferro.

Nei **muscoli** (tab. 4.5, fig. 4.3) il ferro non raggiunge concentrazioni molto elevate, nonostante questi organi siano una fonte importante di questo metallo essenziale nella dieta umana (Falandysz, 1994). Si ricorda l'esistenza della mioglobina, proteina contenente un atomo di ferro, nei muscoli striati. Nel tessuto muscolare osserviamo valori medi di ferro pari a 134,2 ppm, con la concentrazione media più alta, pari a 167,2 ppm, nel diaframma; sempre nel muscolo respiratorio è registrato il valore massimo per i muscoli, pari a 363,68 ppm. Nel gruppo di muscoli della coscia si rinviene un unico valore molto elevato (691,08 ppm), non riportato nel calcolo della media, in un cinghiale maschio di classe 1.

Livelli inferiori rispetto a quelli da noi osservati (75 ppm), che rispecchiano le minori concentrazioni in tutti gli animali di quella zona della Polonia, furono ritrovati da Falandysz (1994); Zomborszky *et al.* (1996) riportano concentrazioni pari a 113 e 77 ppm, rispettivamente nei muscoli semimembranoso e lungissimus dorsi. Simili concentrazioni (98,7 ppm) vengono riportate da Strmisková e Strmiska (1992) per i muscoli della spalla. Gli stessi Autori hanno registrato concentrazioni medie dimezzate nel maiale domestico, pari a 55,2 ppm; ancor più bassi (39 ppm) sono i valori dei maiali in Polonia, così come riportato da Falandysz (1993b).

Per quanto riguarda le altre specie, Zomborszky *et al.* (1996) indicano il cervo come la specie con più alto contenuto di ferro nei muscoli, con concentrazioni medie di circa 180 ppm; Falandysz (1994) riporta valori di 93 ppm in cervi polacchi, mentre Strmisková e Strmiska (1992) rinvennero tassi di ferro inferiori rispetto ai cinghiali della stessa area, pari a 69,3 ppm. O'Hara *et al.* (2001) ritrovarono fino a 359 ppm in muscoli di alce in Alaska.

Dopo i muscoli, è l'**occhio** l'organo con più contenuto di ferro, con una concentrazione media di 118,56 ppm. Non di molto inferiore è il tasso medio di ferro (113,99 ppm) ritrovato nei **testicoli**, mentre il livello più basso si riscontra nel **cervello** (72,36 ppm). In quest'ultimo organo, tuttavia, si rinviene un valore di 207,07 ppm straordinariamente elevato rispetto alla media e per questo non tenuto in conto nel calcolo della stessa; è probabile che sia dovuto ad inquinamento durante le operazioni manuali che precedono le analisi tossicologiche, in quanto non si riscontrano in altri organi dello stesso animale (un maschio di classe d'età 3) concentrazioni similmente elevate.

Per quanto riguarda l'età, negli organi dei nostri cinghiali si è visto che questo parametro non influenza in alcun modo i fenomeni di accumulo di ferro, se si fa eccezione per il dato statisticamente rilevabile ( $p < 0,05$ ) ritrovato nel rene e sopra enunciato. Nella pubblicazione di Wolkers *et al.* (1994), tuttavia, si può notare come il metallo si depositi nel fegato e nei reni secondo quantità che aumentano con l'età degli animali; da un tasso epatico di ferro di 638 ppm presente in cinghialetti di meno di 6 mesi, si arriva, infatti, alle 1216 ppm in adulti di più di 5 anni, passando attraverso valori intermedi in animali di età comprese nel range appena menzionato. Lo stesso accade nel rene, dove si parte da 362 ppm in giovani sotto i 6 mesi, per arrivare alle 696 ppm presenti negli adulti.

Per ciò che riguarda l'accumulo di ferro in individui di sesso maschile e femminile, da questo lavoro risulta che, tranne nel fegato, in tutti gli organi analizzati il quantitativo di ferro è sempre maggiore nelle femmine piuttosto che nei maschi, nonostante si riscontri una statistica significativa solo per l'occhio. Le differenze fra le concentrazioni medie nell'uno e nell'altro sesso sono più o meno marcate a seconda dell'organo, risultando maggiori per occhio e rene e più contenute per cervello, cuore e muscoli. Per quest'ultimo tessuto, in particolare, il divario è più evidente nei muscoli della coscia, dove si osserva una concentrazione media di ferro pari a 149,16 ppm nelle femmine contro le 103,2 ppm dei maschi; lo scarto è di sole 10 ppm nel diaframma (174 contro 164 ppm), la situazione si inverte, invece, nei masseteri, dove risulta più alto il livello nei maschi (106 contro 126 ppm). La stessa cosa si rileva nel fegato: qui la concentrazione media di ferro nelle femmine è di 404 ppm, mentre nei maschi raggiunge le 422 ppm. Questi nostri rilevamenti non trovano riscontro nella letteratura, dove non viene mai evidenziata una disparità di concentrazioni di ferro nei due sessi.

#### **4.3.1.2. Zinco**

Lo zinco è, dopo il ferro, il metallo che presenta le concentrazioni più elevate nei tessuti dei nostri animali, come risulta dalla tabella 4.5 e dalla figura 4.3. Questo

aspetto è verosimilmente dovuto al ruolo essenziale svolto dallo zinco negli organismi animali; si ricorda, infatti, che esistono più di 300 enzimi contenenti zinco e che il metallo contribuisce a conferire particolari strutture a diverse proteine biologiche (Vallee e Falchuk, 1993). Tuttavia non sono mai state raggiunte le concentrazioni ritenute responsabili di manifestazioni tossiche (1000 ppm; NCR 1980).

L'analisi statistica evidenzia una sola differenza significativa ( $p < 0,01$ ) relativa al contenuto di zinco a livello testicolare, anche in questo caso rapportato alla classe di età dei soggetti: analogamente a quanto visto per il ferro, i soggetti di classe 3 presentano concentrazioni medie superiori alle altre due classi, e pari rispettivamente a 71,43 (non è riportato l'errore standard perché era disponibile un solo esemplare),  $43,64 \pm 1,9$  (classe 1) e  $62,52 \pm 2,87$  ppm (classe 4).

Le concentrazioni medie rilevate ricalcano il comportamento cinetico del metallo, che prevede una distribuzione ubiquitaria con prevalenza di accumulo nel fegato e nei muscoli (Venugopal e Luckey, 1978).

Le concentrazioni di zinco sono comparabili a quelle di altri studi. Tuttavia i valori in alcuni tessuti si presentano alquanto inferiori rispetto alla letteratura; ad esempio il tasso medio di zinco reperito nei tre gruppi di *muscoli* è pari a 79,12 ppm su sostanza secca, a fronte di 126 ppm riscontrate nel lavoro di Hecht (1986) e delle 111 ppm di cinghiali polacchi riportati da Falandysz nel 1994. Tale differenza viene ulteriormente avvalorata dal confronto col lavoro di Zomborszky (1996) svolto nel sud dell'Ungheria: in quegli animali, infatti, furono titolati da 107 a 178 ppm di zinco nei muscoli longissimus dorsi e semimembranoso rispettivamente.

Come paragone con il "cugino" domestico, Strmisková e Strmiska (1992) indicano nei suini oggetto del loro studio concentrazioni di zinco nei muscoli della spalla pari a 67,5 ppm; nello stesso lavoro si vide che i cinghiali selvatici possedevano, nel medesimo gruppo di muscoli, fino a 123 ppm di zinco, valore doppio rispetto a quello precedente. In questa pubblicazione il cinghiale viene indicato, assieme al muflone, la specie selvatica con più alto contenuto di zinco nei muscoli. Falandysz (1993b), infine, osservò valori molto simili (78 ppm) a quelli dei nostri cinghiali in suini domestici allevati in Polonia.

Prendendo in considerazione il *fegato* si può osservare come la tendenza generale venga confermata; alle 94,76 ppm trovate nei fegati dei cinghiali di Monterenzio si contrappongono le 170 ppm presenti in cinghiali olandesi di meno di 6 mesi (Wolkers *et al.*, 1994). Tassi epatici di zinco ancora più elevati (da 128 ppm a 203,3 ppm) sono stati reperiti da Von Launer *et al.* in Germania dell'est nel 1991.

Valori un po' più bassi e più vicini a quelli ottenuti in questo lavoro (118 ppm) sono stati pubblicati da Falandysz nel 1994 e riguardavano sempre cinghiali polacchi. Hecht (1986) riporta livelli di 125-126 ppm ritrovati in Germania che, come è evidente, superano di più di 30 unità quanto reperito nel presente lavoro. I valori riscontrati si avvicinano di più a quelli riportati in Polonia in uno studio effettuato sui caprioli e sui cervi (99 ppm; Falandysz, 1994). Nello stesso lavoro vengono riportati anche i tassi epatici di zinco riscontrati nei maiali domestici (138 ppm; Falandysz, 1993b): anche questi si discostano abbastanza da quelli osservati in questo studio. Tassi comparabili a quanto reperito in questo studio (93,84 ppm) furono ritrovati in bisonti canadesi da Macneil *et al.* nel 1987.

Il *rene* non si comporta in modo diverso; ad una concentrazione media di zinco di 74,35 ppm su sostanza secca ottenuta nel presente lavoro, si affiancano valori di 113,46 e 109,8 ppm riscontrati in cinghiali della Polonia del nord (Falandysz, 1994); in Germania dell'ovest, tuttavia, i tassi renali di zinco (88-95 ppm; Hecht, 1986) si avvicinano a quelli dei cinghiali oggetto di questo studio. Wolkers (1994) riporta concentrazioni renali di zinco che oscillano da 117 ppm a 140 ppm su sostanza secca in cinghiali olandesi di diverse età. Anche i maiali domestici sembrano possedere tassi renali più elevati di quelli qui calcolati nei cinghiali; la concentrazione media renale in questi animali oscilla intorno alle 109 ppm (Falandysz, 1993b).

C'è, infine, da notare che il metallo è più concentrato nella corticale renale rispetto alla midollare: la concentrazione media nel primo distretto è pari a 89,96 ppm, nel secondo è di 63,56 ppm. Questo ritrovamento trova accordo con il lavoro di Groot Bruinderink *et al.* (2000), i quali asseriscono che la corteccia renale offre indicazioni attendibili nel monitoraggio dei livelli di zinco e rame, così come fa il fegato per il ferro.

Per quanto riguarda i livelli di zinco negli altri organi, le concentrazioni più alte si sono rinvenute nei *testicoli* (53 ppm). Già Venugopal e Luckey (1978) indicavano il liquido seminale come uno dei distretti di accumulo preferenziale dello zinco; difatti nel presente lavoro viene confermata la loro asserzione.

Concentrazioni analoghe (52,84 ppm) si osservano nel *cuore*, che è comunque un tessuto muscolare; leggermente inferiori (46,16 ppm) sono i tassi di zinco nel *cervello*, organo che conserva normalmente concentrazioni costanti di metallo, anche in seguito a prolungati periodi di carenza nell'assunzione con la dieta (Venugopal e Luckey, 1978). Si ritiene che questo meccanismo sia da ascrivere all'esistenza della barriera emato-encefalica, struttura che funge da "filtro" al passaggio delle più svariate sostanze da e verso il sangue.

L'organo che presenta le concentrazioni più basse di zinco (42,09 ppm) è l'*occhio*. Non esistono in letteratura lavori scientifici che forniscono i livelli medi di questo metallo nell'occhio; ciononostante, Venugopal e Luckey (1978) dimostravano come la coroide, la membrana vascolare dell'occhio posta subito al di sotto della retina, fosse uno dei siti di accumulo preferenziale di zinco. Il rinvenimento di queste basse concentrazioni, quindi, va tenuto in considerazione ed è probabilmente correlato all'utilizzo prevalente di grasso perioculare per le titolazioni.

Per quanto riguarda l'età dei soggetti, si può notare come questo parametro non influenzi l'accumulo di zinco nei cinghiali. L'indagine statistica, difatti, evidenzia una differenza significativa ( $p < 0,01$ ) solo nei testicoli, non esistendo correlazione tra il parametro e le concentrazioni di zinco per gli altri organi.

Anche il sesso degli animali sembra non influire sui livelli di zinco nei tessuti. Nei muscoli, difatti, la concentrazione media di zinco negli individui di sesso femminile (78,36 ppm) è praticamente uguale a quella dei maschi (77,70); nel rene il valore medio nelle femmine (81,13 ppm) è leggermente più elevato di quello nei maschi (69,45 ppm), mentre il contrario si verifica a carico del fegato: ad un tasso epatico medio di 88,86 ppm presente nelle scrofe si contrappongono le 98,3 ppm dei maschi. A questo risultato erano pervenuti anche Hödrejärvi e Ott (1983), i quali non rinvennero differenze significative fra le concentrazioni medie di alcuni metalli pesanti, tra cui lo zinco, fra individui femmine e maschi di alce.

#### *4.3.1.3.Rame*

Come si evince dalla tabella 4.5 e dalla figura 4.3, il rame è il metallo essenziale meno concentrato nei tessuti dei nostri cinghiali. Questo fatto è correlato alla sua relativa scarsità negli organismi animali e alle sue limitate, sebbene essenziali, funzioni biologiche. Le concentrazioni in grado di provocare fenomeni tossici ( $>400$  ppm) non sono nemmeno lontanamente raggiunte.

L'analisi statistica evidenzia differenze significative ( $p < 0,05$ ) per quanto riguarda i contenuti di rame a livello renale ed epatico in funzione della classe di età dei soggetti e a quelli cardiaci in funzione del sesso degli stessi. In particolare i soggetti di classe 1 presentano concentrazioni renali medie superiori a quelle delle altre due classi e pari a  $36,97 \pm 3,59$  ppm, contro un valore di  $26,61 \pm 5,95$  e di  $21,53 \pm 2,82$  ppm rispettivamente negli esemplari di classe 3 e di classe 4. Per quanto riguarda il tessuto epatico, è dato rilevare come l'unico soggetto analizzato di classe 3 presenti livelli di rame (48,98 ppm) superiori a quelli riscontrati nelle altre classi e pari a  $20,5 \pm 2,44$  ppm in classe 1 e a  $34,2 \pm 5,55$  ppm in classe 4. A livello cardiaco invece le femmine presentano concentrazioni leggermente superiori di metallo (18,2

$\pm 0,9$  ppm vs.  $16,12 \pm 0,51$  ppm) rispetto ai maschi. Il ridotto errore standard spiega la differenza rilevata.

Le quote più elevate, nell'ordine di 30,49 ppm su sostanza secca, si rinvennero nel *rene*, con una distribuzione prevalente nella corticale renale rispetto alla midollare. Questo valore si avvicina molto a quello ritrovato in cinghiali polacchi da Falandysz nel 1994 (30,74 ppm). Hecht (1986), tuttavia, ottenne valori pari a quasi la metà (18,11 ppm), molto simili a quelli di Wolkers *et al.* (1994) che oscillavano tra 17 e 24 ppm, rinvenuti in cinghiali olandesi appartenenti a diverse classi di età.

Le concentrazioni renali di rame nel maiale domestico risultano essere paragonabili e simili a quelle dei cinghiali, come quanto descritto da Falandysz in Polonia (1993b). I livelli presenti nei reni di caprioli invece risultano essere il circa doppio di quelli dei cinghiali.

Il *fegato* possiede concentrazioni di rame lievemente inferiori rispetto al rene, pari a 27,16 ppm. Valori inferiori alla metà di quelli da noi reperiti, pari a circa 12,97 ppm, furono riscontrati da Falandysz (1994) e altri ancora più bassi (8,41 ppm) si rinvennero in Germania dell'ovest (Hecht, 1986). Wolkers (1994) osservò tassi epatici di rame variabili tra 4 e 20 ppm: il valore più basso apparteneva a cinghiali con meno di 6 mesi d'età, quello più elevato ad animali con più di 5 anni. In Germania dell'est si ottennero concentrazioni di rame inferiori a quelle da noi riscontrate (20 ppm) in luoghi vicini a industrie, mentre tassi di 15,9 ppm furono rinvenuti in altre zone lontane dalle stesse. Gli stessi Autori, tuttavia, affermano che le differenze fra le concentrazioni di rame in animali provenienti da territori diversi non sono statisticamente significative (Von Launer *et al.*, 1991).

Anche per il fegato è stato visto che il maiale domestico possiede concentrazioni comparabili a quelle del cinghiale (Falandysz, 1993b), anche se Hecht (1996) afferma che le specie domestiche accumulano maggiori quantità di rame (circa 10 volte) nel fegato rispetto alle specie selvatiche. Il cervo possiede tassi epatici di rame più elevati rispetto al cinghiale, variabili tra 54 e 86 ppm in animali di età diverse, secondo Wolkers *et al.* (1994); il capriolo, allo stesso modo, presenta concentrazioni epatiche di metallo oscillanti tra 66 e 82 ppm (Falandysz, 1994), l'alce accumula fino a 118 ppm di metallo a livello epatico (Mattson *et al.*, 1981). Queste concentrazioni elevate sono probabilmente da mettere in relazione con la dieta erbivora di queste specie; le piante sono, infatti, buone fonti di elementi minerali, dato che queste sostanze sono indispensabili per la loro crescita e sviluppo (Baker e Brooks, 1989; Raskin *et al.*, 1994; Elless *et al.*, 2000). Concentrazioni epatiche pari a circa 27 ppm furono ritrovate in individui appartenenti a una popolazione di alci dell'Alaska soggetta a forte diminuzione demografica e

mortalità spontanea; la causa di ciò fu messa in relazione proprio a carenza di rame nella dieta degli animali, associata ad altri fattori ambientali e stagionali, dal momento che popolazioni di alci di altre zone possedevano fino a 286 ppm di rame nel fegato (O'Hara *et al.*, 2001).

Dopo il tessuto epatico, le concentrazioni medie di rame più alte, pari a 16,93 ppm, si rinvennero nel **cuore**, organo che contiene molti tipi di cuproenzimi, come le citocromoossidasi ad esempio, fondamentali nella catena respiratoria mitocondriale e quindi necessarie per la contrazione cardiaca ritmica. Concentrazioni analoghe (14,14 ppm) si osservarono nel tessuto cardiaco di alcuni procioni (*Procyon lotor*) negli Stati Uniti (Burger *et al.*, 2002). Si ricorda che la presenza di notevoli quantità di rame a livello cardiaco si associa a deplezione di Ca e aumento di Na, macroelementi anch'essi indispensabili per l'attività miocardica (Pettersen *et al.* 2002). In questo organo, inoltre, è stato ritrovato un unico valore elevato, pari a 63,28 ppm, che non è stato inserito nella statistica; il cuore apparteneva ad un cinghiale di sesso maschile appartenente alla classe 1. I livelli di rame nel fegato e nel rene dello stesso animale superano la media, cosa che tuttavia non si verifica per gli altri organi; è probabile che questi livelli siano da attribuire o a ingestione da parte dell'animale di alimenti contaminati da rame, ad esempio colture trattate con solfato di rame, o ingestione di numerosi funghi, i quali sono un'importante fonte di metalli (Pokorny e Ribarič-Lasnik, 2002).

Valori molto simili a quelli del cuore (16,19 ppm) si sono ritrovati nel **cervello**, organo che raccoglie le maggiori quantità di rame, insieme al rene e al fegato (Venugopal e Luckey, 1978). Ricordiamo che il metabolismo del rame nell'encefalo è regolato dalla proteina prionica nativa presente a livello di Sistema Nervoso Centrale (Brown, 2001).

Concentrazioni intermedie si osservano nell'**occhio** (10,08 ppm), mentre bassi quantitativi di rame si hanno nei **testicoli** (6,71 ppm), così come scarsa risulta la presenza nei **muscoli**, con una concentrazione media di rame nei tre gruppi muscolari da noi considerati pari a 6,81 ppm. Il diaframma è l'organo muscolare dove il rame è più concentrato (7,48 ppm), sebbene il valore non sia di molto superiore a quello dei muscoli della coscia (6,97 ppm) e del massetere (5,95 ppm). Venugopal e Luckey (1978) affermano che il 35% del rame corporeo si trova nel tessuto muscolare, non risultando tuttavia questo reperto dalla distribuzione cinetica del metallo.

Falandysz (1994) reperì concentrazioni pari a 4,8 ppm in muscoli di cinghiali polacchi; quantità minori, pari a 3,75 ppm, furono ottenute da Hecth (1986) in Germania. Strmisková e Strmiska (1992) riportano tassi di rame nei muscoli pari a

3,9 ppm, mentre Zomborszky *et al.* (1996) riscontrarono valori più simili a quelli del presente lavoro, pari a 7 e 5,5 ppm nei muscoli semimembranoso e lungissimus dorsi rispettivamente.

Le concentrazioni nel maiale sono comparabili a quelle dei “cugini” selvatici della stessa area (3,4 ppm), così come riportato da Strmisková e Strmiska (1992) in Cecoslovacchia.

Altri Autori non osservarono differenze significative nelle concentrazioni di rame nei muscoli di altre specie selvatiche; difatti Falandysz (1994) riferisce valori pari a 5,4 ppm nei caprioli e 5,1 ppm nei cervi, valore molto simile a quello riportato da Strmisková e Strmiska, sempre nei cervi, nel 1992 (5,13 ppm). Tassi muscolari di rame pari a 5,34 ppm sono stati trovati in una popolazione di alci dell’Alaska considerata deficiente per ciò che riguarda l’apporto del metallo con la dieta, laddove altri individui della stessa specie ma di altre zone possedevano fino a 16,59 ppm di metallo nei muscoli (O’Hara *et al.*, 2001).

La statistica svolta ha correlato l’età ai quantitativi di rame del rene e del fegato. In particolare nel primo organo si vede come le concentrazioni di metallo decrescono con l’età, mentre nel secondo si assiste ad un incremento delle stesse nell’età riproduttiva, per poi calare nuovamente in seguito. Hyvarinen e Nygren (1993), invece, affermano che neonati di alci in Finlandia possiedono già concentrazioni epatiche di rame maggiori di 2,76 mg/g, che i livelli decrescono fino a 82 µg/g dopo i 6 mesi e che subiscono successivamente un aumento con l’età, ritornando elevati negli adulti.

Il sesso non influenza i fenomeni di accumulo di rame nei tessuti animali. Si rinvennero concentrazioni medie assolutamente simili nei principali organi di stoccaggio del metallo (rene, fegato e cervello) tra animali di sesso maschile e femminile. Una lieve differenza di concentrazioni, rilevata anche dalla statistica, si riscontra solamente a livello cardiaco. Risultato simile fu ottenuto anche da Hödrejärvi e Ott (1983) in alci di sesso diverso, sia per il rame che per altri metalli. Sempre Hyvarinen e Nygren (1993), invece, rinvennero valori medi più alti in fegati di alci maschi rispetto a quelli delle femmine e spiegarono che ciò era dovuto, nelle femmine, al passaggio di rame dalla madre al feto.

#### *4.3.1.4. Cadmio*

Il cadmio è un metallo pesante tossico ubiquitario nell’ambiente. L’organo target è rappresentato dal rene, nel quale il cadmio può indurre tossicità alterando primariamente le funzioni tubulari prossimali (Goyer, 1996). Sintomi tossici subletali, tuttavia, si possono avere a partire da livelli renali pari a 110 ppm

(Chmielnicka *et al.*, 1989), valori ben superiori a quelli osservati nel presente studio (tab. 4.5 e fig. 4.4).

L'analisi statistica evidenzia differenze significative ( $p < 0,01$ ) per quanto riguarda i contenuti di cadmio a livello renale ed epatico in funzione della classe di età dei soggetti e quelli cardiaci ( $p < 0,01$ ) e nuovamente a quelli renali ( $p < 0,05$ ) in funzione del sesso degli stessi. In particolare a livello renale i soggetti di classe 4 presentano concentrazioni medie superiori a quelle delle altre due classi e pari a  $11,12 \pm 2,17$  ppm, contro un valore di  $5,02 \pm 0,84$  e di  $3,36 \pm 0,8$  ppm rispettivamente negli esemplari di classe 1 e di classe 3. Quando venga considerato il sesso, va sottolineato come le femmine presentino una concentrazione media quasi doppia rispetto ai maschi, con valori rispettivamente pari a  $9,58 \pm 2,05$  e  $5,18 \pm 0,83$  ppm. Per quanto riguarda il tessuto epatico, è dato rilevare come i soggetti di classe 1 presentino livelli di metallo decisamente inferiori ( $0,73 \pm 0,05$  ppm) a quelli riscontrati nelle altre classi e pari a  $1,5$  ppm nell'esemplare di classe 3 e a  $1,57 \pm 0,16$  ppm in classe 4. A livello cardiaco infine le femmine presentano concentrazioni decisamente superiori ( $93,1 \pm 23,76$  ppm vs.  $30,71 \pm 5,52$  ppm) rispetto ai maschi.

Nei *reni*, si riscontrano le maggiori concentrazioni di metallo, con un livello medio di  $7,03$  ppm; i tassi più alti si rinvencono nella corticale renale, con una media di  $8,36$  ppm, quasi il doppio di quella della midollare ( $4,97$  ppm), concordando ciò con i risultati ottenuti da Von Launer *et al.* (1991) in uno studio sui cinghiali condotto in Germania. Nella stessa pubblicazione si riferiscono livelli di cadmio nei reni fino a  $31,7$  ppm in zone molto inquinate, che si riducono a  $8,4$  ppm in distretti lontani da stabilimenti industriali (Von Launer *et al.*, 1991). Sempre in Germania si registrano valori medi pari a  $5,66$  ppm (Lusky *et al.*, 1992), mentre in Austria si raggiungono le  $25,2$  ppm (Tataruch, 1993). Nella Polonia del nord le concentrazioni rinvenute sono più simili alle nostre, variando tra  $6,9$  e  $8,78$  ppm (Falandysz, 1994); inoltre, analogamente a quanto riscontrato nell'area oggetto di studio, in quelle zone non esistono sorgenti puntiformi d'inquinamento, così che le fonti di metalli pesanti responsabili di detti accumuli sono ritenute il traffico automobilistico e aereo e le combustioni di carbone (Ronneau e Cara, 1984). In Slovacchia Kottferová e Koréneková (1998) riportarono quote di cadmio pari a  $0,87$  ppm, inferiori rispetto a quelle che si presentarono a livello epatico (vedi avanti). In Spagna vengono riportate concentrazioni renali medie di  $7,85$  ppm, con i massimi valori medi di  $9,7$  ppm reperiti in una zona dell'Andalusia bagnata dalle acque del fiume Guadalquivir (Santiago *et al.*, 1998).

Nel maiale domestico si riscontrano quote di cadmio nei reni circa 8 volte inferiori rispetto a quelle del cinghiale (0,87 ppm; Falandysz, 1993b). Si noti che anche i bovini domestici registrano concentrazioni renali di cadmio da 2 a 3 volte inferiori rispetto a quelle dei caprioli, a confermare la tendenza posseduta dagli animali domestici ad accumulare meno sostanze tossiche.

Il capriolo possiede tassi renali di cadmio leggermente inferiori a quelli dei cinghiali provenienti dalla stessa area. I valori oscillano fra 4 e 6 ppm in caprioli polacchi (Falandysz, 1994); in Germania dell'est si registrano fino a 14 ppm in zone inquinate (Von Launer *et al.*, 1996), mentre in Austria furono ritrovate, in media, 8 ppm nei reni di questo Ungulato erbivoro (Tataruch, 1993). In Slovacchia, invece, i reni dei caprioli si dimostrarono notevolmente più contaminati di quelli dei cinghiali, con concentrazioni renali che raggiungevano le 9,51 ppm, contro le 0,87 ppm rinvenute nei suidi (Kottferová e Koréneková, 1998). Tuttavia questa tendenza non viene confermata per il fegato. In Olanda è il cinghiale a possedere i maggiori livelli renali di cadmio; Kuiters (1996), infatti, riporta valori variabili tra 2,2 e 68,4 ppm in caprioli la cui età oscilla tra 5 mesi e più di 8 anni, che si triplicano nei cinghiali. In questo studio furono titolati i livelli di cadmio anche nei vegetali costituenti della dieta di entrambe le specie, risultando che i cinghiali assumevano circa tre volte il quantitativo di cadmio e cinque volte quello di piombo assunto dai caprioli, soprattutto a causa degli alti livelli di questi metalli nelle radici di felci, mirtilli e erbe varie molto appetite ai primi (Kuiters, 1996).

Il cervo possiede concentrazioni renali simili a quelle del cinghiale, nell'ordine di 3-6 ppm secondo Falandysz (1994), 7 ppm secondo Von Launer *et al.* (1996) e 8 ppm secondo Santiago *et al.* (1998). L'alce, invece, sembra la specie selvatica maggiormente inquinata a livello renale; in Svezia furono riportati valori medi pari a 16,47 ppm (Frank *et al.*, 1981), ma si arriva anche alle 100 ppm attribuite ad animali provenienti dal Canada (Crête *et al.*, 1987).

Nel **fegato** è stata ritrovata una concentrazione media di cadmio pari a 1,10 ppm, con un range di valori che va da un minimo di 0,57 ppm a un massimo di 2,18 ppm. Si ricordi che l'esposizione ambientale continuata al cadmio determina un quadro di distribuzione cinetica del metallo negli organismi animali in cui il fegato risulta molto meno contaminato rispetto al rene (Friberg *et al.*, 1974; Scheuhammer, 1987; García-Fernández *et al.*, 1996); il rapporto tra le concentrazioni di fegato e rene aumenta quanto più è intensa l'esposizione al metallo (Friberg *et al.*, 1974). Inoltre, siccome il cadmio viene rapidamente trasportato dal fegato al rene, è ragionevole pensare che si è dinanzi a un'esposizione acuta ad alte quote di metallo qualora le concentrazioni epatiche siano maggiori di quelle renali (Scheuhammer, 1987).

In tutti i soggetti studiati il rapporto Cd-epatico/Cd-renale è sempre di molto inferiore a 1, quindi si può tranquillamente affermare che essi sono stati esposti in modo cronico al cadmio ambientale.

I tassi epatici qui ottenuti sono circa il doppio di quelli reperiti da Santiago *et al.* (0,57 ppm; 1998) in cinghiali provenienti dall'Andalusia. Nelle zone più inquinate della provincia di Cordoba venivano raggiunte concentrazioni medie di 0,77 ppm, anche queste inferiori a quanto riscontrato nel presente lavoro. Valori simili (0,69 ppm) risultarono in fegati di cinghiali in Germania dell'est (Von Launer *et al.*, 1996); da notare che un tasso medio di 2,4 ppm fu ritrovato sempre in quella parte della Germania vicino a stabilimenti industriali (Holm, 1984). In Olanda si ottennero valori medi di cadmio epatico variabili tra 0,87 ppm, presenti in cinghiali di meno di 5 mesi, e 3,36 ppm, rilevabili in animali tra 1,5 e 8 anni (Kuiters, 1996). Da rilevare che queste concentrazioni sono le più alte e discostano un po' dalle altre rinvenibili in Olanda, ritenuta più "pulita" dei Paesi europei dell'est. In Slovacchia Kottferová e Koréneková (1998) riportano valori medi pari a 1,21 ppm, superiori a quelli consentiti dalla legge di quel Paese (0,27 ppm per carne fresca e organi interni escluso il rene; Ministry of Health of Slovak Republic). In Polonia si ottennero concentrazioni medie oscillanti fra 0,60 e 0,93 ppm (Falandysz, 1994); inferiori sono quelle ritrovate in Austria (0,69 ppm; Tataruch, 1989) e ancora più basse, nell'ordine di 0,06 ppm, si rinvennero in Ungheria (Somlyay *et al.*, 1983).

Il maiale domestico presenta valori epatici medi di cadmio circa 5 volte inferiori rispetto al cinghiale (~0,11 ppm, secondo Falandysz, 1993b).

E' interessante notare il paragone con cinghiali e cervi appartenenti alle realtà delle cosiddette "farms" del nord-Europa, che non sono altro che aziende agricole che allevano anche animali selvatici: ebbene questi animali possiedono minori concentrazioni di cadmio (ma anche di piombo) rispetto ai "fratelli" selvatici. La spiegazione di questo è nella dieta: i "wild" si nutrono principalmente di piante (e loro componenti) "anziane", che hanno accumulato notevoli quantità di metalli pesanti; i "farmed", invece, vengono alimentati con pellets composti da piante giovani, di massimo 3 settimane d'età, e fieno anch'esso di 3 settimane di maturazione, che risultano evidentemente meno contaminati (Wolkers *et al.*, 1994).

Nelle altre specie selvatiche le concentrazioni medie di cadmio nel fegato sono paragonabili a quelle dei cinghiali della stessa area. Il capriolo, infatti, possiede tassi epatici di cadmio pari a 0,52 ppm, secondo lo studio di Falandysz (1994) svolto in Polonia; in Slovacchia Kottferová e Koréneková (1998) rinvennero fino a 0,57 ppm, mentre in Germania dell'est i caprioli risultarono maggiormente contaminati rispetto ai cinghiali delle stesse zone, con valori medi epatici pari a

1,60 (Von Launer *et al.*, 1996). In Olanda accade il contrario: nel lavoro di Kuiters (1996) è il cinghiale la specie selvatica più contaminata; nel capriolo, infatti, si osservarono concentrazioni medie variabili tra 0,60 e 2,63 ppm in animali di età crescente.

Il cervo sembra possedere tassi inferiori di cadmio nel fegato; in Polonia furono registrati fino a 0,46 ppm di metallo (Falandysz, 1994), in Germania dell'est 0,57 ppm (Von Launer *et al.*, 1996). In Slovacchia, invece, il cervo registra 0,85 ppm di cadmio epatico, valore maggiore di quello del capriolo ma inferiore a quello del cinghiale (Kottferová e Koréneková, 1998).

Infine, come accade per il rene, anche per il fegato l'alce risulta l'Ungulato selvatico più contaminato, con livelli medi di cadmio nel fegato pari a 2,64 ppm rinvenuti in Svezia (Frank *et al.*, 1981), fino alle 5,7 ppm registrate nella regione canadese del Québec (Crête *et al.*, 1987).

Dopo il fegato, relativamente alte concentrazioni di cadmio (nell'ordine di ppb questa volta) si rinvencono nel **cuore**, che presenta una concentrazione media del metallo pari a 53,69 ppb, con un range di valori min e max che oscilla tra 12,98 e 170,78 ppb. Come paragone con un'altra specie selvatica onnivora ma sicuramente di più piccole dimensioni, nel tessuto cardiaco di procioni (*Procyon lotor*) che vivevano in zone vicine a un ex stabilimento nucleare statunitense furono ottenute concentrazioni medie di cadmio pari a 104 ppb (Burger *et al.*, 2002). Questi alti livelli di metallo nel muscolo cardiaco possono essere spiegati con l'effetto di sostituzione che il cadmio attua nei confronti di Ca e Na, elementi di cui il cuore è ricco (Pettersen *et al.*, 2002); ulteriori indagini sui quantitativi cardiaci di questi minerali potrebbero chiarire il fenomeno.

Meno inquinato risulta l'**occhio**, con un livello medio di cadmio di 29,7 ppb; qui l'escursione tra valore min e max è maggiore: si va, infatti, da una contaminazione nulla (< LOD) a un'altra notevole (105,76 ppb), entrambe osservate in soggetti femmine di classe 1.

Nei **testicoli** si repertano concentrazioni medie di cadmio pari a 16,77 ppb, con valori min inferiori alla soglia di sensibilità dello spettrofotometro (0,2 ppb per il cadmio) e max di 52,2 ppb, ossia esistono organi pochissimo contaminati ed altri che lo sono in maniera non esagerata. Nonostante non siano state reperite in letteratura indagini svolte sulle alterazioni prodotte dal cadmio a carico degli organi genitali nel cinghiale, esistono numerose prove evidenti del suo accumulo a livello di gonadi e dei danni provocati in queste sedi dal metallo in tutte le specie animali. Questi effetti negativi comprendono ridotto diametro dei tubuli seminiferi, atrofia e necrosi dell'epitelio seminale, ipertrofia delle cellule del Leyding con diminuzione

della produzione di androgeni, anormalità nella produzione di spermatozoi e nelle loro caratteristiche di vitalità, motilità e funzionalità, oltre ad alterazioni dell'asse ipofisi-gonade (Venugopal e Luckey, 1978; Xu *et al.*, 1996; Foote, 1999). In particolare il testicolo viene considerato l'organo critico nelle esposizioni acute sperimentali nei Mammiferi (Gilliavod e Leonard, 1975).

Lievemente inferiore al contenuto dei testicoli è la concentrazione media di cadmio nei *muscoli*, pari a 16,65 ppb. Il livello medio più alto (18,79 ppb) si registra nel muscolo massetere, il più basso (15,06 ppb) nel gruppo dei muscoli della coscia, mentre un valore intermedio (16,10 ppb) si rinviene nel diaframma. In quest'ultimo muscolo si osserva il tasso massimo di cadmio per quanto riguarda il tessuto muscolare, pari a 63,49 ppb.

Quote medie di cadmio variabili da 18 a 42 ppb sono riportate nei muscoli di cinghiali della Polonia del nord (Falandysz, 1994). In Germania dell'ovest si rinvennero valori decisamente inferiori (13,5 ppb; Hecht, 1986), anche se Rimkus e Wolf (1987) evidenziarono concentrazioni medie ben più elevate, che raggiungevano le 72 ppb. In Germania dell'est sono riportati valori più vicini a quelli di questo lavoro, pari a 21 ppb (Von Launer *et al.*, 1996), mentre in Slovacchia risultarono nuovamente livelli maggiori, pari a 60 ppb (Kottferová e Koréneková, 1998).

I quantitativi di cadmio nei muscoli delle altre specie selvatiche sono simili a quelli dei cinghiali. In Polonia vengono riferiti valori variabili tra 21 e 51 ppb nei caprioli (Falandysz, 1994), tuttavia, sempre nei caprioli, in Germania dell'ovest, si registrano le concentrazioni medie più elevate (102 ppb; Rimkus e Wolf, 1987). Sempre nella stessa specie in Slovacchia si osservano livelli uguali a quelli dei cinghiali delle stesse aree (60 ppb), mentre i cervi, nello stesso Paese, possiedono fino a 30 ppb di cadmio nei muscoli (Kottferová e Koréneková, 1998). I cervi polacchi, allo stesso modo, dimostrano quote di metallo variabili tra 18 e 45 ppb (Falandysz, 1994). L'alce, invece, si comporta in maniera diversa, esibendo concentrazioni medie di cadmio nei muscoli inferiori a 15 ppb (Falandysz, 1994), al contrario di ciò che accadeva nel fegato e nei reni di questo erbivoro.

L'organo meno contaminato dal cadmio nel presente lavoro è il *cervello*, che ha registrato una concentrazione media di metallo pari a 8,21 ppb. Ci sono 4 soggetti con un tasso cerebrale di cadmio inferiore al limite minimo di titolazione dello spettrofotometro (< LOD), mentre il livello più elevato (38,44 ppb) si rinviene in un individuo adulto di classe 4 di sesso maschile. E' noto che il cervello raccoglie piccolissime quantità di qualsivoglia sostanza grazie all'esistenza del filtro rappresentato dalla barriera emato-encefalica, non ci sorprenda dunque la bassa

contaminazione da cadmio, ma anche da ferro e zinco (vedi sopra), che caratterizza quest'organo. Tuttavia studi recenti hanno messo in evidenza l'azione che il metallo svolge a carico di alcuni aminoacidi in determinate zone dell'encefalo. Infatti dosaggi di 50 ppm di CdCl<sub>2</sub> somministrati a ratti nell'acqua di bevanda determinano la diminuzione dei contenuti di aspartato, glutammato, glutammina, taurina e GABA a livello di eminenza mediana, ipotalamo e corteccia prefrontale, e queste alterazioni sono considerate alla base delle modificazioni che il cadmio attua sulla funzionalità dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade (Lafuente e Esquifino, 2002).

Per quanto riguarda l'età, è stato già detto che in letteratura esistono numerosi studi che asseriscono che il cadmio rimane "stoccato" nell'organismo e che il suo quantitativo corporeo subisce aumenti con l'avanzare dell'età dell'animale. Anche nel presente studio, nonostante una prevalenza di soggetti di classe 1, si assiste ad un accumulo di metallo con l'età e ciò è evidente soprattutto a carico del fegato e del rene. Nel primo organo, difatti, si assiste a un aumento di concentrazioni che varia da 0,73 ppm in media per i cinghiali di classe 1, passando attraverso le 1,50 ppm riscontrate in media in quelli di classe 3, fino ad arrivare alle 1,57 ppm degli animali di classe 4. Non vengono raggiunte, tuttavia, le 3,36 ppm rinvenute in cinghiali di 8 anni da Kuiters (1996). Il valore min (~5,70 ppm) si osserva in un soggetto maschio di classe 1, mentre il valore max (2,18 ppm) in una femmina di classe 4.

Questo nostro reperto epatico smentisce il concetto secondo il quale anche nel cinghiale, come nel ratto, si assiste ad una saturazione dei livelli di cadmio epatici desumibile dall'accumulo di metallo con l'età solo nei reni e non nel fegato, il quale esaurisce la sua capacità legante, mentre persiste l'esposizione al metallo (Stonard e Webb, 1976; Wolkers *et al.*, 1994).

Nel rene si parte da una concentrazione media di ~5 ppm nei cinghiali giovani di classe 1, per arrivare alle 11,12 ppm possedute in media dagli adulti di classe 4; gli individui di classe 3, tuttavia, presentano un livello renale di cadmio inferiore rispetto a quelli più giovani, pari a 3,36 ppm. Il valore min è di ~1,42 ppm e si rinviene nella midollare di un cinghiale femmina di classe 1, mentre il valore max è pari a ~23,94 ppm ed è posseduto da una scrofa di classe 4. Anche in questo caso, però, si rimane lontani dalle 43,8 ppm riferite da Kuiters (1996) in animali di 8 anni. Negli altri organi non si nota nessun accumulo graduale di cadmio con l'età.

Come riferito in precedenza, le cause di questo accumulo organico crescente con l'avanzare dell'età è causato dalla lentissima eliminazione che il metallo subisce da parte dell'organismo; utilizzando cadmio radioattivo in tracce nelle capre è stato visto che solo il 6% di una dose iniettata veniva eliminato nelle prime due

settimane, la maggior parte di questo nei primi tre giorni, il resto (94%) era escreto in un lungo periodo di tempo (Miller *et al.*, 1969).

Anche il sesso sembra influire sulla distribuzione di cadmio negli animali; nel presente studio esiste, in tutti gli organi e tessuti, una maggiore concentrazione di metallo negli individui di sesso femminile, evidenziata statisticamente solo in rene e cuore. La differenza è più evidente, infatti, a livello renale, con una media di 9,58 ppm nelle femmine e 5,18 ppm nei maschi; più contenuto il divario nel fegato, dove alle 0,9 ppm medie dei maschi si contrappongono le 1,3 ppm presenti in media nelle scrofe. Nel tessuto cardiaco, che ha dimostrato una particolare affinità per il cadmio, l'escursione di valori si dimostra notevole: nei verri si osservano, in media, 30,71 ppb, mentre nelle scrofe si raggiungono le 93 ppb, con uno scarto pari a più del doppio del quantitativo medio dei maschi.

In letteratura esistono opinioni divergenti circa l'influenza del sesso sull'accumulo di cadmio nel cinghiale e negli altri organismi animali. Hödrejärv e Ott (1983) non rinvennero sostanziali differenze nelle concentrazioni di cadmio in alci di sesso diverso; anche Pokorny (2000) pervenne alle stesse conclusioni in uno studio sui caprioli. Beiglböck *et al.* (2002), invece, ritrovarono livelli maggiori di cadmio in caprioli femmine piuttosto che nei maschi, ma questa disparità esisteva solo per i soggetti la cui età era compresa tra 1 e 2 anni. Visto che il dato non si reperiva per individui di altre classi d'età, gli Autori non lo attribuirono all'influenza esercitata dall'attività riproduttiva delle femmine (Beiglböck *et al.*, 2002).

Come spiegazione possibile si può addurre l'affinità che il cadmio possiede per la ghiandola mammaria, in cui, tra l'altro, sono state isolate delle proteine leganti il cadmio (Cd-Bp) simili alla metallotioneina, ma differenti da essa per il peso molecolare (Shaikh e Lucis, 1971). In questo tessuto il metallo si accumulerebbe e da qui si distribuirebbe a tutti gli altri organi in grosse quantità.

#### *4.3.1.5. Piombo*

Il piombo, al pari del cadmio, è un elemento estremamente diffuso in natura; molto spesso causa di avvelenamenti negli animali domestici, casi di intossicazioni acute da piombo negli Ungulati selvatici sono invece raramente riportati in letteratura. Si pensa, tuttavia, che molti di questi passino inosservati, esistendo l'eventualità di intossicazioni subcliniche al di sopra del valore di 10 ppm, che si reperta spesso in singoli animali soprattutto in aree industrializzate europee e mondiali (Frøslie *et al.*, 2001).

Se si eccettuano alcuni composti come acetati e cloruri, la maggior parte dei sali di piombo sono poco solubili e per questo captati dalle piante in piccole quantità; ciò

depone per una minore concentrazione di metallo negli organismi viventi. Sorprendentemente nel presente lavoro la contaminazione da piombo si dimostra essere maggiore di quella da cadmio per tutti gli organi eccetto per il rene, con livelli tissutali medi più elevati di quelli del cadmio (tab. 4.5, fig. 4.4).

L'analisi statistica evidenzia differenze significative ( $p < 0,01$ ) solo per quanto riguarda i tassi di piombo a livello di massetere in animali di differente età. In particolare i soggetti di classe 1 presentano concentrazioni medie superiori a quelle delle altre due classi e pari a  $203,08 \pm 32,83$  ppb, contro un valore di  $7,44 \pm 7,19$  e di  $45,35 \pm 28,72$  ppb rispettivamente negli esemplari di classe 3 e di classe 4. Un'analisi più attenta dei dati rileva però come questo dato sia in parte falsato da un probabile inquinamento dei campioni a seguito dell'abbattimento: alcuni soggetti sono infatti stati colpiti a livello del muso, e questo può aver contaminato con piombo il tessuto. Nonostante l'attenzione posta nel prelevare il campione, questo tipo di contaminazione può essere sfuggita e aver indotto un bias nell'analisi, come peraltro testimoniato dall'entità dell'errore standard e dall'ampiezza del range di variazione (tab. 5), in particolare nei soggetti di classe 1.

Il *fegato* è l'organo che si presenta maggiormente inquinato, con una concentrazione media di piombo pari a 2,13 ppm. Reperto simile fu ottenuto in Spagna, dove inoltre il tessuto epatico si dimostrava maggiormente contaminato (7,2 ppm in media; Santiago *et al.*, 1998). In Germania dell'est furono osservate quote medie di metallo variabili tra 0,52 e 3,58 ppm (Holm, 1984), mentre nella parte ovest del Paese si ritrovarono da 0,44 (Hecht, 1986) a 0,88 ppm (Rimkus e Wolf, 1987) di piombo epatico. In Austria furono rinvenuti livelli medi di molto inferiori a quanto rilevato nell'area bolognese, pari a 0,24 ppm (Tataruch, 1989); di poco superiori sono quelli riportati in fegati di cinghiali della Polonia del nord, variabili tra 0,27 e 0,66 ppm (Falandysz, 1994). Un po' più simili a quelli osservati nel presente studio sono i valori epatici medi ritrovati in Slovacchia, che raggiungono le 1,84 ppm (Kottferová e Koréneková, 1998). In Olanda Wolkers (1994) reperì livelli epatici di piombo variabili fra 0,8 e 1,07 ppm in animali di diverse età.

I suini domestici dimostrano concentrazioni dimezzate rispetto a quelle dei cinghiali della stessa area, pari a 0,25 ppm (Falandysz, 1993b). D'altra parte i regimi alimentari controllati cui sono sottoposti i capi d'allevamento depone sicuramente per minori contaminazioni dalle più diverse sostanze rilevabili nei tessuti di questi animali. Anche gli animali selvatici allevati nelle "farms" nord-europee possiedono quote di metallo minori, stimabili nell'ordine di 0,2 ppm in Olanda (Wolkers *et al.*, 1994).

Per quanto riguarda il paragone con le altre specie, normalmente i caprioli dimostrano di possedere livelli epatici di piombo inferiori rispetto ai cinghiali. In Spagna, Santiago *et al.* (1998) riportano valori medi di 2,42 ppm che corrispondono a circa 1/3 di quelli dei suidi della stessa zona. La stessa differenza si ha in Slovacchia, dove gli Ungulati erbivori presentavano 0,33 ppm di metallo nel fegato (Kottferová e Koréneková, 1998). I cervi si comportano in maniera inversa rispetto ai caprioli, evidenziando tassi maggiori di quelli dei cinghiali, intorno alle 6,9 ppm registrati in Germania (Von Launer *et al.*, 1996). Infine le concentrazioni epatiche delle alci sono nuovamente più basse di quelle viste per i nostri animali, variabili tra 0,4 e 0,7 ppm (Frank *et al.*, 1981; Niemi *et al.*, 1993).

Dopo il fegato, sorprendentemente è il **cuore** l'organo più inquinato da piombo. La concentrazione media che si osserva nel muscolo cardiaco è di 399,09 ppb. Livelli più bassi, pari a 270 ppm, furono ritrovati in procioni negli U.S.A. (Burger *et al.*, 2002).

Dopo il cuore, sempre a sorpresa, l'**occhio** contiene quantitativi non indifferenti di piombo, pari a 319,85 ppb. In letteratura non sono stati rinvenuti dati relativi alla contaminazione di questo organo; la cinetica del metallo fa però ascrivere l'occhio tra le strutture nelle quali il piombo dovrebbe comparire solo in tracce (Venugopal e Luckey, 1978). Il dato ottenuto è quindi interessante, ma di difficile interpretazione; una possibile spiegazione è, al pari di quanto precedentemente affermato per il muscolo massetere, una contaminazione "involontaria" dell'organo a seguito dell'abbattimento: i residui di piombo originati dal proiettile possono infatti aver inquinato l'occhio, senza che al momento del campionamento fosse possibile riscontrarne la presenza.

Analogamente, i **muscoli** potrebbero contenere particelle di piombo derivanti dal proiettile col quale l'animale è stato abbattuto (Tataruch, 1993; Falandysz, 1994). Questo fa del tessuto muscolare uno di quelli maggiormente contaminati dal metallo (Ma, 1996). Nel presente lavoro i muscoli possiedono, in media, 258,48 ppb di piombo, con la concentrazione media più elevata riscontrata nel diaframma (347,36 ppb), quella intermedia nei muscoli della coscia (201,67 ppb) e quella più bassa rinvenibile nel muscolo massetere (137,53 ppb).

Valori comparabili, variabili fra 216 e 330 ppb, si rinvennero in Polonia (Falandysz, 1994). In Germania dell'ovest si ritrovarono livelli muscolari di piombo pari a 360 ppb (Rimkus e Wolf, 1987), mentre nell'est del Paese i tassi variavano tra 90 e 378 ppb (Holm, 1984). In Slovacchia, invece, furono reperiti in media 840 ppb di metallo nei muscoli (Kottferová e Koréneková, 1998).

Le altre specie di Ungulati selvatici dimostrano livelli di metallo nella muscolatura lievemente più alti di quelli del cinghiale. Nel capriolo si registrano quote che oscillano fra 330 e 540 ppb in Polonia (Falandysz, 1994). In Slovacchia si raggiungono addirittura le 4200 ppb (Kottferová e Koréneková, 1998). Nel cervo i quantitativi di piombo nei muscoli sono più bassi di quelli presenti nei caprioli, variabili tra 160 e 180 ppb (Falandysz, 1994), anche se Rimkus e Wolf (1987) riportano concentrazioni che raggiungono le 1200 ppb. Infine Holm (1984), sempre in questa specie, riporta valori variabili tra 114 e 177 ppb.

Dopo i muscoli, concentrazioni inferiori di piombo si osservano nel *cervello*, che contiene 25,7 ppb di piombo. Il cervello è indicato come uno degli organi in cui il piombo maggiormente si accumula, posto nell'ordine subito dopo i muscoli (Venugopal e Luckey, 1978). Si ricorda, inoltre, l'azione tossica svolta dal metallo a livello di sistema nervoso.

I *testicoli* presentano concentrazioni medie di piombo pari a 23,78 ppb. Anche questi organi sono bersaglio dell'intossicazione da piombo, risultando in particolar modo evidente, fra le lesioni prodotte in questa sede, la riduzione della produzione gonadica, associata a riduzione degli spermatozoi.

Il dato che più sorprende nel presente lavoro riguarda l'accumulo di piombo nel *rene*. Questo organo è, assieme al fegato e dopo il tessuto osseo, quello che raccoglie le maggiori quantità di piombo. Nei Mammiferi i livelli di questo metallo seguono, di norma, il seguente ordine decrescente: osso > rene > fegato > muscolo (Ma, 1996).

Nel presente studio il rene è l'organo meno contaminato da piombo, con una concentrazione media che raggiunge le 5,78 ppb. Tali livelli si discostano notevolmente dai valori ritrovati in Europa, sia nel cinghiale che nelle altre specie selvatiche di interesse. In Germania, ad esempio, sono riportate concentrazioni che variano dalle 585 ppb registrate nella parte ovest del Paese (Hecht, 1986) alle 5,4 ppm reperite vicino a stabilimenti industriali nelle regioni dell'est (Holm, 1984). In Slovacchia furono osservati tassi renali pari a 915 ppb (Kottferová e Koréneková, 1998); ugualmente in Polonia del nord i cinghiali dimostrarono valori variabili da 402 ppb a 1,3 ppm (Falandysz, 1994). Anche in Spagna si registrano concentrazioni di molto superiori alle nostre, che arrivano a toccare le 2,2 ppm (Santiago *et al.*, 1998). I livelli renali più bassi riportati in letteratura, pari a 91,5 ppb, appartengono a cinghiali austriaci (Tataruch, 1989); anche questi, tuttavia, si discostano notevolmente da quelli del presente lavoro.

Anche i cinghiali delle "farms", allevati nelle fattorie e la cui alimentazione viene scelta e controllata, registrano concentrazioni maggiori, intorno alle 507 ppb in

media (Wolkers *et al.*, 1994) e persino i suini domestici possiedono titoli più alti, pari a 210 ppb (Falandysz, 1993b).

Se consideriamo le altre specie di Ungulati selvatici la tendenza non cambia. I caprioli possiedono livelli di piombo nei reni che variano a seconda della zona, ma che non scendono mai sotto le 292 ppb ritrovate in Polonia da Falandysz (1994). Nel cervo la concentrazione media più bassa, pari a 73 ppb, fu registrata in alcune zone dell'Ungheria, che, comunque, avevano sempre esibito livelli organici di metalli pesanti molto bassi (Somlyay *et al.*, 1983). Anche le alci non sono caratterizzate da livelli renali di piombo inferiori; i titoli più bassi, difatti, nell'ordine di 256 ppb, furono registrati in Finlandia nel 1990 (Niemi *et al.*, 1993).

Il dato renale non trova facile spiegazione, anche in considerazione della cinetica del metallo e richiede sicuramente un'indagine più approfondita.

L'età non influenza l'accumulo organico del piombo, o perlomeno non determina aumenti dei livelli di piombo negli animali e anzi si osserva una diminuzione dei tassi epatici e muscolari. Anche se non è dato registrare una differenza statisticamente significativa (se non nel muscolo massetere e con le limitazioni già discusse precedentemente), il dato è in accordo con i risultati ottenuti da Wolkers *et al.* (1994) su cinghiali olandesi di età differenti.

Non esiste una chiara indicazione ottenibile dalla letteratura relativamente all'influenza esercitata dall'età sui livelli di piombo. Ad Autori che riscontrano aumenti dei tassi medi epatico e renale con l'età (Hödrejärv e Ott, 1983; Pain, 1995; Ma, 1996), se ne affiancano altri che ricavano risultati opposti (Frank *et al.*, 1981; Kleiminger, 1983).

Analogamente il sesso non pare influenzare l'accumulo del metallo, in analogia con quanto rilevato da Hödrejärv e Ott (1983) in individui maschi e femmine di alce.

### 4.3.2. Risultati isto-patologici

A livello epatico si osserva costantemente degenerazione vacuolare, prevalentemente perilobulare (Fig. 4.5), congestione e, in qualche caso, dissociazione focale delle lamine.

In un fegato si evidenzia un diffuso fenomeno di capillarizzazione con dilatazione dello spazio del Disse. Raramente si presentano fenomeni infiammatori. Soprattutto laddove le lamine epatiche si mostrano dissociate, si repertano all'interno degli epatociti piccoli corpi inclusi citoplasmatici a volte debolmente eosinofili, a volte decisamente basofili circondati da un alone chiaro (Fig. 4.6).

I reni mostrano intensi fenomeni congestizi, elevata cellularità glomerulare e, in alcuni casi, aumento della matrice mesangiale. In un caso era presente una diffusa nefrite interstiziale, la cui componente cellulare era rappresentata principalmente da linfociti e plasmacellule (Fig. 4.7).

I polmoni sono costantemente in preda a manifestazioni di polmonite interstiziale di tipo cronico con presenza, oltre che di linfociti e plasmacellule, anche di numerosi granulociti eosinofili (Fig. 4.8). In alcuni casi si reperta edema alveolare (Fig. 4.9). Costante è la congestione.

Null'altro di significativo si segnala negli altri tessuti ed organi osservati.

La letteratura si dimostra molto povera di studi effettuati sulle lesioni isto-patologiche rientranti in quadri d'intossicazioni acute e croniche da metalli pesanti negli Ungulati selvatici. Per il cinghiale non è stato rilevato nessun lavoro trattante l'argomento; la maggior parte degli studi riguarda le specie animali da laboratorio, mentre scarno si dimostra il panorama di indagini svolte sul capriolo.

Proprio in questa specie sono stati recentemente riveduti gli aspetti di lesività renale provocati da esposizioni continuate al cadmio in alcune zone della parte est dell'Austria (Beiglböck *et al.*, 2002). Le lesioni renali osservate in questi animali vanno dalla degenerazione vacuolare alla necrosi, dall'ispessimento della capsula del Bowman alla nefrocalcinosi, dalla deposizione di pigmenti al rigonfiamento glomerulare e alla fibrosi interstiziale. Questi ultimi due reperti, e anche le infiltrazioni linfo-istiocitarie osservate, furono associate all'età degli animali, come già riportato in indagini svolte sul ratto e sul cane (Chennekatu *et al.*, 1986; Robertson, 1986). Le frequenze delle deposizioni di pigmenti e dell'ispessimento della capsula del Bowman furono collegate sia all'età degli animali, sia alle elevate quote di cadmio presenti nel rene (fino a 22 ppm, di molto superiori alle nostre), che, quindi, rivestono anche un ruolo aggravante gli effetti degenerativi che si instaurano con l'età stessa. Furono inoltre osservate alterazioni a carico nucleare

cellulare, quali rigonfiamento, cariolisi e picnosi, messi in stretta dipendenza solo con le quote di cadmio. Anche sull'origine della necrosi e della degenerazione vacuolare furono addotte le stesse ipotesi; in effetti questi reperti fanno parte del quadro istologico tipico di animali cronicamente esposti al metallo. In particolare sono ampiamente noti gli effetti prodotti dal metallo a livello di tubulo prossimale, le cui cellule sono il vero target dell'intossicazione, e che includono soprattutto la necrosi. Questo spiega anche la maggiore concentrazione di cadmio nella corticale, dove i tubuli prossimali si trovano, che si riscontra normalmente a livello renale (Tataruch, 1993; Nowak, 1995), confermata anche nel presente studio.

Anche gli effetti tossici renali del piombo sono ben conosciuti e includono alterazioni mitocondriali, formazione di corpi inclusi nelle cellule dell'epitelio tubulare, fibrosi interstiziale e sia ipertrofia che atrofia dei tubuli stessi e dei glomeruli (Goyer, 1989; Nolan e Shaikh, 1992). A livello epatico si osservano degenerazione vacuolare e picnosi nucleare (Venugopal e Luckey, 1978). A livello di apparato genitale maschile si ricordano la succitata depressione della produzione di spermatogoni, cui si aggiunge il classico reperto dell'iperplasia prostatica (Friberg *et al.*, 1986). In ultimo bisogna citare le alterazioni degenerative che si instaurano a livello cerebrale e di midollo spinale, comprese anch'esse nel quadro del saturnismo (Venugopal e Luckey, 1978).

Per quanto riguarda le lesioni organiche correlate agli altri metalli oggetto del presente studio, si rimanda alla descrizione delle stesse inclusa nel capitolo dei metalli pesanti.

Al di là dei dati riportati in letteratura, per la maggior parte delle lesioni istologiche rinvenute nel presente lavoro non esiste una sicura correlazione con stati tossici causati dai metalli pesanti piombo, cadmio, ferro, zinco e rame. D'altra parte le basse concentrazioni di detti metalli, e soprattutto di cadmio e piombo, che qui si osservano non forniscono substrato adatto per spiegare i fenomeni stessi, la cui presenza richiede dosaggi decisamente superiori (Tohyama *et al.*, 1987; Swiergosz *et al.*, 1998).

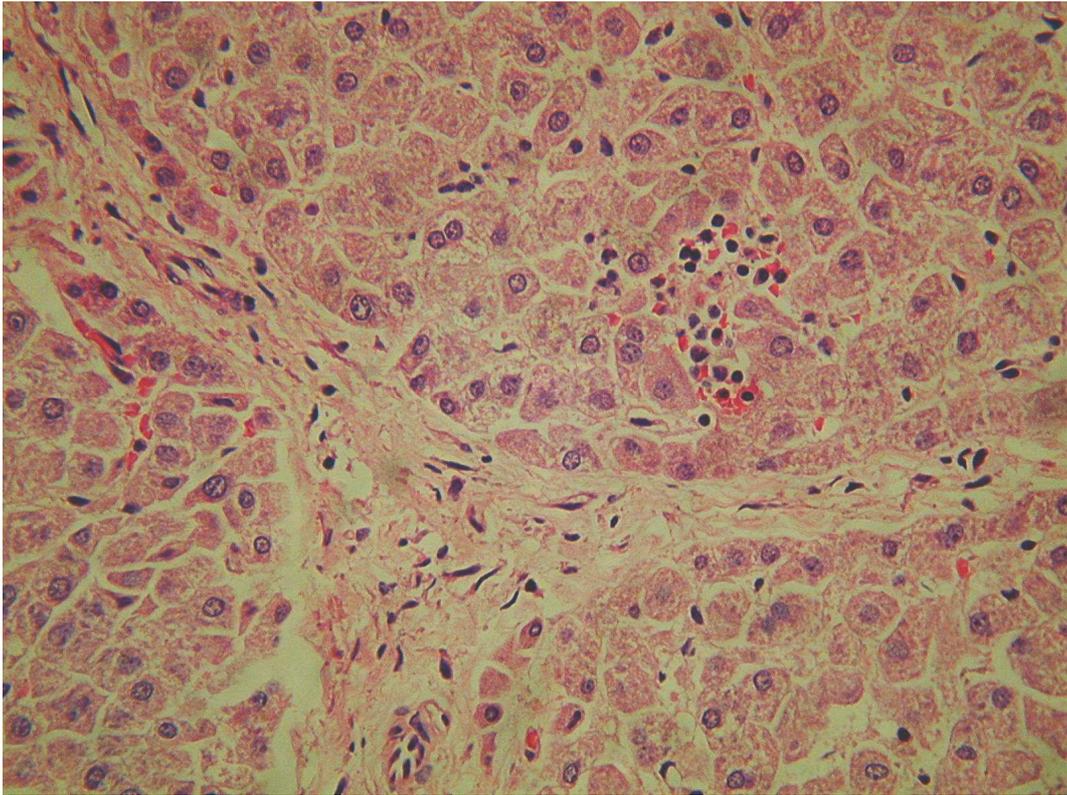
La presenza nel fegato di degenerazione vacuolare, soprattutto in posizione perilobulare, può rappresentare un quadro di moderata intossicazione che, comunque, non assume mai caratteristiche di stretta specificità.

La presenza dei piccoli corpi inclusi, sia eosinofili che basofili, era già stata segnalata, sempre nei cinghiali, nella tesi di laurea della Dott.ssa Maria Maddalena Mondelli (1999, Relatore Prof. Paolo Simoni), nella quale sia colorazioni istochimiche (PTAH) che osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione avevano consentito di definire la natura degli stessi come corpi proteici contenenti

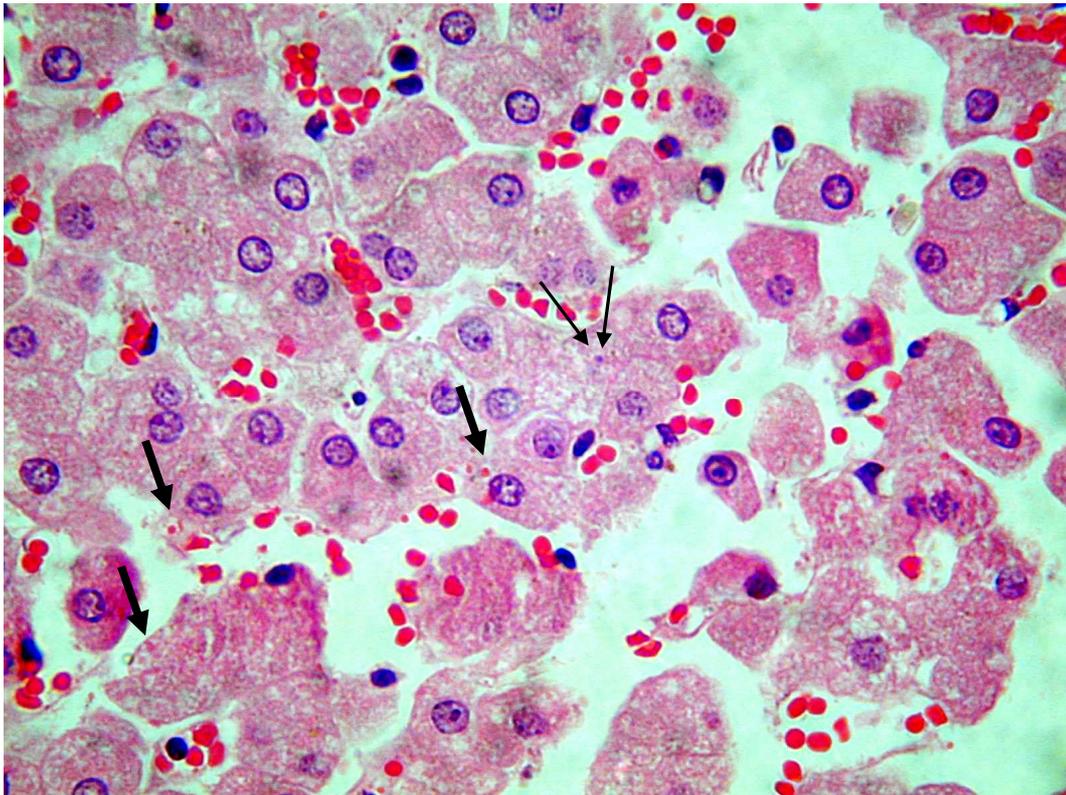
nuclei di fibrina. Questi reperti erano stati interpretati come una riespressione da parte degli epatociti di capacità fagocitarie, da porsi forse in relazione con episodi aspecifici di stati tossici.

A livello renale, l'elevata cellularità glomerulare presente nella maggior parte degli individui può essere messa in relazione con il fatto che gli animali abbattuti erano in prevalenza di età adulta, ed è rilievo costante in tutte le specie di mammiferi che i processi di invecchiamento contengono un aumento delle cellule, prevalentemente mesangiali, all'interno dei glomeruli.

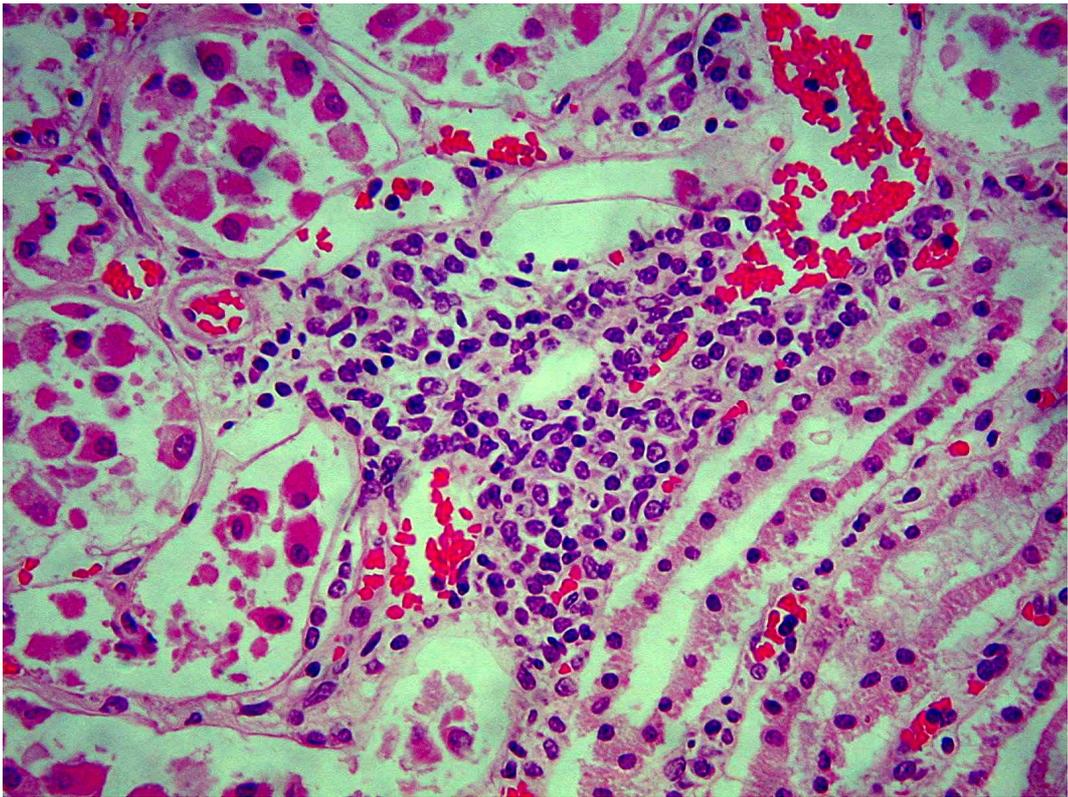
I quadri costanti di polmonite interstiziale, che apparentemente non minano lo stato di benessere degli animali, sembrano rappresentare fenomeni di adattamento a reiterati episodi infettivi e/o infestivi, comunemente riscontrati in molti animali selvatici.



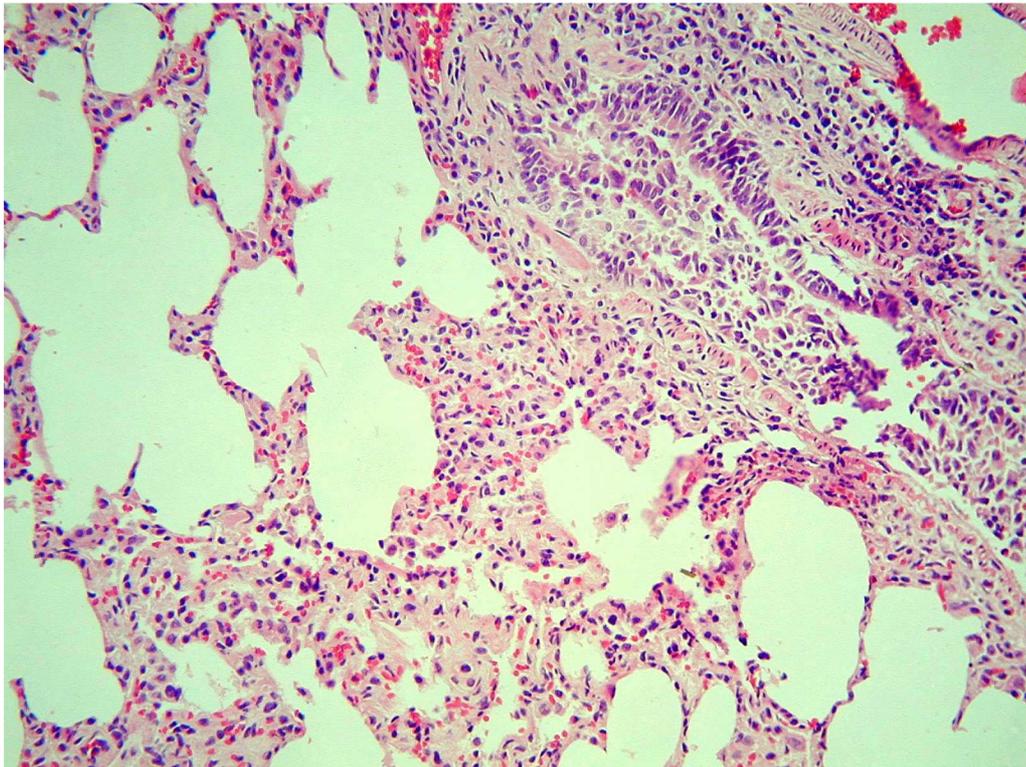
**Fig. 4.5- Fegato:** degenerazione vacuolare prevalentemente perilobulare. Si noti il focolaio infiammatorio composto principalmente da linfociti. E&E. Ob. 25X



**Fig. 4.6-Fegato: dissociazione delle lamine epatiche. Da notare i corpi inclusi eosinofili (freccia semplice) e basofili (freccia doppia) intracellulari circondati da aloni chiari. Si evidenzia anche modesta congestione. E&E. Ob. 40X.**



**Fig.4.7- Rene: nefrite interstiziale, la cui componente cellulare risulta composta da linfociti e plasmacellule. Da notare il fenomeno congestizio. E&E. Ob. 25X.**



**Fig. 4.8- Polmone: bronchite e polmonite interstiziale cronica. E&E. Ob. 10X.**

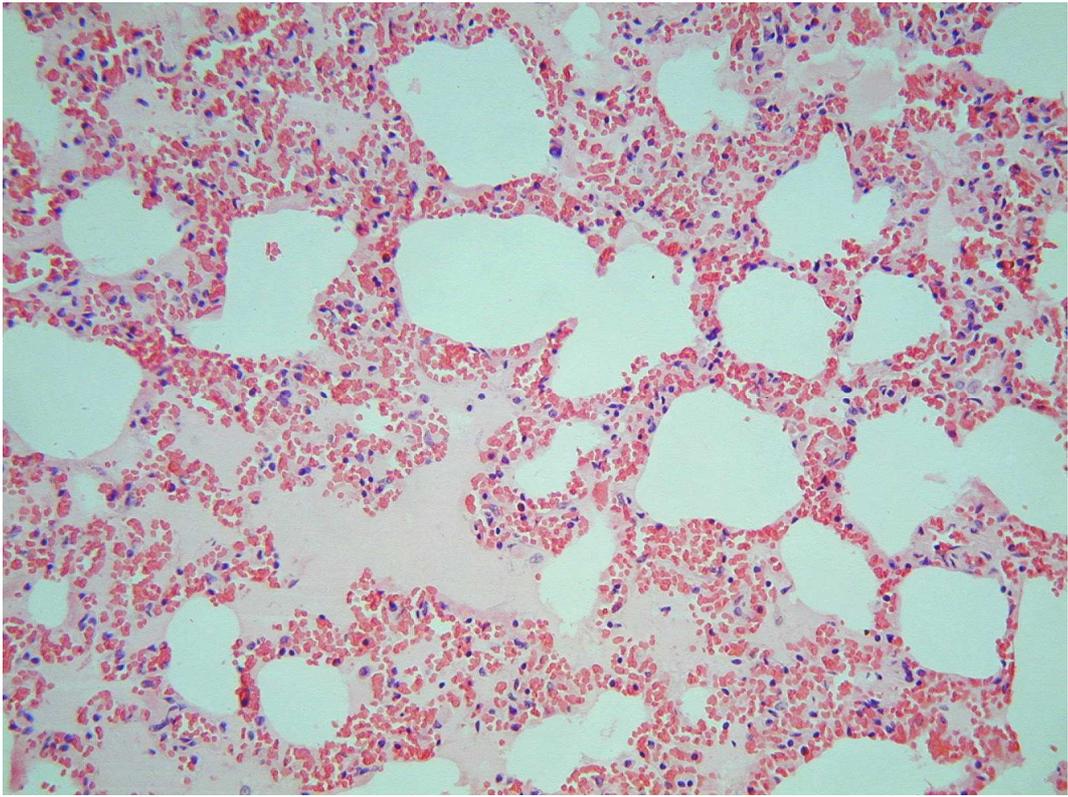


Fig. 4.9- Polmone: **edema alveolare con imponente congestione. E&E. Ob. 10X.**

**5. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI TOSSICI DI  
PALLINI DA CACCIA DI DIVERSA TIPOLOGIA SU  
GERMANO REALE (*Anas Plathyrynchos*)**

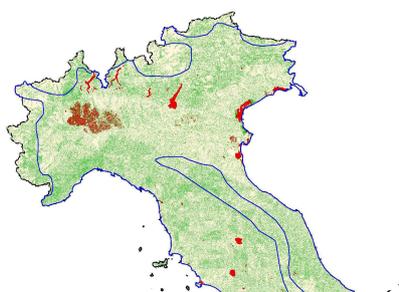


## 5.1 CENNI DI BIOLOGIA DEL GERMANO REALE (*Anas Plathyrynchos*)

Il germano reale appartiene alla classe degli UCCELLI, ordine degli ANSARIFORMI e famiglia degli ANATIDI ([www.inseparabile.com/.../germano\\_reale.htm](http://www.inseparabile.com/.../germano_reale.htm)) e viene chiamata anche anatra selvatica o capoverde o colloverde (Coni E. – [www.ilcacciatore.com/diario/schede\\_germano.htm](http://www.ilcacciatore.com/diario/schede_germano.htm)).

E' certamente l'anatra selvatica più diffusa e comune. Le paludi, anche le più piccole, i litorali, gli stagni, le rive calme dei corsi d'acqua possono ospitare questa specie che si adatta facilmente ([www.anatidi.it/specie/germano.asp](http://www.anatidi.it/specie/germano.asp)) La specie è ampiamente distribuita in tutta l'Eurasia e l'America settentrionale, in particolare nidifica nelle regioni settentrionali di questi continenti senza, però, spingersi fino alle zone artiche. Durante l'inverno, invece, si porta nelle aree meridionali raggiungendo le regioni nord del tropico (Coni E. – [www.ilcacciatore.com/diario/schede\\_germano.htm](http://www.ilcacciatore.com/diario/schede_germano.htm)).

In Italia è comune durante la migrazione (settembre novembre e febbraio-aprile) e come sedentario e nidificante soprattutto al nord e al centro ([www.ildeltadelpo.it/parco\\_del\\_delta\\_del\\_po\\_germano.htm](http://www.ildeltadelpo.it/parco_del_delta_del_po_germano.htm)) (Fig. 5.1).



(a)

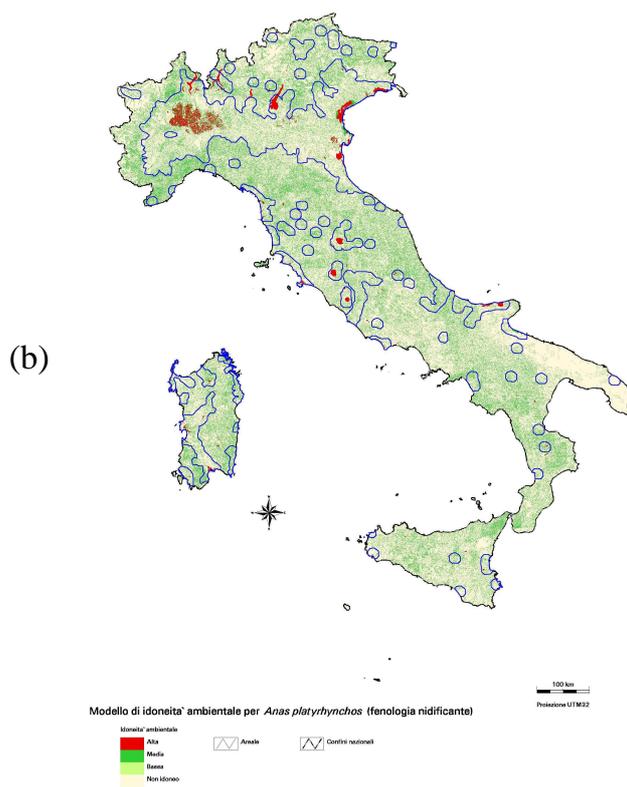


Fig. 5.1- Fenologia di distribuzione (a) e di nidificazione (b) di germano reale in Italia.

Il germano reale viene anche allevato in talune riserve a scopo di caccia (Coni E. – [www.ilcacciatore.com/diario/schede\\_germano.htm](http://www.ilcacciatore.com/diario/schede_germano.htm)).

La specie è caratterizzata da un marcato dimorfismo sessuale: si noti infatti come il maschio sia tanto appariscente mentre la femmina appare sobria e mimetica. ([www.inseparabile.com/.../germano\\_reale.htm](http://www.inseparabile.com/.../germano_reale.htm)) (Foto 5.1).



**Fig. 5.1- Morfologia di adulti**

L'adulto è lungo circa 50 cm, l'ala misura 27 cm, la coda 9, il becco 5,6 e il tarso 4,5 ([www.inseparabile.com/.../germano\\_reale.htm](http://www.inseparabile.com/.../germano_reale.htm)). Il maschio presenta un peso variabile tra 850 e 1570 gr mentre la femmine tra 700 e 1320 gr ([www.anatidi.it/specie/germano.asp](http://www.anatidi.it/specie/germano.asp)).

Il maschio presenta il capo e la parte alta del collo di colore verde, con suggestivi riflessi metallici; tale tinta è delimitata da un collare bianco talvolta incompleto nella parte posteriore. La parte bassa del collo e del petto sono brunoporporino; il dorso e il ventre si presentano invece grigi.

Lo specchio dell'ala, che è pure grigio, è violetto con riflessi blu-verdastri ed è marginato superiormente e inferiormente da una striscia nera e da una bianca. (Coni E. – [www.ilcacciatore.com/diario/schede\\_germano.htm](http://www.ilcacciatore.com/diario/schede_germano.htm))

La coda è, sempre nel maschio, nera-bluastro con orlature bianche e presenta come particolarità due timoniere centrali arricciate (in abito completo) ([www.anatidi.it/specie/germano.asp](http://www.anatidi.it/specie/germano.asp)). Le gambe e i piedi sono rosso-aranciati e il becco giallo-verde con la punta e la parte superiore tendenti al nero.

La femmina ha invece un colorito generale bruno-fulvo con numerose macchie scure e il becco olivastro. Inoltre la coda, di colore grigio-bruno, non presenta il caratteristico ricciolo (Coni E. – [www.ilcacciatore.com/diario/schede\\_germano.htm](http://www.ilcacciatore.com/diario/schede_germano.htm)), mentre le zampe sono di colore giallo-grigio ([www.anatidi.it/specie/germano.asp](http://www.anatidi.it/specie/germano.asp)).

Il maschio non maturo (“in eclisse”) somiglia ad una femmina scura, ma con specchio più brillante, vertice più nero e petto più rossiccio ([www.scalve.it/faunistico/GERMANOREALE.htm](http://www.scalve.it/faunistico/GERMANOREALE.htm)).

La femmina è distinta da quella della *Canapiglia* per dimensioni maggiori, colorazione più bruna, specchio porporino e ali meno appuntite; da quella del *Codone* per il becco e la testa più massicci, per il collo più grosso, per il bianco che contorna entrambi i lati dello specchio e per la coda, biancastra, più corta; infine dalla femmina del *Mestolone* per dimensioni maggiori e becco molto più piccolo ([www.scalve.it/faunistico/GERMANOREALE.htm](http://www.scalve.it/faunistico/GERMANOREALE.htm)).

Il maschio e la femmina possono ancora essere distinti in base al grido (Coni E. – [www.ilcacciatore.com/diario/schede\\_germano.htm](http://www.ilcacciatore.com/diario/schede_germano.htm)): il maschio, infatti, emette un sommesso e gutturale “yeeb” o “quek” mentre la femmina produce un profondo e molto sonoro “qua-qua-qua” simile a quello emesso dalle anatre domestiche ([www.oasivallibrusa.it/germano\\_reale.htm](http://www.oasivallibrusa.it/germano_reale.htm)).

Il germano reale si nutre di un'ampia varietà di alimenti, gemme, semi di cereali, vermi, larve, piccoli pesci ([www.scalve.it/faunistico/GERMANOREALE.htm](http://www.scalve.it/faunistico/GERMANOREALE.htm)). Come tutte le anatre di superficie si nutre alzando la coda ed immergendo testa e

petto nell'acqua esplorando i fondali  
([www.ildeltadelpo.it/parco\\_del\\_delta\\_del\\_po\\_germano.htm](http://www.ildeltadelpo.it/parco_del_delta_del_po_germano.htm)) (foto 5.2).



Foto. 5.2- Esempi di comportamento alimentare di germano reale.

La stagione riproduttiva inizia a marzo: il maschio nuota attorno alla femmina, immergendo parzialmente il becco e poi sollevandolo emettendo così getti d'acqua con un sibilo al quale la femmina risponde gracchiando ([www.regione.emilia-romagna.it/laguna/articolo.asp](http://www.regione.emilia-romagna.it/laguna/articolo.asp)).

La femmina, dopo l'accoppiamento, nidifica fra le alte erbe delle paludi e, talvolta, sia pur raramente, utilizza nidi abbandonati da altri uccelli come gazze o corvi (Coni E. – [www.ilcacciatore.com/diario/schede\\_germano.htm](http://www.ilcacciatore.com/diario/schede_germano.htm)). Depone circa 7-16 uova di colore giallo-grigio-verde e talvolta anche bluastre; le dimensioni sono di 57,8x 41,2 mm, l'incubazione dura circa 26 giorni e le covate possono anche essere 2 per stagione (Coni E. – [www.ilcacciatore.com/diario/schede\\_germano.htm](http://www.ilcacciatore.com/diario/schede_germano.htm)).

Con il passare del tempo di incubazione il nido viene tappezzato da un soffice piumino che la femmina si stacca dal ventre. All'inizio il maschio resta a guardia in prossimità del nido, ma, poi, prima ancora che i piccoli nascano, si allontana in cerca di altre femmine.

Già il secondo giorno dopo la nascita, i piccoli escono dal nido e nuotano subito, si tuffano e cercano cibo nell'acqua con estrema naturalezza (Coni E. – [www.ilcacciatore.com/diario/schede\\_germano.htm](http://www.ilcacciatore.com/diario/schede_germano.htm))

## **5.2. MATERIALI E METODI**

### **5.2.1. Protocollo di trattamento**

La sperimentazione oggetto del presente lavoro è stata sottoposta a valutazione ed autorizzazione da parte del Comitato Etico-Scientifico, ottenuta in data 7 settembre 2004 (prot. 53925-X/6).

Presso il Dipartimento di Farmacologia e Tossicologia veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna, sono stati tenuti a stabulazione libera in ambiente unico, 50 Germani Reali (*Anas platyrhynchos*), 25 maschi e 25 femmine di 6 mesi, alimentati con mangime completo in granaglie per volatili ed acqua *ab libitum*, mantenuti per 52 giorni ad una temperatura costante di 22°C ed un fotoperiodo il più possibile simile a quello naturale.

Al 7° giorno dal loro arrivo (giorno 0), ogni anatra è stata pesata ed è stato eseguito un prelievo di sangue dalla vena brachiale (P<sub>0</sub>), tramite vacutainer da 3 ml eparinizzato.

Gli animali sono stati suddivisi in 5 gruppi da 10 unità ciascuno (5 maschi e 5 femmine), inanellati con anelli di colore diverso e numerati, che consentivano di distinguere tra loro i gruppi, e trattati con 2 o 4 pallini N°4 di piombo (gruppi V2 e V4) e 2 o 4 pallini N°6 di acciaio ferroso (equivalenti, secondo le specifiche del

fornitore, al piombo N°4; gruppi B2 e B4); un gruppo, non trattato, è stato mantenuto come controllo (gruppo A). I pallini venivano inseriti direttamente in proventricolo con tubo in lattice della lunghezza di circa 20 cm.

A partire dal giorno 0 sono state effettuate 2 osservazioni quotidiane annotando nelle schede individuali (Tav. 1) eventuali segni clinici o alterazioni comportamentali indicative di intossicazione.

Dai singoli campioni di sangue sono stati prelevati 300 µl per la determinazione della concentrazione ematica di piombo. La restante parte è stata inviata al Dipartimento Clinico, sezione Clinica Medica per la determinazione di ALT, AST, LDH, creatinina, HCT, concentrazione di emoglobina.

I prelievi ematici (P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>) sono stati ripetuti dopo 15, 30 e 45 giorni dall'inizio della sperimentazione. Nelle stesse date i singoli soggetti venivano nuovamente pesati per verificarne l'incremento ponderale.

Ogni qual volta un soggetto mostrasse chiari segni di sofferenza si provvedeva alla sua soppressione, previa effettuazione di un prelievo di sangue, ai fini analitici. Al termine dei 45 giorni di sperimentazione tutti i soggetti ancora in vita sono stati soppressi per dislocazione cervicale dopo il prelievo ematico e sono stati sottoposti ad autopsia.

SCHEDA GERMANO REALE

ANELLO N. \_\_ COLORE \_\_ SESSO      M      F

TRATTAMENTO \_\_\_\_\_

**PESO**

DATA	PESO

**PRELIEVI**

DATA	VOLUME PRELEVATO

**RILIEVI SANITARI E ALTRO**

DATA	RILIEVO OSSERVATO

Tav. 5.1- Scheda di rilevamento individuale compilata giornalmente per ogni singolo soggetto.

### 5.2.2. Protocollo autoptico e analisi anatomo-istopatologiche

La procedura autoptica includeva un esame di tutti gli organi e cavità. Dopo apertura della carcassa è stato effettuato un esame ispettivo del contenuto dello stomaco muscolare per valutare la presenza e lo stato corrosivo del pallino. Sono stati rimossi cervello, cuore, polmoni, fegato, reni e gonadi, analizzati macroscopicamente. Campioni di fegato, rene e milza sono stati prelevati subito dopo la morte degli animali, fissati in formalina di Carson, inclusi in paraffina, sezionati a 5 $\mu$  e colorati con ematossilina-eosina ai fini dell'esame istologico; contemporaneamente campioni di fegato, rene e muscolo sono stati conservati a -20°C per le analisi di tipo tossicologico.

### 5.2.3. Analisi tossicologiche

Nell'effettuare questo studio, tutti i procedimenti analitici, i reattivi e gli standard utilizzati erano adeguati e rispondevano ai requisiti richiesti per la valutazione dei metalli pesanti.

#### 5.2.3.1. Mineralizzazione dei campioni

I saggi analitici sono stati condotti su quantitativi di campione liofilizzato pari a 200  $\pm$  10 mg che, posti in provette di plastica opportunamente lavate con acido nitrico ed acqua, venivano successivamente addizionati di 2 ml di HNO<sub>3</sub> e 0,5 ml di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In seguito venivano sottoposti a processo digestivo rapido con applicazione di calore in fornello microonde modello MLS 1200 della ditta Milestone; questo procedimento prevede 5 fasi termiche, riassunte in tabella 1.

Al termine del processo digestivo i campioni venivano portati a un volume di 10 ml per aggiunta di acqua bidistillata e le soluzioni ottenute erano mantenute in frigorifero a +4°C fino all'esecuzione delle letture analitiche.

Fase	Parametro		
	Potenza (W)	Tempo (min)	Azione
1	250	1	Ossidazione
2	/	1	/
3	250	5	Completamento dell'ossidazione
4	400	5	Completamento dell'ossidazione
5	650	5	Completamento dell'ossidazione

Tab. 5.1- **Condizioni di mineralizzazione applicate.**

### 5.2.3.2. *Analisi dei campioni*

Per la determinazione analitica è stata utilizzata la tecnica della spettrometria di emissione atomica con eccitazione a plasma ad induzione (ICP-AES). È stato utilizzato un ICP sequenziale Jobin Yvon Ultima 2 con configurazione della torcia radiale.

Il flusso del gas di trasporto era regolato a 12 l/min, la potenza del generatore di radiofrequenza era fissata 1100 W. La configurazione sequenziale dello strumento ha permesso di ottimizzare i parametri di acquisizione per ogni riga analitica.

Le righe analitiche utilizzate ed i loro parametri di acquisizione sono riportati nella seguente tabella. Ogni riga analitica è stata acquisita tre volte ed i risultati sono la media della tre letture.

Elemento	Lunghezza d'onda (nm)	Mode	Integration time (s)	Increment (pm)	Punti
<b>Cu</b>	324.754	Max	3	4	3
<b>Fe</b>	259.940	Max	3	3	3
<b>Pb</b>	220.353	Max	5	2	3
<b>Zn</b>	213.856	Max	3	2	3

La calibrazione dello strumento è stata effettuata mediante la lettura di standard esterni. Le concentrazioni degli standard utilizzati sono riportate nella tabella seguente

<b>elemento</b>	<b>standard 0 (mg/l)</b>	<b>standard 1 (mg/l)</b>	<b>standard 2 (mg/l)</b>	<b>standard 3 (mg/l)</b>
<b>Cu</b>	0	0,5	1	2
<b>Fe</b>	0	0,5	1	2
<b>Pb</b>	0	0,5	1	2
<b>Zn</b>	0	0,01	0,02	0,05

#### 5.2.4. Analisi statistica

L'analisi statistica dei dati è stata condotta con il programma descritto nel capitolo precedente; il test è stato utilizzato per l'analisi dei dati biometrici, ematologici, biochimici e tossicologici, utilizzando come parametro di classificazione il gruppo di appartenenza. Per quanto riguarda i test ematologici, biochimici e ematotossicologici è stata presa in considerazione quale variabile aggiuntiva anche il tempo.

### **5.3. RIAULTATI E DISCUSSIONE**

Nella tabella seguente sono riportati, come media  $\pm$  e.s., i pesi registrati dei pallini somministrati agli animali e il rispettivo peso al termine della sperimentazione. Appare evidente come si sia effettivamente verificata una dissoluzione degli stessi, a testimoniare un assorbimento di metalli durante la sperimentazione.

<b>GRUPPO</b>	<b>Peso pre-trattamento (g)</b>	<b>Peso post-trattamento (g)</b>	<b>% di dissoluzione</b>	<b>Stima della quantità di metallo assunta (g)</b>
<b>B2</b>	0.288 $\pm$ 0.0005	0.0982 $\pm$ 0.0037	57.08	0.1306
<b>B4</b>	0.4576 $\pm$ 0.0015	0.1992 $\pm$ 0.0054	56.47	0.2584
<b>V2</b>	0.35 $\pm$ 0.0056	0.268 $\pm$ 0.01	23.28	0.0815
<b>V2</b>	0.6972 $\pm$ 0.0105	0.59 $\pm$ 0.0322	15.37	0.1072

Sebbene le percentuali di dissoluzione siano maggiori per i gruppi a basso dosaggio, è ben evidente come in realtà il quantitativo di metallo assorbito, sia esso acciaio ferroso o piombo, sia maggiore nei gruppi B4 e V4. Si tenga comunque presente che il quantitativo è una stima calcolata sulla base della percentuale di erosione, che può solo quindi essere presa come indicazione delle quantità disponibili dell'assorbimento e non del reale quantitativo assorbito. La valutazione effettiva delle quote assorbite viene fornita invece dai valori ematici di piombo e ferro, discussi successivamente.

I pesi medi dei singoli gruppi in funzione del tempo sono riportati in fig. 5.2.

Valutando i dati del primo giorno di campionamento, i pesi medi per ogni gruppo sono molto simili tra loro, dimostrando l'omogeneità del campione considerato.

I gruppi A e B2 hanno presentato una crescita costante e fisiologica del peso corporeo, nonostante un leggero calo al secondo campionamento, osservato anche nel gruppo B4, riconducibile ad un adattamento fisiologico degli animali al trattamento ed alle nuove condizioni di stabulazione.

Il gruppo B4 al terzo campionamento presentava livelli di crescita ponderale sovrapponibili ai gruppi precedenti, con un decremento successivo riconducibile all'intossicazione da ferro presente, raggiungendo i valori medi osservati al primo campionamento.

I gruppi V2 e V4 mostravano un calo progressivo del peso, considerevolmente maggiore tra il 2° ed il 3° campionamento, con differenze statisticamente significative tra i vari punti sperimentali.

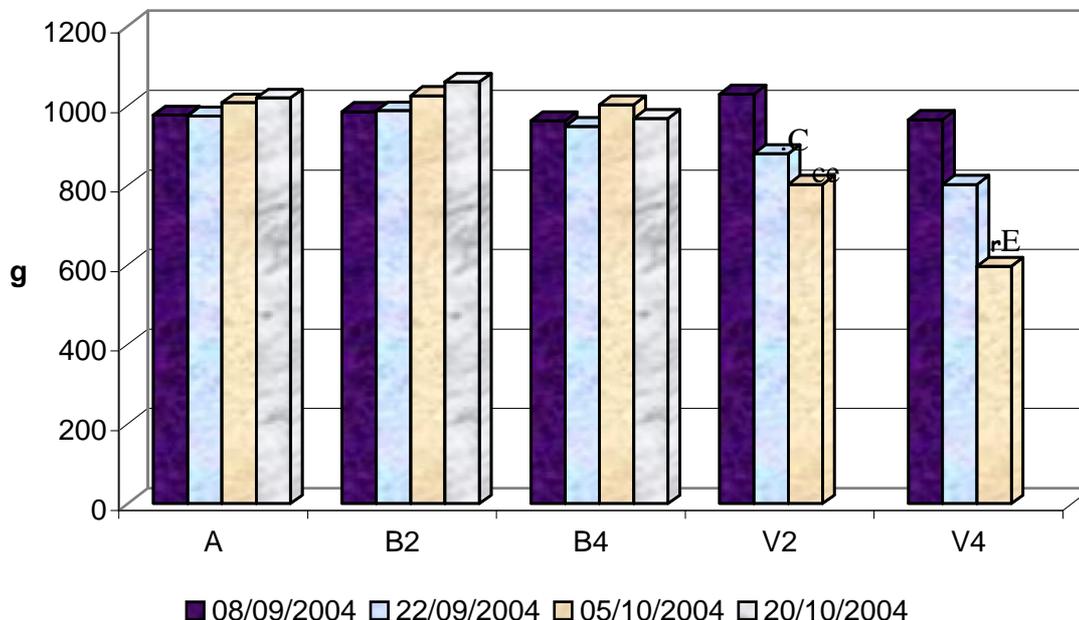


Fig. 5.2- Andamento dei pesi medi espressi in grammi nei 5 gruppi sperimentali in funzione del tempo.  
\*:  $p < 0.05$ .

Al notevole calo del peso corporeo osservato nei gruppi trattati con piombo corrispondeva la comparsa già a partire dai primi giorni post-trattamento di una sintomatologia clinica caratterizzata da un lieve stato depressivo (tab. 5.2). In particolare le prime alterazioni comportamentali si rilevavano nel gruppo V4 già 4-5 giorni dopo l'assunzione di Pb, mentre nel gruppo V2 tali manifestazioni erano leggermente più tardive, anche se il tempo di latenza si manteneva entro i 7 giorni.

I dati riportati in tabella evidenziano una costante presenza di depressione del sensorio con conseguente diminuzione della risposta agli stimoli e diminuzione del timore per l'uomo. A livello clinico le femmine presentavano uno stato depressivo più intenso rispetto ai maschi e, in generale, una sintomatologia più marcata e precoce. Il dato è apparentemente in contrasto con quanto reperito in letteratura: le femmine vengono infatti indicate come più resistenti all'intossicazione da piombo rispetto ai maschi, fatto questo imputato in parte all'attività riproduttiva (Kelly et al., 1998; Mateo e Guitart, 2002).

Essendo tutti gli animali stabulati in un unico locale non è stato possibile quantificare il grado di anoressia dei singoli soggetti, tuttavia è possibile

evidenziare la presenza di tale stato da un costante calo di peso corporeo (valutabile in vivo dalla comparsa della sporgenza sternale). E' curioso evidenziare come gli animali sani assumessero atteggiamenti aggressivi nei confronti dei soggetti debilitati, impedendo loro l'avvicinamento all'alimento ed all'acqua.

Il particolare atteggiamento di "ala cadente", considerato come sintomo patognomonico di questa intossicazione come conseguenza dello stato atrofico della muscolatura pettorale, è stato riscontrato in entrambi i gruppi di animali.

Oltre ai segni clinici riportati in tabella, gli animali con grave sintomatologia si presentavano in stato ipotermico con temperatura cloacale di 36°C, frequenza respiratoria aumentata pari a 39 atti resp./min (valori fisiologici negli anatidi: 13-23 atti resp./min) e frequenza cardiaca su valori pari a 150 batt./min (valori fisiologici anatidi: 150-250 batt/min) (Ritchie et al, 1994).

Gli animali con sintomatologia evidente presentavano imbrattamento della cloaca con materiale verdastro a causa della diarrea presente, penne arruffate conseguente allo stato depressivo e all'incapacità di effettuare la pulizia del piumaggio; in un unico caso (49V) erano presenti narici e becco imbrattato di materiale catarrale con conseguente dispnea; un animale (77V) presentava zoppia.

Gli animali trattati con 4 pallini hanno mostrato un tempo d'insorgenza della sintomatologia inferiore con presenza di atassia costante, a differenza del gruppo trattato con 2 pallini. L'alterato stato di coordinazione causava un mancato mantenimento della stazione eretta: i soggetti rimanevano accovacciati con alterazioni posturali di testa e collo, mantenuti estesi.

E' importante sottolineare che, a differenza dei dati presenti in letteratura, nei nostri animali non sono stati rilevati sintomi di compromissione centrale quali: convulsioni, movimenti in circolo, cecità, paresi, paralisi e tremori della testa poiché, per motivi etici, tutti i soggetti sono stati soppressi non appena il quadro clinico indicava uno stato di sofferenza dell'animale.

<i>SOGGETTO</i>	<i>Depressione</i>	<i>Dimagrimento</i>	<i>Ali cadenti</i>	<i>Atassia</i>	<i>Imbrattamento della cloaca</i>	<i>Edema sottocutaneo</i>	<i>Debolezza muscolare</i>
<i>4V M</i>		X	X		X		X
<i>8V M</i>	X	X	X		X		X
<i>14V F</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>29V F</i>	X	X	X	X	X		X
<i>40V F</i>	X	X	X	X	X		X
<i>46V M</i>		X	X		X		X
<i>48V M</i>		X	X		X		X
<i>77V F</i>	X	X	X	X	X		X
<i>90V M</i>		X	X	X	X		X
<i>93V F</i>	X	X	X	X	X		X
<i>6V M</i>	X	X	X		X		
<i>17V F</i>	X	X	X	X	X		X
<i>24V F</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>36V M</i>	X	X	X	X	X		X
<i>49V M</i>	X	X	X		X		X
<i>62V F</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>70V M</i>		X		X	X		
<i>73V F</i>	X	X	X	X	X	X	X
<i>75V F</i>	X	X	X		X		X
<i>86V M</i>	X	X	X		X		

Tab. 5.2- Elenco della sintomatologia rilevata nei singoli soggetti con chiara manifestazione clinica.

La sopravvivenza nei gruppi V2 e V4 era relativamente bassa e pari a  $19.9 \pm 2.30$  e  $11.6 \pm 0.95$  giorni rispettivamente. Tale valore è decisamente inferiore rispetto a quanto riportato da Kelly et al., (1998) per uno studio analogo. Va comunque sottolineato come il dato rilevato nel presente lavoro non sia una mortalità effettiva, in quanto gli obblighi etici, imposti anche dalla legislazione vigente, hanno richiesto la soppressione degli animali ogni qual volta comparissero chiari segni di sofferenza. La sopravvivenza degli animali considerati sarebbe quindi stata leggermente superiore, ma non è valutabile con esattezza. Si ritiene comunque che i valori di sopravvivenza ottenuti si discostino di poco da quelli che si sarebbero ricavati lasciando giungere ad exitus spontaneamente gli animali. A titolo di esempio valga il dato relativo a due soggetti deceduti durante la notte e che mostravano solo lievi segni di intossicazione all'ultimo giorno di osservazione, il 4° post-trattamento.

Dal un punto di vista dei parametri ematologici e biochimici bisogna innanzitutto premettere come i confronti statistici siano stati effettuati solo sui dati relativi al 15° giorno di sperimentazione per i livelli di HB e di ematocrito e sui dati dei punti P0 e P1 per gli enzimi. Questo perché nel primo caso il 15° giorno era l'unico momento della fase post-trattamento della sperimentazione in cui erano disponibili dati relativi a tutti e 5 i gruppi, mentre nelle fasi successive vanivano meno i gruppi V2 e V4. Un discorso analogo vale per quanto riguarda gli enzimi saggiati: anche in questo caso dati "completi" (relativi a tutti e 5 i gruppi) erano disponibili solo fino al 15° giorno di sperimentazione.

Per quanto riguarda i parametri ematologici saggiati si deve rilevare come al 15° giorno di sperimentazione si osservi una forte riduzione, statisticamente significativa ( $p < 0.01$ ), dei livelli di Hb e di ematocrito nei gruppi V2 e V4, ad indicare l'insorgenza di un forte stato anemico indotto dal piombo stesso. Il metallo è infatti da un lato un potente inibitore della sintesi dell'eme e dall'altro ha una notevole capacità di aumentare la fragilità della membrana dei globuli rossi, riducendone l'emivita. Ciò comporta, intuitivamente, una diminuzione nei livelli di emoglobina ed una maggior distruzione di globuli rossi, con decremento dell'ematocrito (fig. 5.3).

Da un punto di vista biochimico, si rilevano differenze statisticamente significative nei livelli di AST e creatinina al 15° giorno per i soli gruppi V2 e V4, mentre i gruppi B2, B4 e A erano comparabili tra loro (fig. 5.4 e 5.5). Non si rilevano differenze invece per quanto riguarda i valori di ALT e di LDH (fig. 5.6-5.7). Il dato pare indicare un'interessamento epatico dovuto all'intossicazione da piombo, con danno al tessuto epatico. Ciò è in accordo con quanto osservato da Kelly et al., (1998), che in una sperimentazione analogo rileva un forte aumento dei livelli di AST e creatinina, cui però si accompagna anche un aumento degli altri due parametri biochimici. Va

comunque sottolineato come nel lavoro di Kelly et al. agli animali venisse somministrato un numero di pallini di piombo doppio rispetto a quelli somministrati nel presente studio e questo potrebbe aver indotto un danno epatico maggiore, con interessamento degli altri enzimi epatici.

Risultati analoghi a quanto rilevato nel presente lavoro ottengono anche Mitchell et al. (2001) e Brewer et al. (2003), i quali non solo riportano di incrementi statisticamente significativi di AST e creatinina, ma anche di ALT e LDH. Analogamente a quanto considerato per Kelly et al., (1998) va comunque ricordato che i dosaggi utilizzati dagli autori sono notevolmente superiori a quelli somministrati nel presente studio.

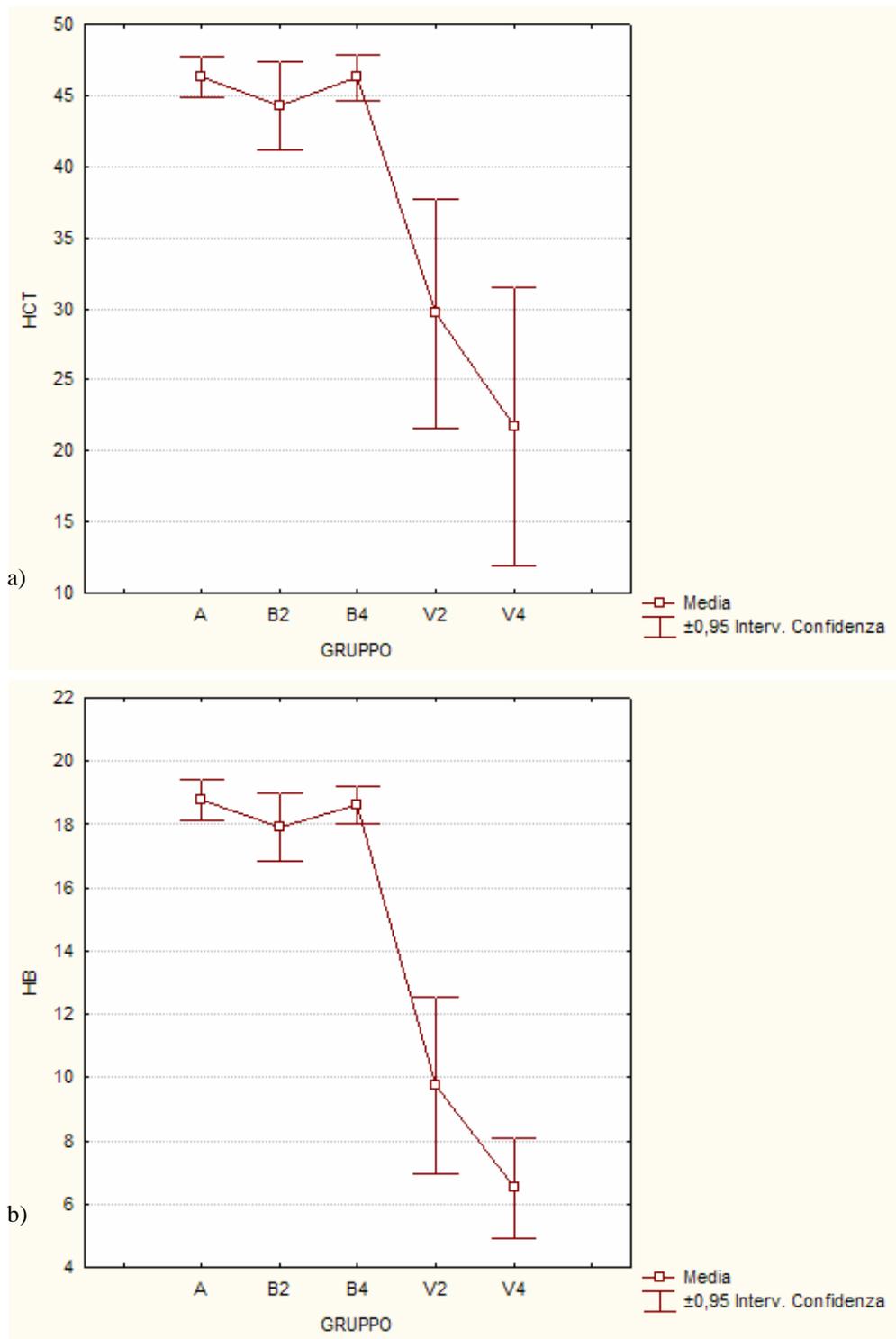


Fig. 5.3- Livelli di ematocrito (HCT, %; a) e di emoglobina (HB, g/dl; b) nei 5 gruppi sperimentali a 15 gg post-trattamento.

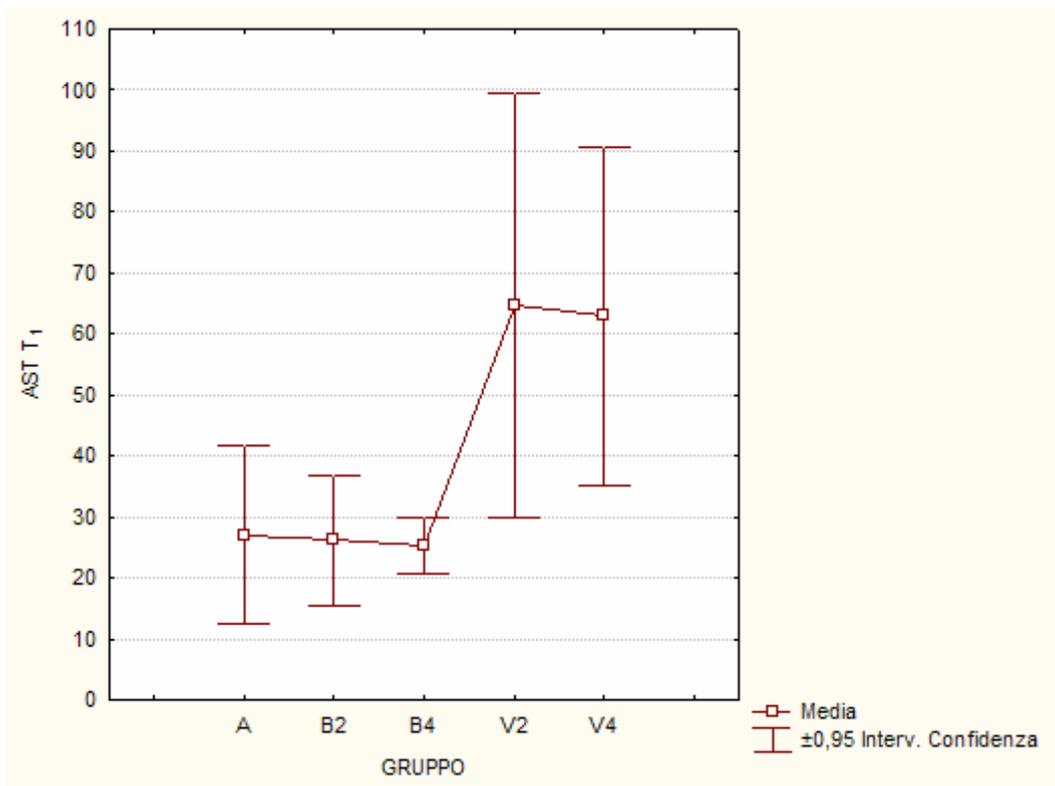
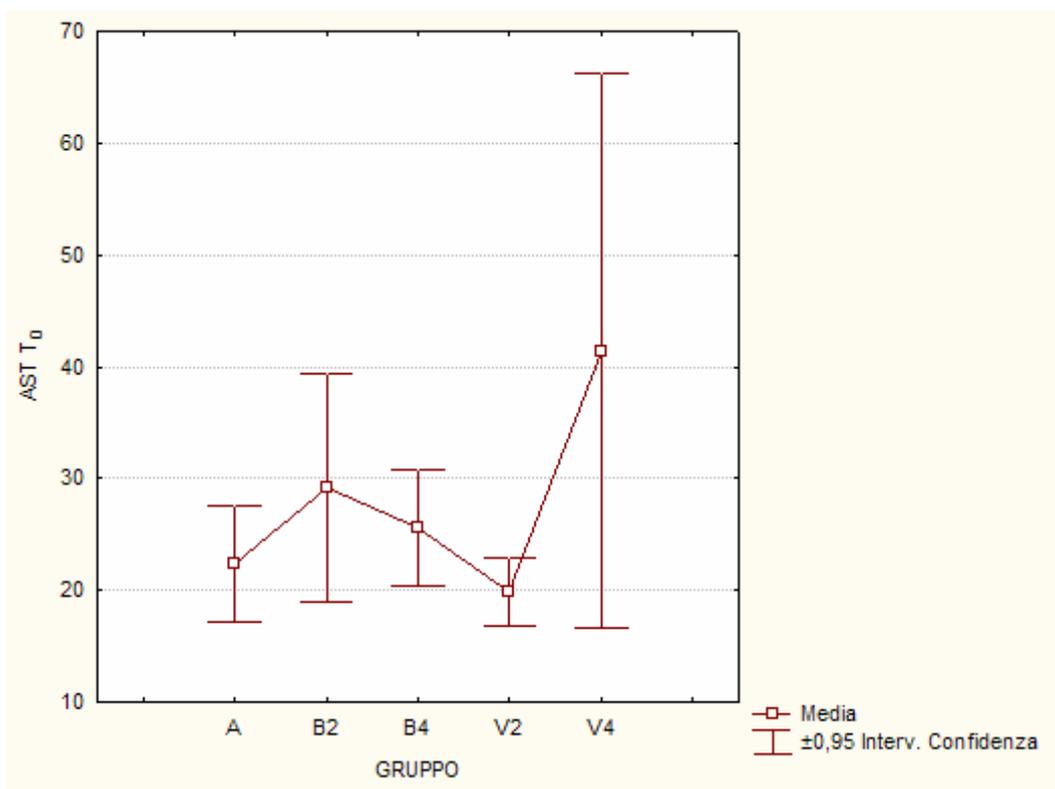
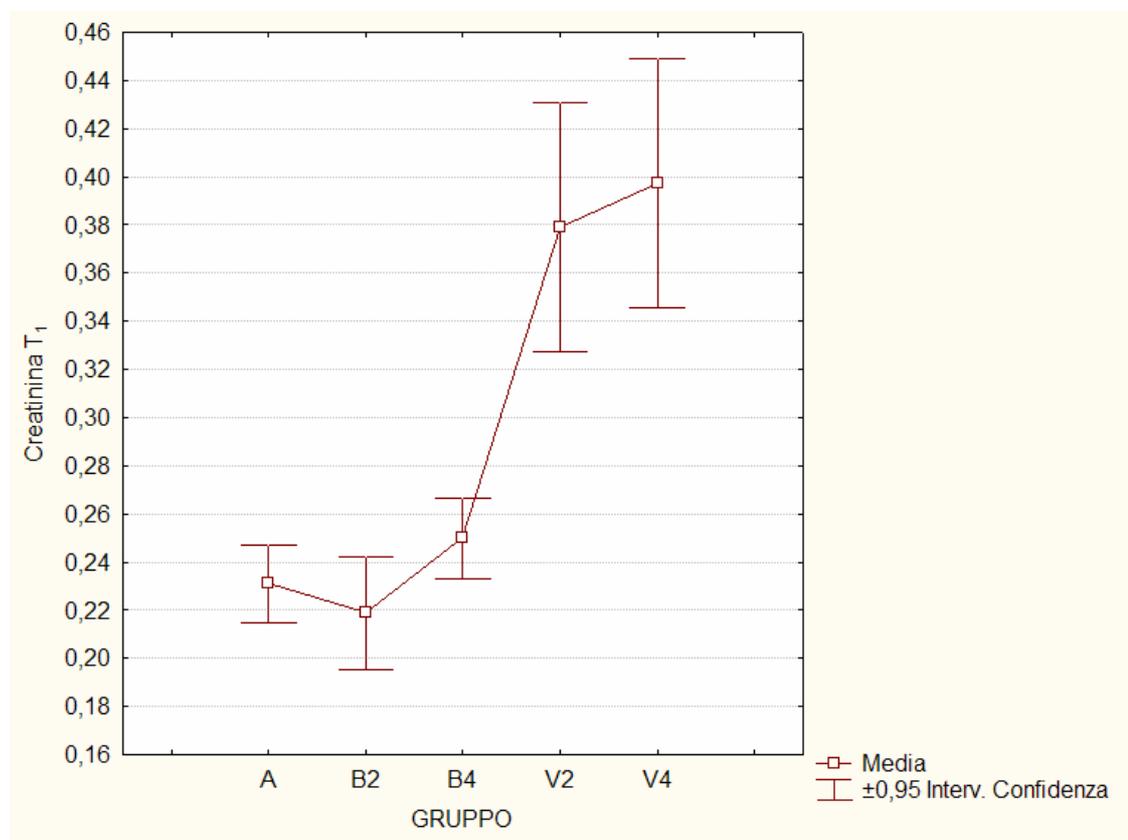
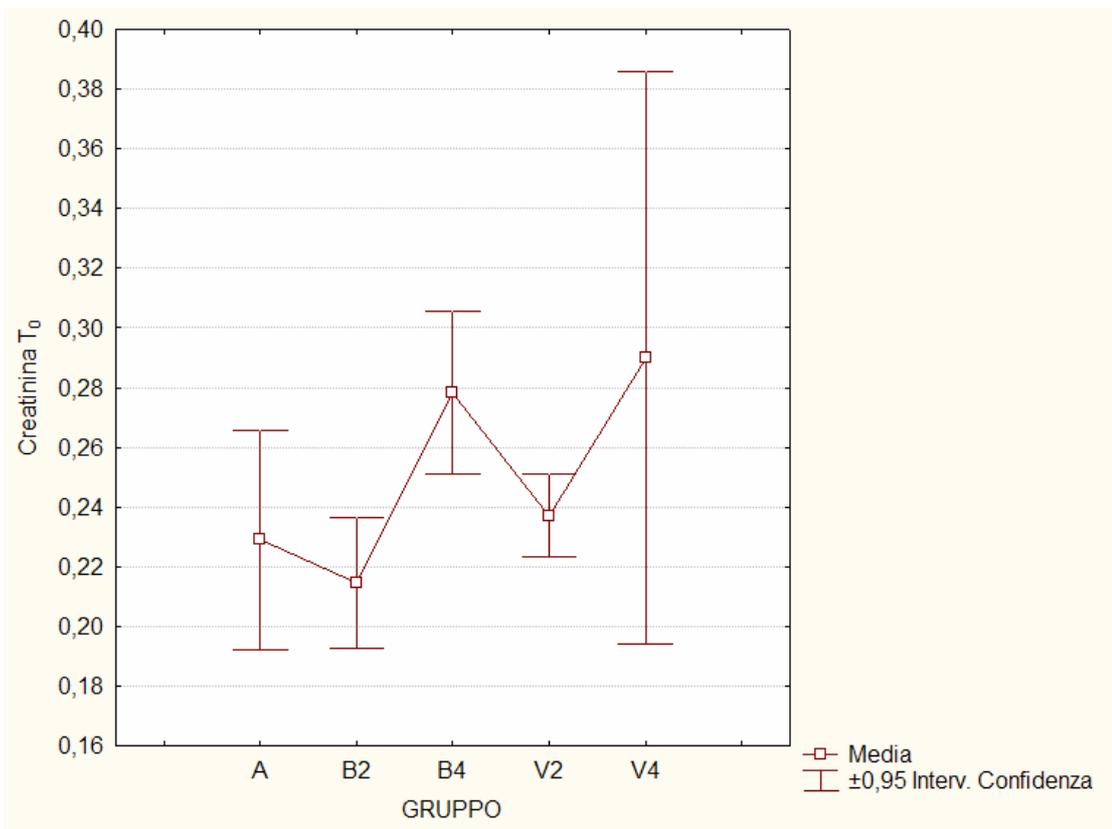


Fig. 5.4- Andamento dei livelli di AST (U/l) al giorno 0 (T<sub>0</sub>) e al giorno 15 (T<sub>1</sub>) post-trattamento.



**Fig. 5.5-** Andamento dei livelli di creatinina (mg/dl) al giorno 0 (T<sub>0</sub>) e al giorno 15 (T<sub>1</sub>) post-trattamento.

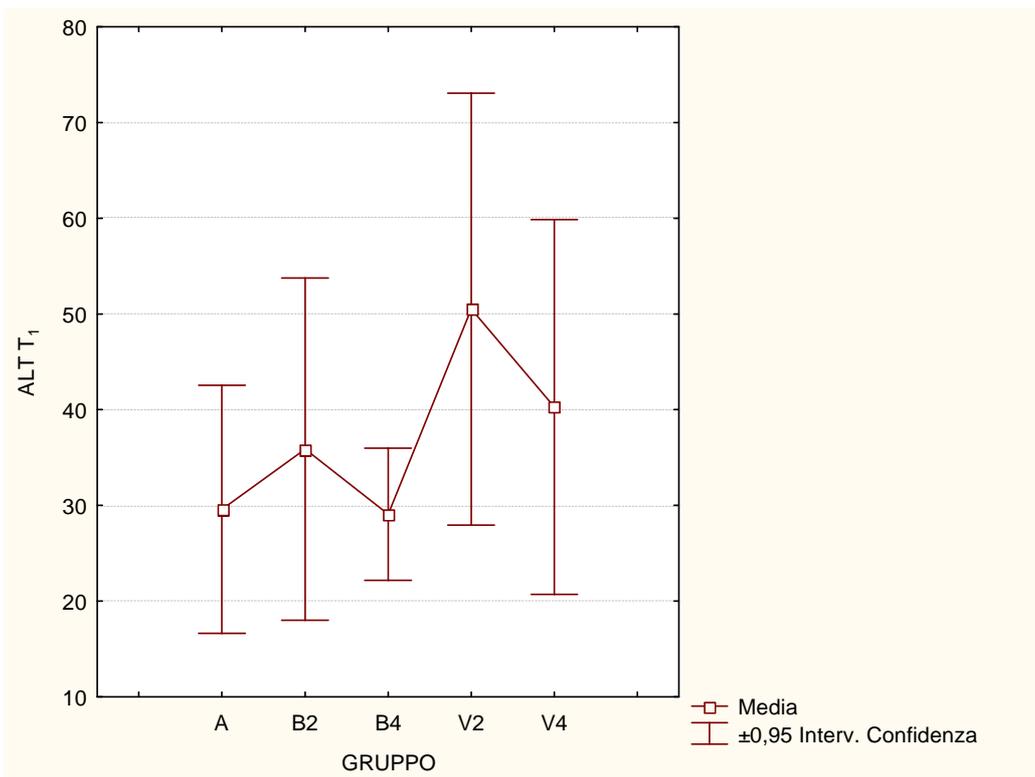
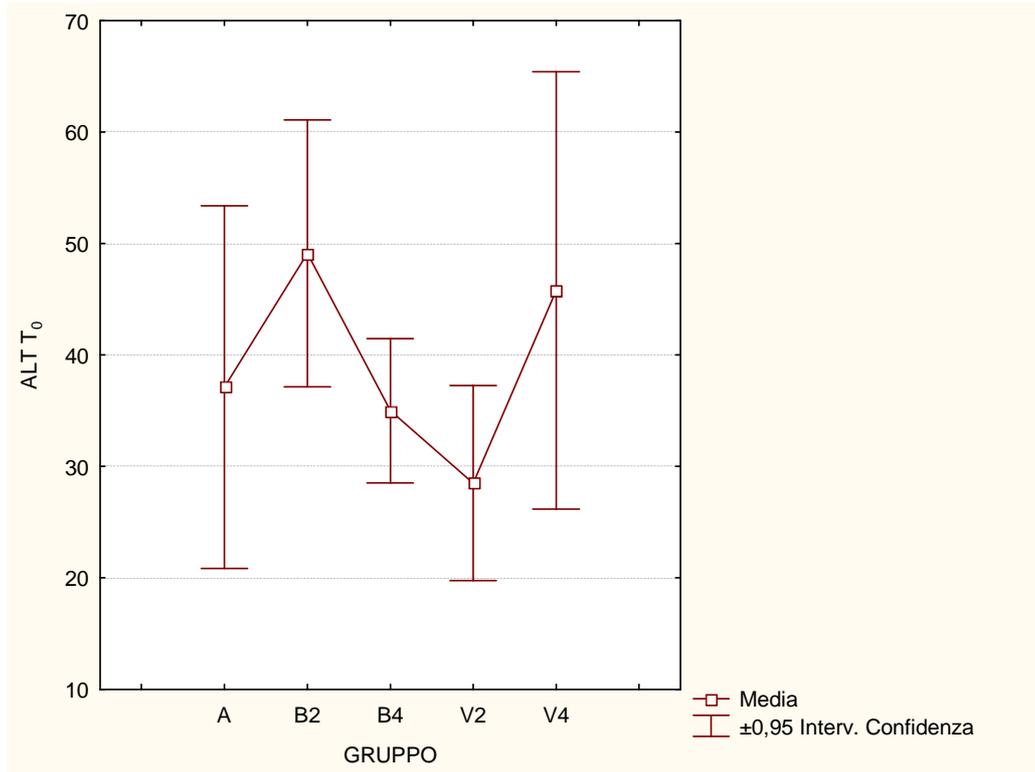


Fig. 5.6- Andamento dei livelli di ALT (U/l) al giorno 0 (T<sub>0</sub>) e al giorno 15 (T<sub>1</sub>) post-trattamento.

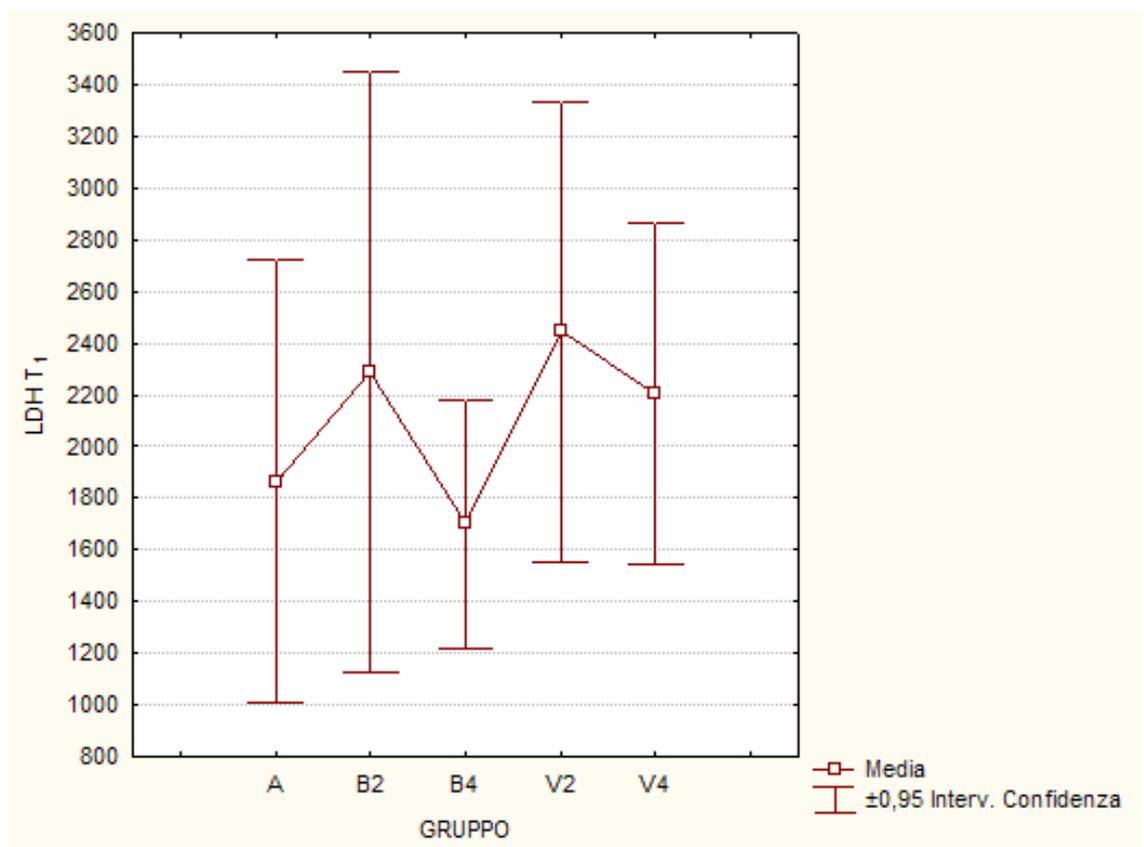
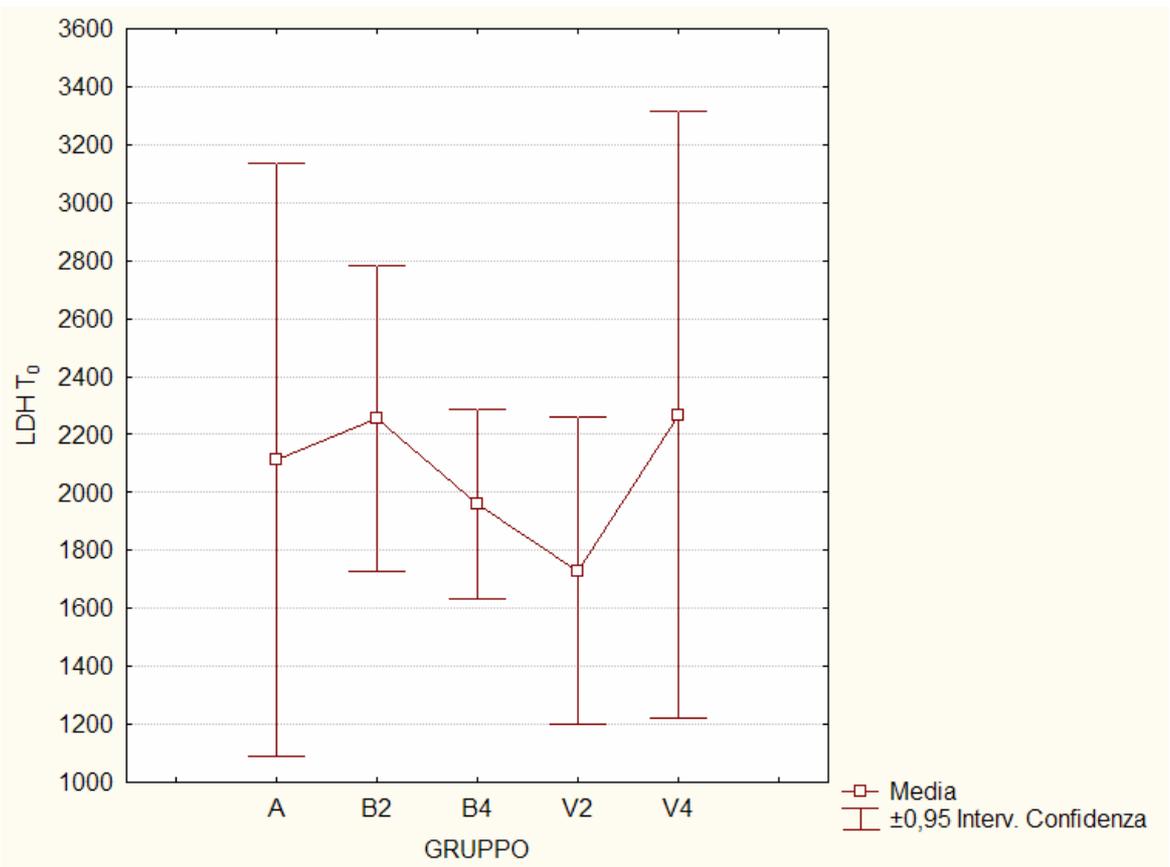


Fig. 5.7- Andamento dei livelli di LDH (IU/l) al giorno 0 (T<sub>0</sub>) e al giorno 15 (T<sub>1</sub>) post-trattamento.

In tabella 5.3 e figura 5.8 sono riportate le **concentrazioni plasmatiche di Fe e Pb** suddivise in funzione del trattamento e del tempo, considerando il valore medio di gruppo  $\pm$  l'errore standard ed i valori di massimo e minimo del campione.

Il primo prelievo eseguito ha rivelato la presenza di un tasso ematico di **piombo** “basale” che inizialmente sembrava difficile da spiegare. Un’indagine più approfondita relativa all’ambiente di origine degli animali ha evidenziato come l’allevamento fosse posto nelle vicinanze della rete ferroviaria e di importanti collegamenti stradali e quindi ha permesso di imputare alla “contaminazione” in allevamento i livelli mediamente elevati di Pb ematico. Tutti gli animali al primo controllo sono risultati positivi al piombo con valori variabili tra 349 e 381 ppb. In letteratura vengono considerati normali nelle anatre valori compresi tra 50 e 390 ppb, quindi i valori riscontrati sono comunque da considerare “normali”, seppur alti (Ritchie et al, 1994).

Al successivo campionamento, i gruppi A, B2 e B4 presentavano un leggero incremento del tasso ematico del piombo. La stabulazione libera degli animali, con punti d’acqua comuni ha probabilmente portato ad una contaminazione tra i soggetti trattati con piombo, che lo eliminano tramite le feci, e quelli non trattati.

Il terzo campionamento mostra come il piombo ematico in questi gruppi non abbia subito un rialzo elevato come il precedente; il numero di animali eliminatori, infatti, si era estremamente ridotto data la soppressione di tutti gli animali del gruppo V4.

I dati del terzo campionamento riferiti ai gruppi trattati con piombo, risultano particolarmente interessanti: il gruppo V2 mostra infatti una concentrazione ematica di piombo estremamente maggiore rispetto al V4; questo può far pensare che il raggiungimento del picco ematico nel gruppo V4 fosse avvenuto la settimana antecedente al prelievo e che il piombo fosse già in fase di distribuzione a livello tissutale come dimostrano i dati tossicologici tissutali.

Allo stesso modo la concentrazione ematica del piombo del gruppo V2 al terzo campionamento è inferiore rispetto a quello precedente.

Al primo prelievo la concentrazione ematica di **ferro** (tab. 5.3, fig. 5.7) nei vari gruppi evidenzia come i tassi siano sovrapponibili tra loro e compresi tra 226 e 256  $\mu\text{g/ml}$ , per ciò possiamo definire omogeneo il gruppo di partenza riguardo al ferro. Le concentrazioni medie di ferro ematico non subiscono particolari variazioni nel tempo in tutti i gruppi tranne con nel V4, per il quale si rileva un dimezzamento dei livelli. Questo è in accordo con il quadro di forte anemia riscontrato in tutti i soggetti.

Gruppo	Fe ( $\mu\text{g/ml}$ ) media $\pm$ e.s. min-max			
	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub> <sup>A</sup>	P <sub>2</sub> <sup>B</sup>	P <sub>3</sub>

<b>A</b>	256.24 ± 17.75 176.76-317.55	408.48 ± 24.78 305.77-541.32	321.23 ± 47.15 72.30-519.47	373.12 ± 29.94 207.37-541.32
<b>B2</b>	238.52 ± 24.83 145.39-402.64	453.96 ± 30.92 345.08-622.78	300.65 ± 55.25 36.52-497.15	351.64 ± 24.03 239.83-459.27
<b>B4</b>	249.36 ± 16.46 138.92-305.34	359.46 ± 47.88 >LOD-529.16	331.94 ± 56.95 64.77-547.33	346.83 ± 91.70 183.29-479.21
<b>V2</b>	226.23 ± 12.54 180.23-302.86	265.44 ± 39.99 96.98-415.40	233.99 ± 61.63 172.36-295.63	/
<b>V4</b>	230.41 ± 20.47 156.67-289.73	111.44 ± 18.64 40.87-210.14	/	/
<b>Gruppo</b>	<b>Pb (ng/ml)</b> <b>media ± e.s.</b> <b>min-max</b>			
	<b>P<sub>0</sub></b>	<b>P<sub>1</sub></b>	<b>P<sub>2</sub></b>	<b>P<sub>3</sub></b>
<b>A</b>	381.57 ± 76.28 86.95-740.99	551.89 ± 63.30 343.94-961.39	552.48 ± 88.22 230.17-990.03	446.46 ± 72.62 176.92-850.32
<b>B2</b>	365.31 ± 55.19 31.51-694.58	439.91 ± 74.41 171.47-839.39	527.58 ± 51.67 377.37-799.88	459.87 ± 22.10 346.75-539.74
<b>B4</b>	349.71 ± 72.09 <LOD-760.08	684.14 ± 77.14 124.75-964.31	500.93 ± 66.09 193.83-789.79	421.82 ± 48.54 156.72-734.61
<b>V2</b>	334.54 ± 54.17 98.35-523.41	6749.29 ± 964.99 2446.65-10575.23	4328.56 ± 1552.76 2775.80-5881.31	/
<b>V4</b>	391.04 ± 178.81 <LOD-925.85	2830.98 ± 659.14 548.67-6620.50	/	/

A: i prelievi relativi ad alcuni soggetti del gruppo V4 (4) sono stati effettuati prima della scadenza dei 15 giorni.

B: i prelievi relativi ad alcuni soggetti dei gruppi V2 (6) e V4 (6) sono stati effettuati prima della scadenza dei 30 giorni.

Tab. 5.3- **Concentrazioni di ferro e piombo rilevate nel plasma di germano reale, suddivise in funzione del trattamento e del tempo.**

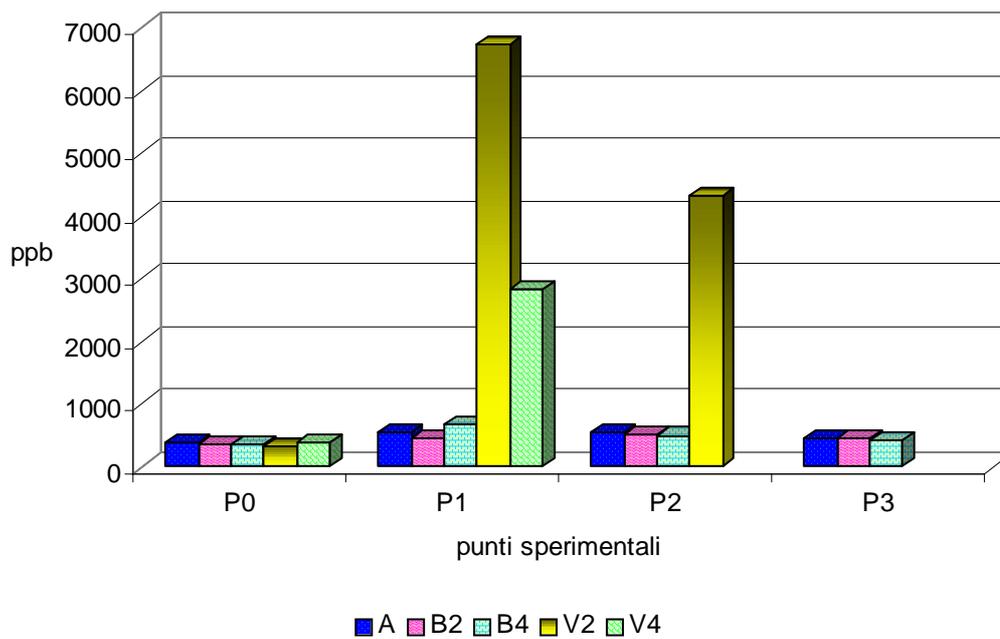
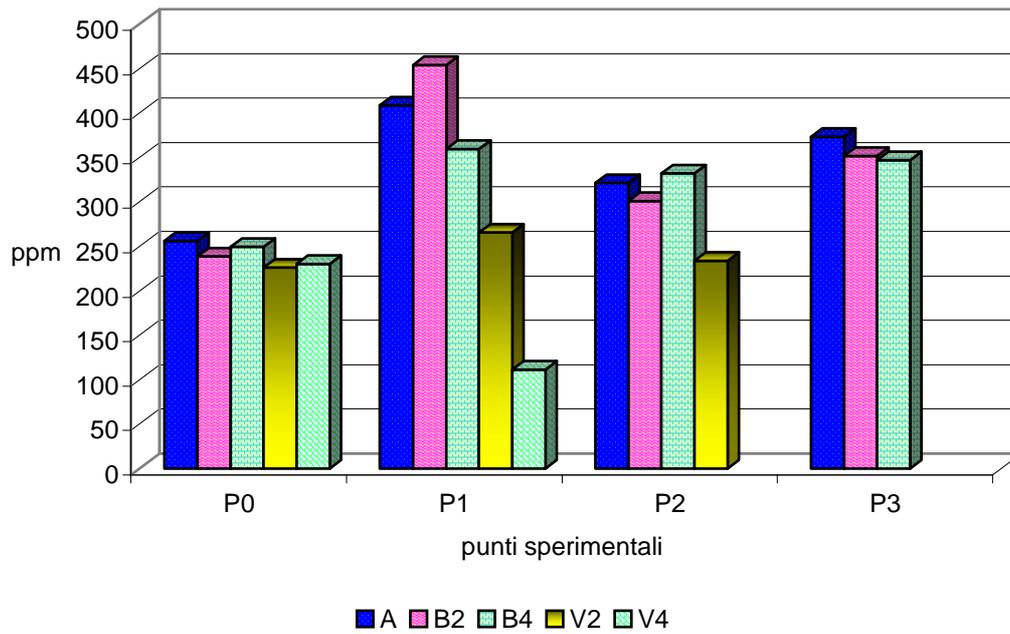


Fig. 5.8– Livelli ematici di ferro (a) e piombo (b) nei soggetti utilizzati, suddivisi in funzione dei punti sperimentali.

Dai dati tossicologici tissutali è evidente come nei gruppi trattati con piombo (V2, V4) ci sia una maggior concentrazione di **ferro** a livello epatico e muscolare (tab. 5.4; fig. 5.9-5.10). Questo dato va interpretato come conseguenza dell'interferenza del piombo con l'eme sintetasi che comporta un minor utilizzo di Fe per la sintesi di emoglobina e un suo accumulo a livello epatico. In considerazione dello stato fortemente anemico di questi soggetti, l'incremento delle concentrazioni di ferro a livello di fegato non deve quindi stupire. Dei due gruppi trattati con piombo il gruppo V2 è quello che presenta in tutti gli organi e tessuti considerati le maggiori concentrazioni di metallo. Una possibile spiegazione di questa differenza, apparentemente strana, è il fatto che gli animali del gruppo V4 sono stati soppressi prima di quelli del gruppo V2 (sopravvivenza media:  $11.6 \pm 0.95$  giorni vs.  $19.9 \pm 2.30$  giorni) e questo può aver determinato un minor accumulo di ferro a livello organico e tissutale.

Scarsi sono i lavori reperibili in letteratura che riferiscono delle variazioni nei livelli di ferro in funzione di una somministrazione di pallini di piombo o di altro materiale. In questi studi si rileva un incremento del metallo a seguito di ingestione di piombo, in particolare a livello epatico (Kelly et al., (1998)). Al contrario, ed in analogia con quanto rilevato nel presente studio, la somministrazione di pallini in materiali diversi (acciaio ferroso, leghe tungsteno-ferro e tungsteno polimero) non comporta un incremento delle concentrazioni ematiche e tissutali di ferro (Kelly et al., 1998; Mitchell et al. 2001).

I tassi epatici di **piombo** considerati tossici, in letteratura, sono di 12-36 ppm. Nei nostri animali si sono raggiunti tassi epatici di 186.77 ppm (tab. 5.4; fig. 5.9-5.11; 5.13) e non stupisce quindi la comparsa di una grave sintomatologia da saturnismo in tutti i soggetti dei gruppi V2 e V4.

Il tipo di alimentazione, come già accennato in precedenza, può aver influito notevolmente sulla quantità di erosione del pallino ed il conseguente passaggio in circolo del piombo liberato. I livelli medi più elevati di piombo si sono raggiunti a livello renale, dove il metallo ha causato necrosi tubulare. Non è al momento noto quale sia il meccanismo esatto di questa tossicità, ma si ritiene che possa essere dovuta o a un'azione diretta del metallo sulle cellule tubulari, o ad un rilascio di elevati quantitativi di emoglobina durante le fasi emolitiche, o ad una combinazione dei due meccanismi (Alden e Frith, 1991; Kelly et al., 1998). I livelli minori di piombo, come prevedibile considerando la cinetica del metallo, sono stati invece rilevati nel muscolo. Il gruppo V4 presentava in tutti gli organi e tessuti considerati le massime concentrazioni, in accordo con il fatto che sono gli animali dosati con i livelli massimi di piombo.

Una vera e propria comparazione con i dati reperibili in letteratura non è possibile, in quanto sia Kelly et al., (1998) che Mitchell et al. (2001) somministrano ai germani reali livelli di piombo pari a 2 volte il dosaggio massimo utilizzato nel presente lavoro. In ogni caso è possibile affermare come vi sia una buona sovrapposizione non solo del quadro sintomatologico comparso, ma anche del trend di concentrazione tessutale. In tutti gli studi infatti a seguito di somministrazione di pallini di piombo si osserva un incremento statisticamente significativo nelle concentrazioni tessutali di metallo, ad indicare un suo forte assorbimento ed una sua notevole redistribuzione, nell'arco di pochi giorni.

Lo **zinco** mostra incrementi statisticamente significativi sia a livello epatico che muscolare, sempre nei soli gruppi trattati con piombo (tab. 5.4; fig. 5.9-5.11; 5.14).

Lumeij (1985) e Pain (1989) attribuiscono questo incremento alla notevole presenza di protoporfirina libera, conseguenza dell'azione del piombo sulla sintesi dell'emoglobina, la quale sarebbe in grado di legare altri metalli quali lo zinco, comportandone poi un accumulo a livello epatico.

Di difficile interpretazione è invece il dato relativo al tessuto muscolare. Una possibile spiegazione dei livelli statisticamente maggiori di metallo in questa sede potrebbe essere un suo accumulo sotto forma di Zn-tioneine, che, anche in ragione della forte atrofia muscolare comparsa in tutti i soggetti, potrebbero essersi concentrate maggiormente. Va infatti ricordato che il muscolo campionato era il pettorale, che mostrava non solo in sede autoptica, ma anche al semplice esame visivo degli animali, un grave stato di atrofia. Non esistono però al momento dati che riportino di un preciso meccanismo responsabile di questo accumulo. Maitani et al. (1986) riferiscono di una capacità del piombo di indurre la sintesi di metallotioneine dopo somministrazione di Pb-acetato per varie vie in topi, sebbene non ritrovino a livello epatico Pb-tioneine. Se questo meccanismo di induzione si verificasse anche nel germano reale, l'aumento di metallotioneine potrebbe comportare una maggior formazione di Zn-tioneine, che potrebbero effettivamente accumulare non solo nel muscolo, ma anche, come d'altronde osservato, nel fegato.

Le considerazioni fatte per lo zinco paiono confermate anche per il rame, in quanto sebbene differenze statisticamente significative si rilevino unicamente nel muscolo (tab. 5.4; fig. 5.9-5.11; 5.15), anche nel fegato e nel rene si osservano incrementi delle concentrazioni di metallo, che per il rene sono al limite della significatività ( $p=0.0705$ ). Anche in questo caso non sono al momento disponibili informazioni relative alle variazioni del metallo in seguito a somministrazione di piombo e quindi ogni considerazione possibile rimane a livello speculativo.

Gruppo	Giorni di sopravvivenza media ± e.s. min-max	Fegato media ± e.s. min-max			
		Cu (µg/g)	Fe (µg/g)	Pb (ng/g)	Zn (µg/g)
A	45	583.88 ± 55.94 527.94-639.82	2628 ± 318.16 2341-2946	1.7571 ± 0.30880 1448.4-2065.9	164.56 ± 17.424 147.13-181.98
B2	45	393.68 ± 92.84 215.99-749.96	1659 ± 284.09 983.91-2628	1.9588 ± 0.54628 1115.6-4085.8	186.02 ± 35.98 116.52-315.79
B4	45	459.18 ± 128.80 209.71-832.86	2415 ± 339.58 1534-3543	1.8006 ± 0.22401 1234.4-2593.9	140.15 ± 8.62 112.08-165.29
V2	19.9 ± 2.30 13-27	624.67 ± 138.07 188.29-1281	8917 ± 1872 1645-21310	130808 ± 18432 31959-2229305	271.81 ± 40.98 122.51-515.33
V4	11.6 ± 0.95 5-13	601.17 ± 157.09 90.52-1642	8076 ± 814.12 4983-12400	186776 ± 23087 81568-316629	239.40 ± 26.70 144.28-438.50
<b>Renale</b>					
Gruppo	Giorni di sopravvivenza media ± e.s. min-max	Rene media ± e.s. min-max			
		Cu (µg/g)	Fe (µg/g)	Pb (ng/g)	Zn (µg/g)
A	45	24.272 ± 0.884 23.39-25.16	623.91 ± 164.79 459.13-788.70	1285.9 ± 233.3 1052.6-1519.2	97.25 ± 6.78 90.74-104.03
B2	45	19.11 ± 2.09 13.71-25.83	687.13 ± 109.81 533.26-1119	2447.9 ± 0.97 1253.3-6292.6	87.17 ± 4.08 72.93-97.95
B4	45	20.83 ± 8.09 < LOD-46.63	469.02 ± 69.12 342.86- 722.61	2214.7 ± 456.12 655.29-3181.8	121.57 ± 56.71 4.55-336.76
V2	19.9 ± 2.30 13-27	45.51 ± 7.83 14.56-91.42	564.55 ± 56.32 319.84-890.95	210661 ± 24938 53873-304141	121.62 ± 12.16 72.66-197.65
V4	11.6 ± 0.95 5-13	31.17 ± 2.19 19.42-41.23	441.50 ± 53.84 226.80-724.97	357405 ± 69334 112695-814712	109.60 ± 6.92 83.18-140.65
<b>Muscolare</b>					
Gruppo	Giorni di sopravvivenza media ± e.s. min-max	Muscolo media ± e.s. min-max			
		Cu (µg/g)	Fe (µg/g)	Pb (ng/g)	Zn (µg/g)
A	45	17.22 ± 1.19 16.04-18.41	232.14 ± 20.25 211.88-252.39	813.89 ± 183.18 630.71-997.06	39.79 ± 1.10 39.02-40.57
B2	45	16.08 ± 1.81 12.69-22.69	205.79 ± 6.41 186.63-226.95	869.57 ± 101.71 558.87-1088.6	37.07 ± 2.14 31.54-44.70
B4	45	17.09 ± 1.11 14.99-20.61	213.23 ± 9.57 182.10-242.11	973.88 ± 54.45 822.60-1114.4	42.05 ± 1.45 38.41-45.01
V2	19.9 ± 2.30 13-27	31.52 ± 7.03 12.57-88.10	346.90 ± 90.08 145.34-1028	3124 ± 364.11 1644.5-5251.5	98.74 ± 27.87 32.53-286.78
V4	11.6 ± 0.95 5-13	30.75 ± 3.83 17.11-48.47	267.62 ± 32.88 146.27-422.80	3597.9 ± 397.13 2624.1-5993.1	50.79 ± 3.61 37.32-66.70

Tab. 5.4- Concentrazioni di metalli rilevate nei tessuti epatico, renale e muscolare (peso secco) di germano reale suddivise in funzione del trattamento.

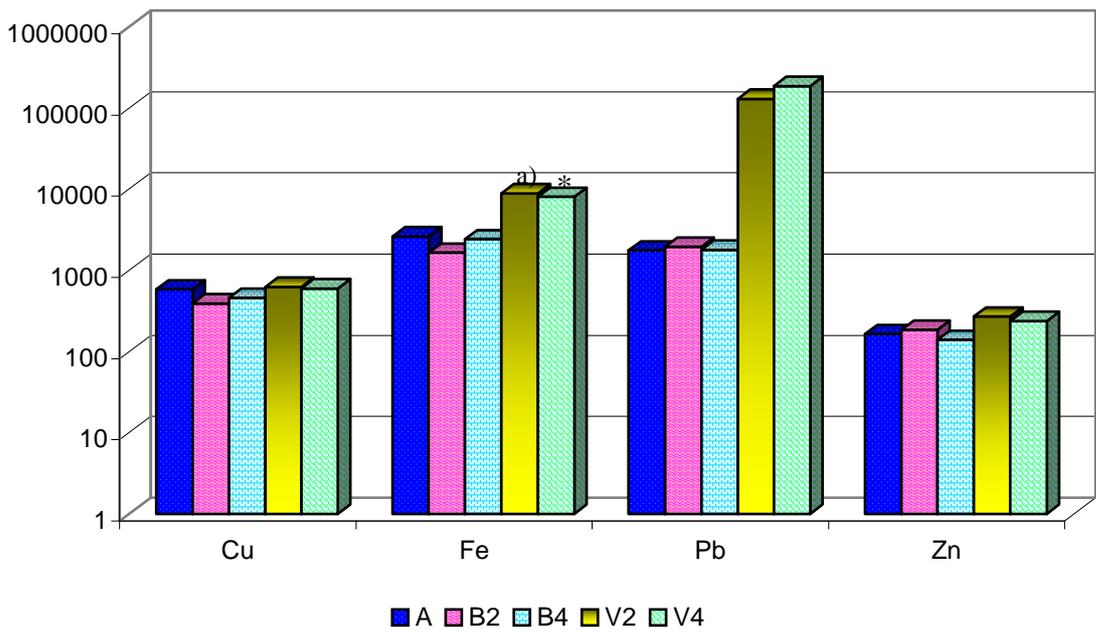


Fig. 5.9- Grafico semi logaritmico delle concentrazioni di metalli a livello epatico. Per Cu, Fe e Zn le unità di misura sono µg/g, per il Pb sono ng/g.

\*: p<0.05; \*\*: p< 0.01.

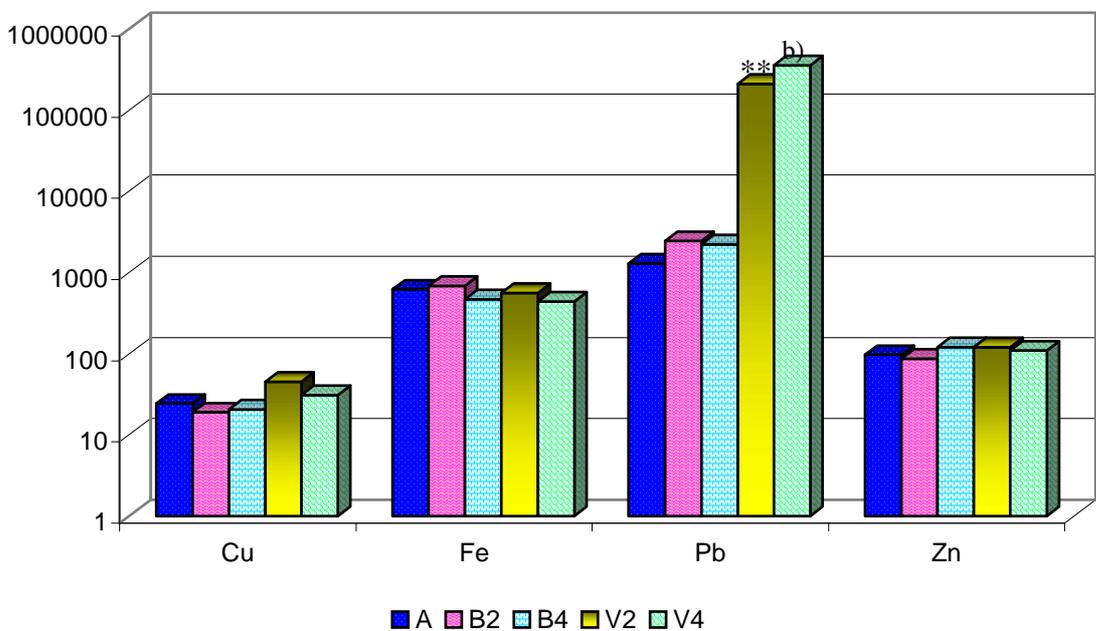


Fig. 5.10- Grafico semi logaritmico delle concentrazioni di metalli a livello renale. Per Cu, Fe e Zn le unità di misura sono µg/g, per il Pb sono ng/g.

\*: p<0.05; \*\*: p< 0.01.

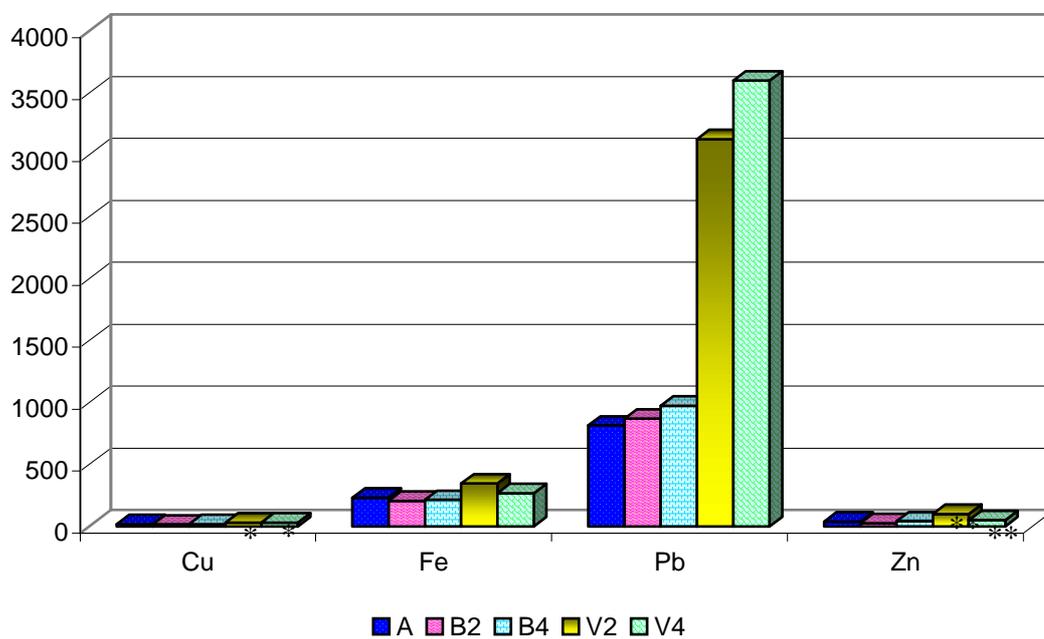


Fig. 5.11- Grafico semi logaritmico delle concentrazioni di metalli a livello muscolare. Per Cu, Fe e Zn le unità di misura sono  $\mu\text{g/g}$ , per il Pb sono  $\text{ng/g}$ . \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ .

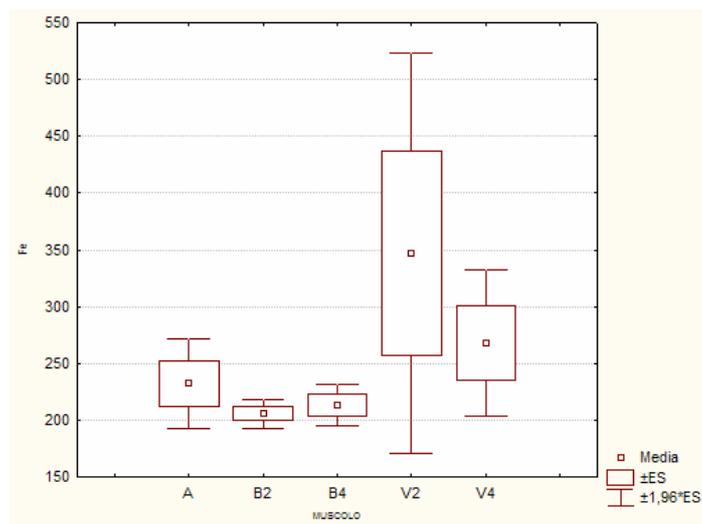
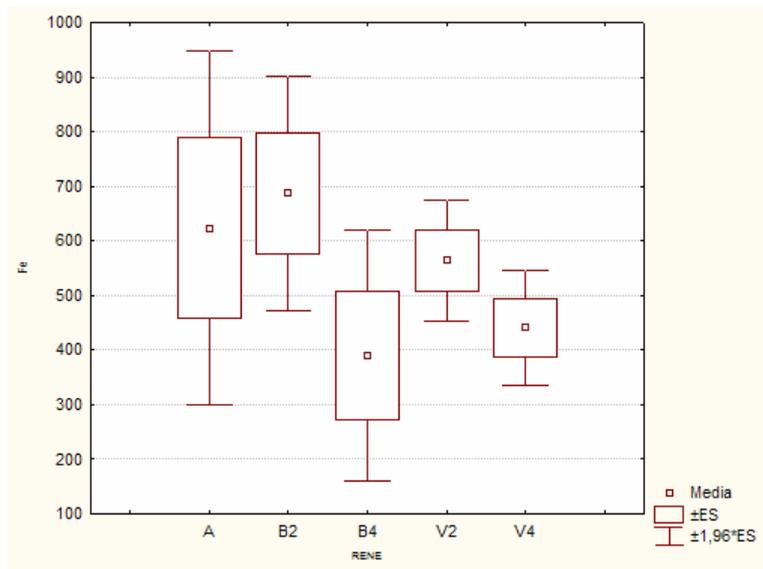
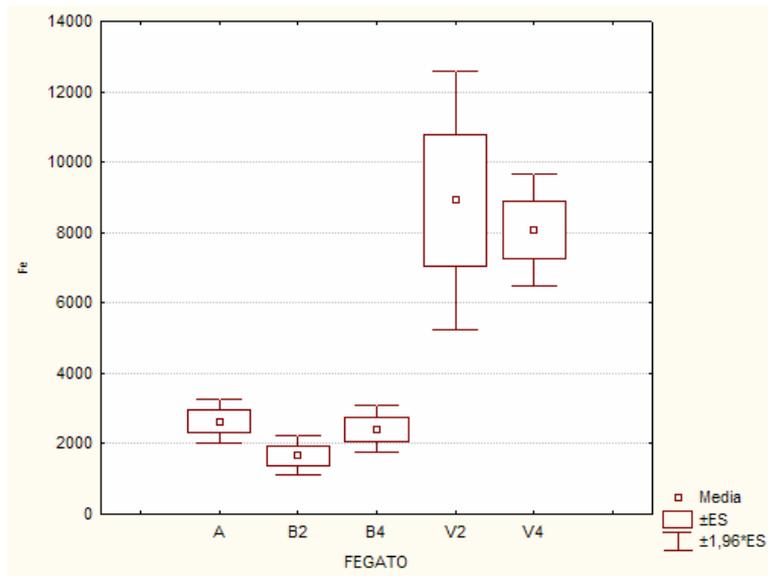


Fig. 5.12- Andamento di livelli di Fe nelle tre matrici considerate.

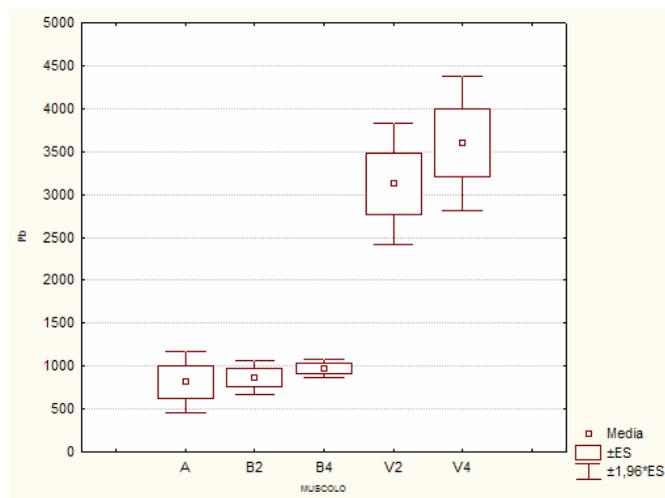
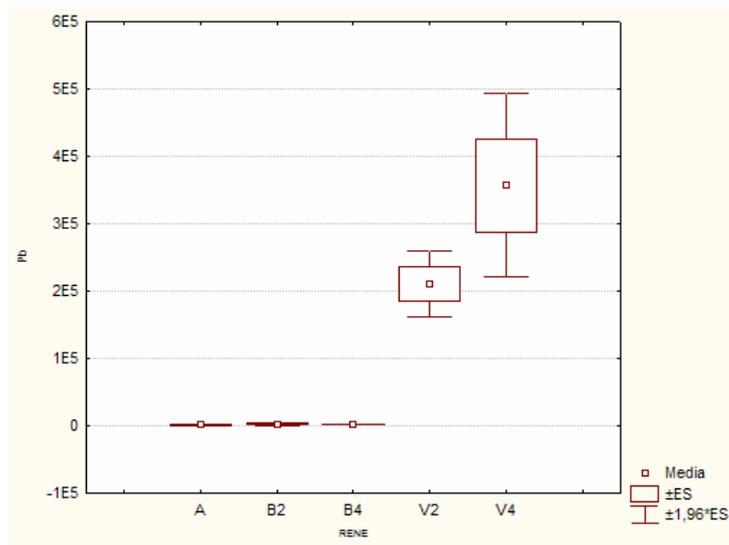
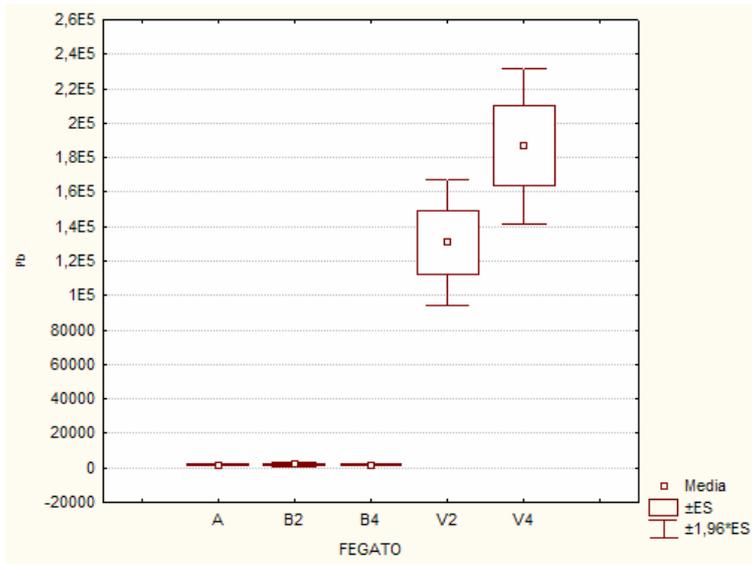
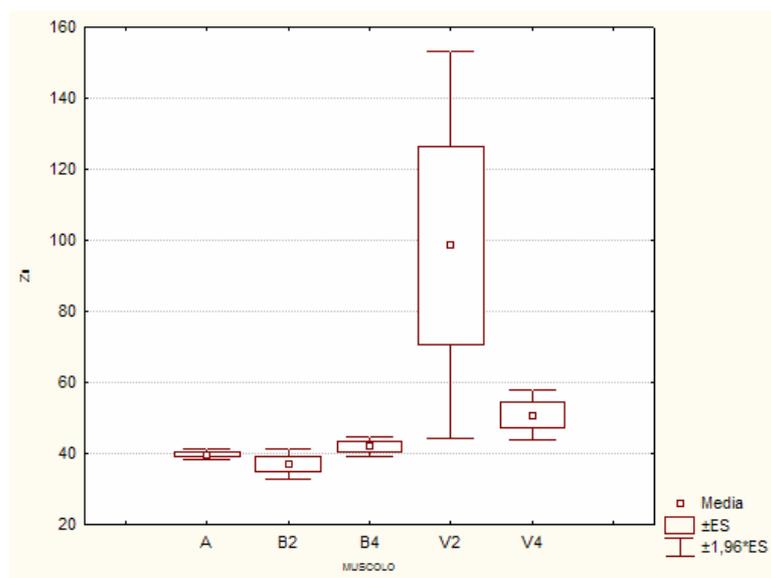
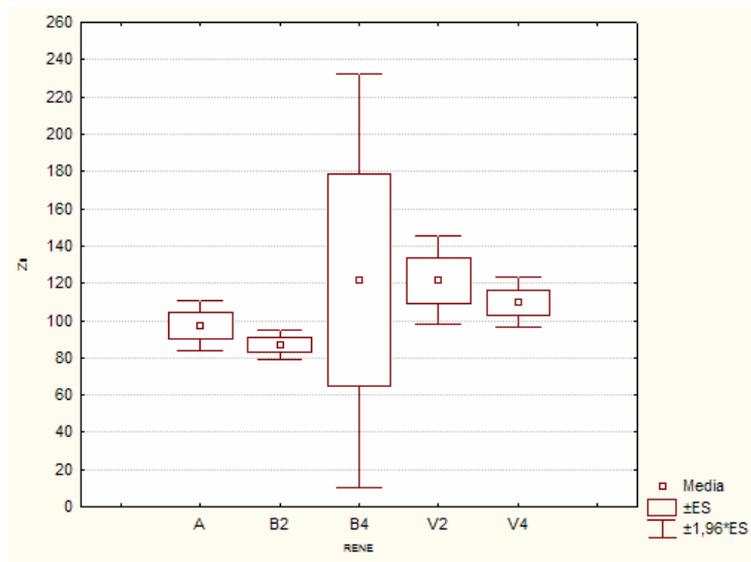
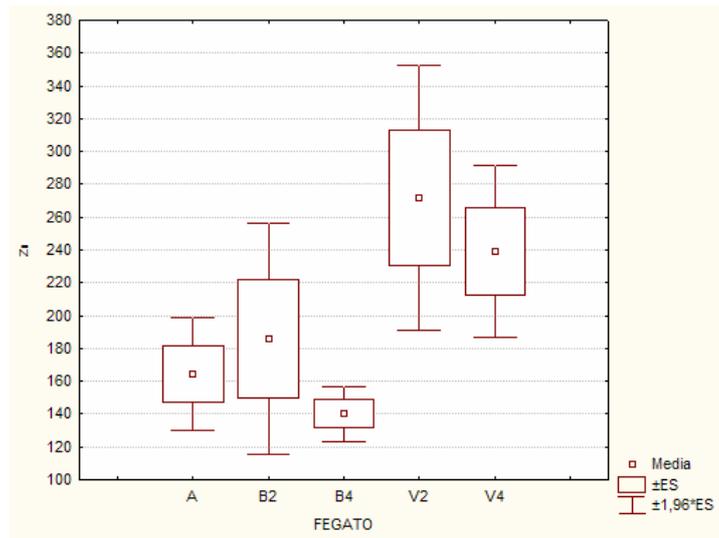


Fig. 5.13- Andamento di livelli di Pb nelle tre matrici considerate.



**Fig. 5.14-** Andamento di livelli di Zn nelle tre matrici considerate.

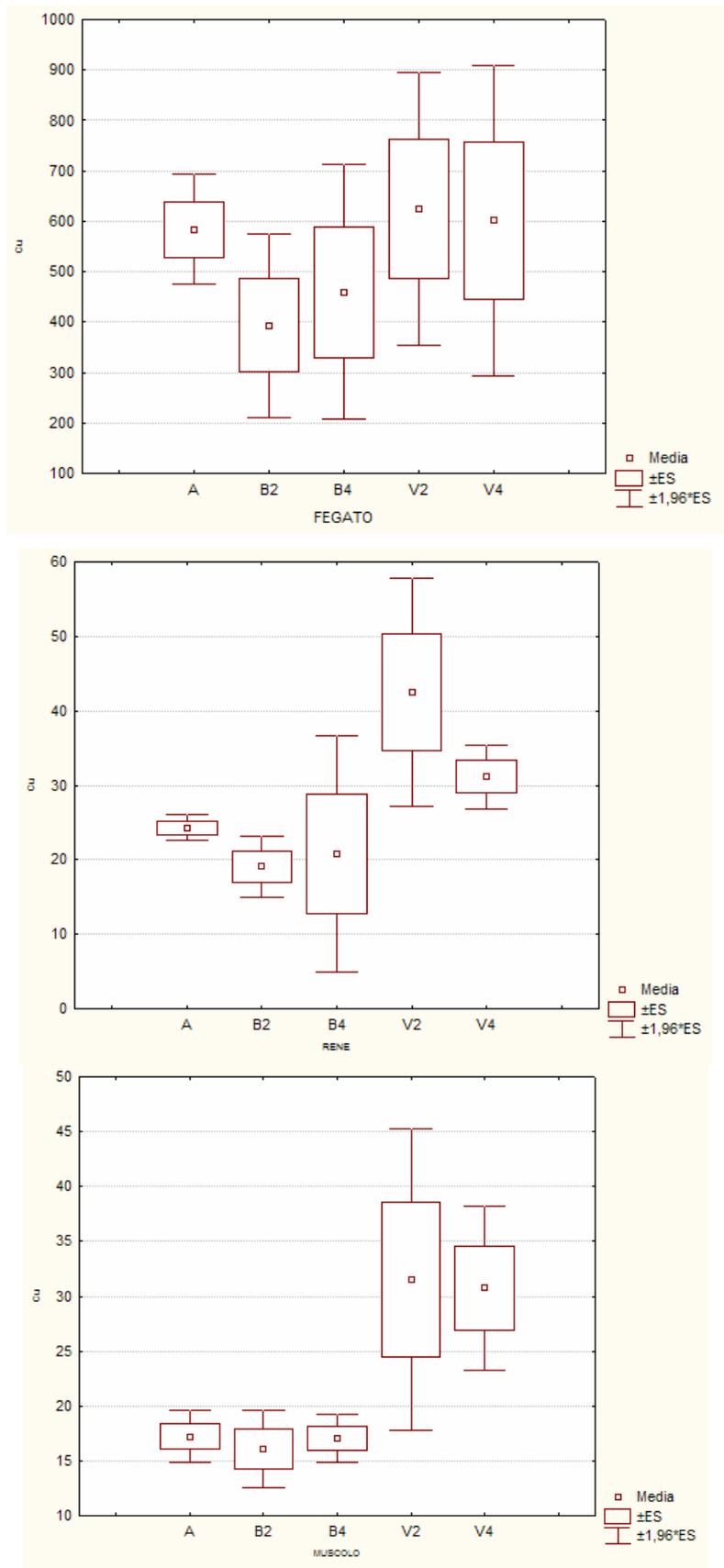


Fig. 5.15- Andamento di livelli di Cu nelle tre matrici considerate.

A partire dal 15° giorno di trattamento i fegati di molti soggetti del gruppo V2 e V4 cominciavano ad evidenziare segni di sofferenza quali dissociazione delle lamine epatiche, moderata riduzione di volume degli epatociti e modesti infiltrati linfocitari. Al momento della sospensione dell'esperimento le lesioni mostravano una maggior gravità. Infatti comparivano aree di necrosi focale, gli infiltrati infiammatori erano più evidenti e in qualche caso si osservava una diffusa steatosi. Di rilievo erano anche gli episodi di colostasi sia intracellulare che extra (foto. 5.3, 5.4 e 5.5).

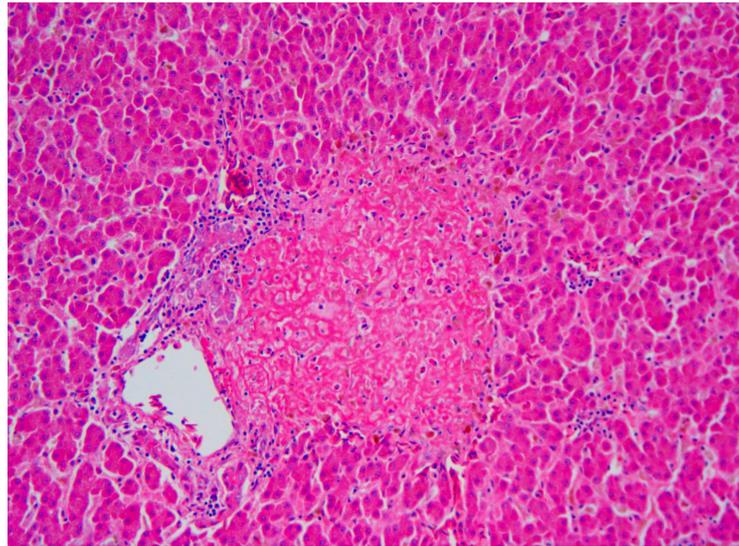


Foto 5.3- Fegato al 15° giorno di trattamento. Area di necrosi con infiltrato linfocitario nello spazio portobiliare. E & E, ob. 20x.

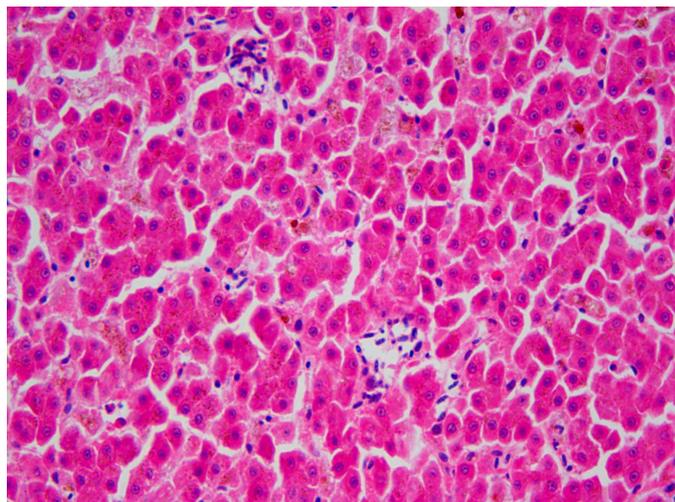


Foto 5.4- Fegato al 15° giorno di trattamento. È ben evidente la colostasi sia intra- che extra-cellulare. E & E ob. 40x.

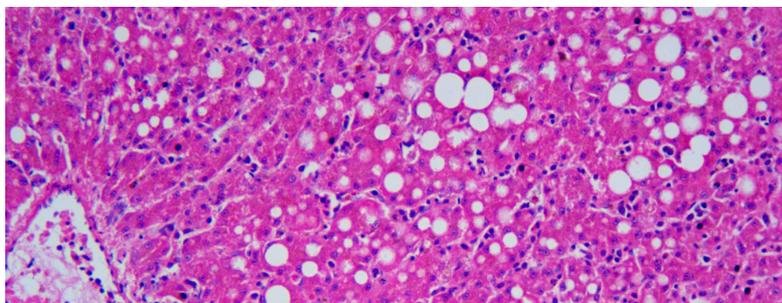


Foto 5.5- Fegato al 15° giorno di trattamento. Steatosi prevalentemente perilobulare. E & E ob. 40x.

Anche i reni nella fase finale della prova mostravano segni di sofferenza, quali lesioni prevalentemente a carico dei tubuli prossimali e comparivano più o meno numerosi cilindri ialini (foto. 5.5 e 5.6).

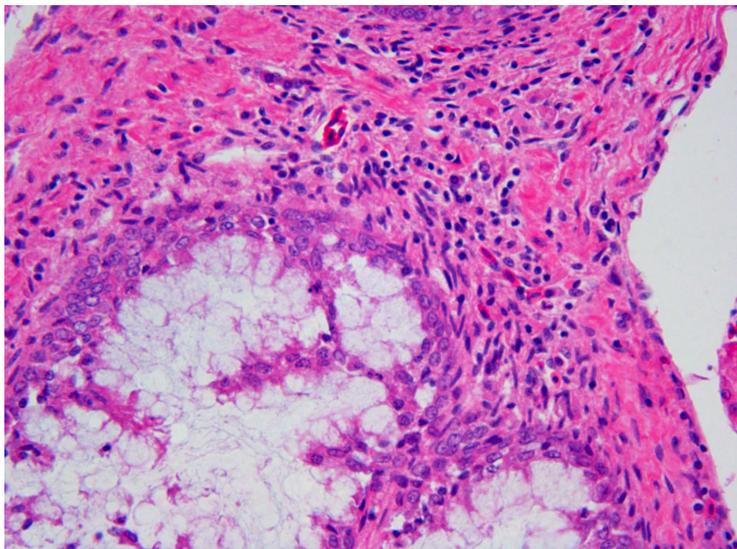
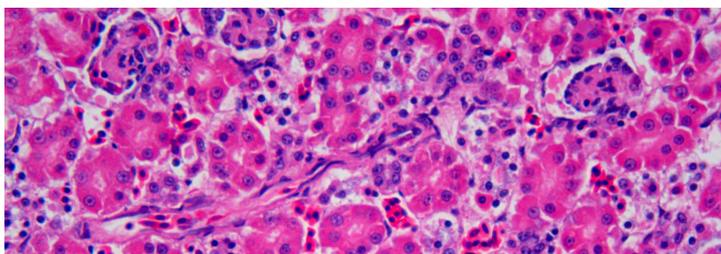


Foto 5.6- Rene al 15° giorno di trattamento. Modesto infiltrato linfocitario nella zona dei tubuli collettori. E & E ob. 20x.

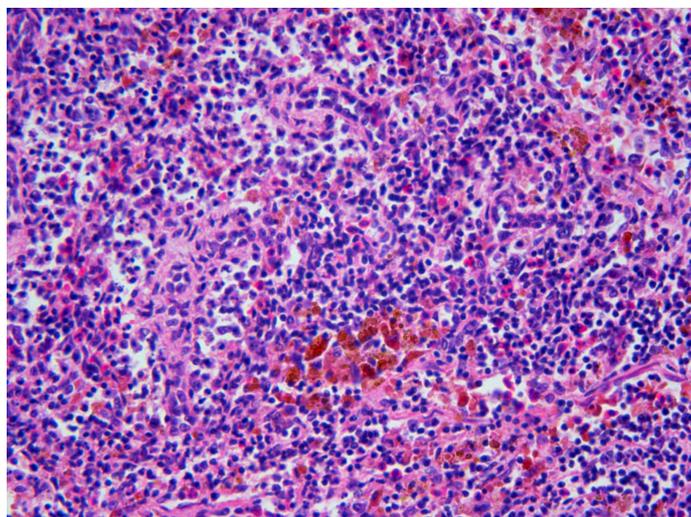


**Foto 5.7- Rene al 15° giorno di trattamento. Alcuni tubuli distali mostrano un certo grado di degenerazione vacuolare e goccioline ialine nello spazio di Bowman. E & E ob. 40x.**

In qualche caso si osservavano colonie di miceti, probabilmente aspergilli.

In alcuni soggetti erano presenti infiltrati flogistici rotundocellulari fra le cellule dei tubuli collettori.

La milza di diversi animali mostrava emosiderosi e un'organizzazione follicolare non costante. Il dato relativo all'emosiderosi conferma anche a livello istopatologico la forte emocateresi indotta dal piombo, che si manifesta poi a livello tossicologico con un notevole incremento dei livelli di ferro a livello epatico (foto. 5.8).

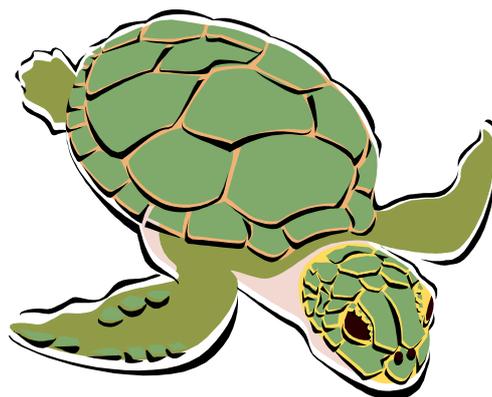


**Foto 5.8- Milza al 15° giorno di trattamento. Si noti l'imponente emosiderosi. E & E ob. 40x.**

Data la brevità del periodo di trattamento non si sono potute osservare le lesioni che caratterizzano senza possibilità di errore gli episodi di saturnismo cronico. In particolare non sono stati evidenziati i corpi inclusi da piombo.

Purtuttavia, segni di sofferenza e varie lesioni sono stati osservati a carico sia del fegato che del rene.

**6.STUDIO DEI METALLI PESANTI E METALLAOIDI  
IN ESEMPLARI DI *Caretta caretta***



## **6.1.CENNI DI BIOLOGIA DELLE TARTARUGHE MARINE**

Le tartarughe marine erano presenti già 130 milioni di anni fa anche se i primi fossili di questi rettili risalgono ad almeno 200 milioni di anni fa. I generi e le specie attuali hanno subito poche variazioni mantenendo quasi del tutto le caratteristiche di quelle presenti 60-100 milioni di anni fa.

Le tartarughe marine fanno parte della classe dei **RETTILI** che si ritengono essere i primi vertebrati veramente adattati alla vita sulla terraferma (Affronte M., Bortolotto A., 1999).

I rettili vengono classificati, in base alla presenza o meno di “arcate” o apsi di cioè aperture nella regione temporale del cranio, in quattro sottoclassi: **ANAPSIDI** (privi di apsi di); **SINAPSIDI** (una finestra temporale); **PARAPSIDI** (sempre una sola apside ma posizionata più in alto rispetto a quella di sinapsidi) ed infine i **DIAPSIDI** (due arcate distinte) ( Affronte M., Bortolotto A., 1999).

Le tartarughe appartengono alla prima sottoclasse (Anapsidi), mentre gli altri rettili appartengono alla sottoclasse dei Diapsidi dalla quale originano anche gli uccelli mentre i mammiferi originerebbero dalla sottoclasse dei Sinapsidi.

L'ordine cui appartengono le tartarughe marine è quello dei **CHELONI** o **TESTUDINATI** (Capanna E., Ghirardelli E., 1988).

A quest'ordine appartengono, in realtà, sia le tartarughe che vivono in mare che le testuggini che vivono sulla terraferma o in acqua dolce. Affronte M., Bortolotto A., 1999).

Le famiglie di tartarughe marine oggi viventi sono due: **Chelonidae** e **Dermochelidae**. Le **Chelonidae** sono suddivise in 5 generi (*Chelonia*, *Natator*, *Eretmochelys*, *Caretta* e *Lepidochelys*) e sei specie: *Caretta caretta* (Linneo, 1758), *Eretmochelys imbricata* (Linneo, 1766), *Lepidochelys ulivacea* (Eschscholz, 1829) *Lepidochelys kempii* (Garman, 1880) *Chelonia mydas* (Linneo, 1758) *Natator depressus* (Garman, 1880). ([http://cccturtle.org/species\\_class.htm](http://cccturtle.org/species_class.htm))Esiste anche una settima specie, *Chelonia agasizii*, che è ancora al centro di controversie in quanto alcuni autori la indicherebbero come una sottospecie di *Chelonia mydas* ed altri ad una specie a sé stante.

Sono tartarughe caratterizzate da carapace e piastrone coperti da scudi, zampe anteriori che hanno assunto la forma di palette natatorie, senza dita separate, zampe posteriori con una o due unghie e uno scudo intergolare.

L'identificazione delle specie su caratteri esterni, è basata sulle squame della testa (fig. 6.3), la forma delle mascelle, il numero di unghie sulle zampe ed il numero e la disposizione delle lamine cornee del carapace (fig.6.1 e 6.2).

Fig.6.1 lamine del carapace (www.widecast.org)

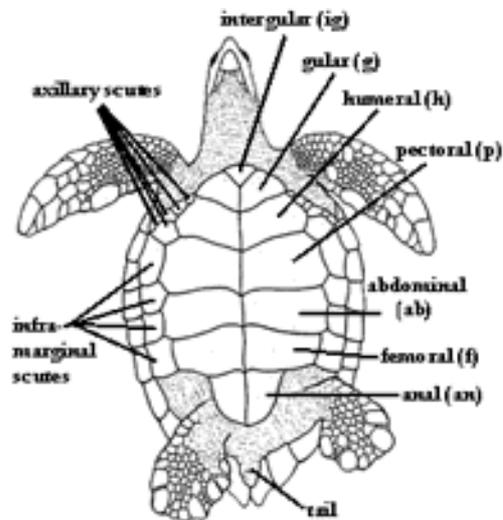
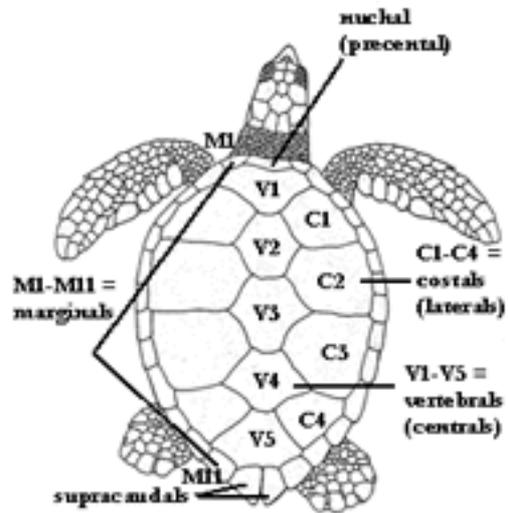


Fig.6.2 lamine del piastrone (www.widecast.org)

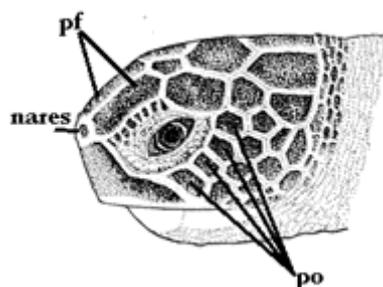


fig.6.3 testa con squame ([www.widecast.org](http://www.widecast.org))

*L'Eretmochelys imbricata* presenta 2 paia di squame prefrontali, 4 laterali e 4 inframarginali senza pori; la *Chelonia mydas* ha 1 paio di prefrontali, 4 laterali e 4 inframarginali senza pori; la *Lepidochelys kempii* presenta invece più di 1 paio di prefrontali, 5 laterali (a differenza della *Lepidochelys olivacea* che ne ha 6 o più) e 4 inframarginali con pori; la *Caretta caretta* ha più di un paio di prefrontali, 5 laterali e 3 inframarginali senza pori. I pori conducono alle ghiandole di Rathke. Queste sono localizzate in profondità nelle regioni ascellare posteriore ed inguinale anteriore, circondate da tessuto adiposo. Non mostrano cambiamenti durante la stagione riproduttiva e la loro funzione è sconosciuta. Si ipotizza che le loro secrezioni servano per la comunicazione intraspecifica, come anti microbiche e anti-incagliamento (Wyneken et al., 2001).

La famiglia delle **Dermochelidae** è, invece, rappresentata da un'unica specie: *Dermochelys coriacea*. Si tratta di un animale quasi esclusivamente pelagico privo di squame e lamine cornee, il suo carapace è costituito da moltissime placchette ossee giustapposte, impiantate nell'epidermide, che è molto spessa, simile al cuoio tanto da essere chiamata in inglese proprio Leatherback turtle cioè tartaruga dalla schiena di cuoio (Fig.6.4).

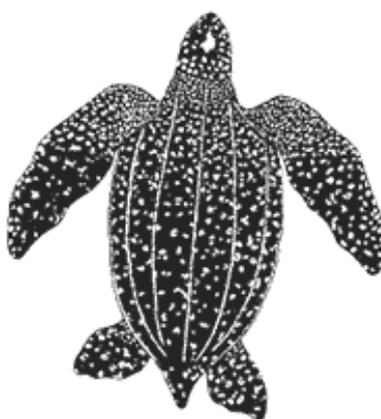


fig.6.4 *Dermochelys coriacea* ( [www.widecast.org](http://www.widecast.org) )

Nel Mar Mediterraneo vivono due specie di tartaruga marina: *Caretta caretta* e *Chelonia mydas* e ci sono stati sporadici avvistamenti anche di *Dermochelys coriacea*.

### 6.1.1. *Caretta caretta*:



Foto.6.1 *Caretta caretta* (Ferri, 2003)

Tra le specie di tartaruga marina esistenti *Caretta caretta* ha una larga distribuzione nel mondo tanto da poter essere considerata specie ubiquitaria; vive, infatti, nel Mar Mediterraneo, nel Mar dei Caraibi e negli oceani Atlantico, Pacifico e Indiano, nella fascia temperata subtropicale e tropicale (Ferri, 2003)

Può muoversi a grande distanza dalla costa e a discreta profondità (240 Km e più di 100 m), ma di solito si aggira nei pressi delle coste rocciose, delle lagune, delle insenature e delle foci dei fiumi (Ferri, 2003)

Vive in mare aperto per la maggior parte della sua vita e soltanto le femmine raggiungono la terraferma per deporre le uova.

Le femmine adulte di *Caretta caretta* misurano tra i 70 e i 100 cm di lunghezza di carapace, con un peso medio che si aggira sui 70 Kg; l'esemplare di maggiori dimensioni ha raggiunto i 120 cm di carapace e i 210 Kg di peso (Dominici, 1998). I maschi adulti misurano tra gli 80 e i 110 cm di lunghezza di carapace, con un peso medio di circa 80 Kg. In linea generale in Mediterraneo le dimensioni degli individui adulti sono inferiori rispetto a quelle di altri bacini.

La testa della *Caretta caretta* è relativamente grande, estesa posteriormente, e il muso si assottiglia anteriormente alle orbite (Wyneken *et al.*, 2001). La mandibola è robusta ed è a forma di V. La cavità orale è caratterizzata dal palato secondario, una sporgenza del palato che consente il passaggio separato del cibo e dell'aria (Wyneken *et al.*, 2001)

Il carapace e gli arti hanno una colorazione che varia dal bruno al rossiccio, mentre il piastrone e la pelle del collo e della parte inferiore degli arti sono più chiari, dal biancastro al bruno-giallognolo. I piccoli, invece, alla nascita sono neri e schiariscono poi crescendo, raggiungendo la colorazione dell'adulto.

Sul capo si trovano 4-6 placche prefrontali mentre sul carapace ci sono 5 paia di scudi costali e 3 paia di scudi inframarginali tra carapace e piastrone (Dominici, 1998).

L'alimentazione della *Caretta caretta* è fondamentalmente carnivora: si nutre di microplancton, meduse, molluschi, crostacei e pesci a seconda, soprattutto, dello stadio vitale. Può però anche mangiare fanerogame e alghe, come *Zoostera*, *Thalassia* e *Sargassum*.

Nei periodi di abbondanza alimentare possono aumentare molto di peso, accumulando grasso che smaltiscono durante i mesi di inattività.

*Caretta caretta* è l'unica specie del Mediterraneo che depone le uova sulle coste italiane (isole di Lampedusa e di Linosa) (Fig.6.5 & 6.6).

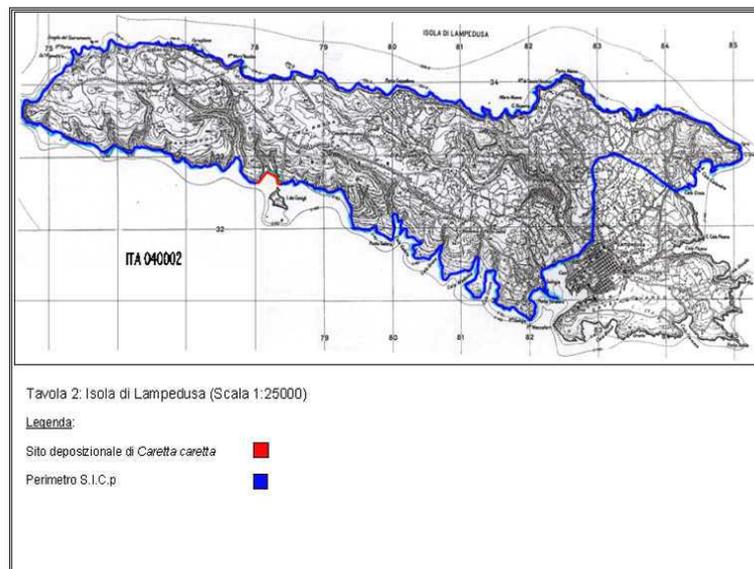


Fig. 6.5: isola di Lampedusa ([www.progettocarettacaretta.it](http://www.progettocarettacaretta.it))

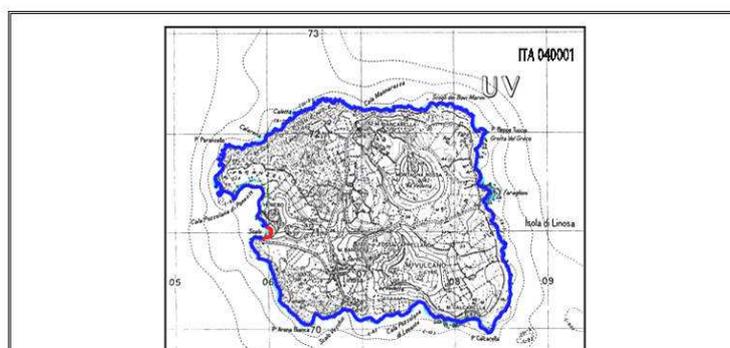


Fig. 6.6:isola di Linosa ([www.progettocarettacaretta.it](http://www.progettocarettacaretta.it)).

Gli accoppiamenti avvengono davanti alle spiagge dove poi avrà luogo la deposizione che si svolge preferibilmente di notte. Vengono deposte fino a 200 uova per nido che hanno un'incubazione di 50-70 giorni (Ferri, 2003).

## **6.2. IMPATTO ANTROPOGENICO SULLE TARTARUGHE MARINE**

La sopravvivenza delle tartarughe marine è fortemente minacciata da alcuni comportamenti sbagliati dell'uomo, come l'abitudine di gettare rifiuti e materiale di ogni tipo in mare. In alcune aree, come il Mar Mediterraneo, il fenomeno è ancora più grave perché l'informazione è scarsa e le leggi poco applicate (Gramentz, 1998; Venizelos & Smith, 1997).

La tartaruga comune sembra essere la specie che più di altre ingerisce grosse quantità di rifiuti, in tutti gli stadi della vita, in dipendenza anche del suo habitat e delle sue abitudini alimentari (Lutcavage *et al.*, 1997).

La *Caretta caretta* ha un'olfatto molto sviluppato ed è quindi in grado di individuare la presenza di animali (vivi o morti) di cui nutrirsi, ma anche il senso della vista è importante. Infatti sembra che sia particolarmente attirata dagli oggetti bianchi o argentei, oltre che da quelli neri. Questo fatto è molto importante perché rappresenta un problema alla sua sopravvivenza, in quanto l'animale viene attirato da rifiuti ed oggetti di plastica abbandonati in mare, che scambiati per cibo sono ingoiati e possono causare blocchi intestinali con gravi conseguenze che possono portare anche a morte o ad ostruzioni dell'esofago che non permettono all'animale di nutrirsi, portandolo lentamente a spegnersi (Dominici, 1998).

Nel tratto gastrointestinale (Foto. 6.2; 6.3) di alcune *Caretta caretta* spiaggiate nelle Canarie hanno rinvenuto catrame, giornali, polistirolo, pezzi di legno, ami, lenze e pezzi di reti da pesca ed hanno notato una correlazione fra la quantità di rifiuti ingeriti e le dimensioni degli animali (Tomas *et al.*, 2002).

Foto 6.2 Esofago intriso di petrolio



Gli effetti fisici e chimici sulle tartarughe causati da questo tipo di inquinanti sono ben conosciuti (National Research Council, 1990; Hutchinson & Simmonds, 1991). Generalmente gli effetti non sono letali se le quantità ingerite non sono massive, ma possono causare effetti secondari che aumentano la probabilità di morte (Hutchinson & Simmonds, 1991).

Foto 6.3 : Becco imbrattato da petrolio



E' molto importante conoscere gli effetti delle attività umane sulle tartarughe marine dell'area mediterranea e per due motivi: primo, perché la conservazione delle aree di pascolo è di primaria importanza per la gestione e sopravvivenza delle tartarughe marine (Bjorndal, 1999). Le acque occidentali del Mediterraneo, comprese fra due diverse regioni, quella atlantica e quella del Mediterraneo orientale, rappresentano una vasta area per l'alimentazione delle giovani tartarughe comuni (Laurent *et al.*, 1998). Secondo, la sopravvivenza di un gran numero di giovani esemplari ha un importante effetto sulla crescita della popolazione (Crouse *et al.*, 1987) e le acque intorno alle isole spagnole del Mediterraneo ospitano una piccola e permanente razza di tartarughe giovani e adulte (Camiñas & de la Serna, 1995).

La tartaruga comune è attualmente classificata come “vulnerabile” dall’IUCN (International Union for the World Conservation of Nature and Natural Resources, the World Conservation Union), ma è stato suggerito di considerarla come “specie in via d’estinzione” nel mar Mediterraneo (Broderick & Godley, 1996).

Spesso si sono trovate delle lenze nel tratto digerente delle tartarughe marine spiaggiate nelle isole Canarie (Orós *et al.*, 2000). In un recente studio si è trovato che il 15% (7/45) delle tartarughe sottoposte a necropsia mostravano gravi lesioni intestinali associate all’ingestione di lenze (Orós *et al.*, 2000). Ma anche l’ingestione di ami può essere fatale come accade nel Mediterraneo Occidentale (Aguilar *et al.*, 1995; Tomas *et al.*, 2001).

Spesso le tartarughe marine finiscono nelle reti dei pescatori incidentalmente, altre volte sono pescate da cacciatori di frodo a scopo alimentare (Milton & Lutz, 2003).

Eliche e collisioni con le barche che feriscono gli animali non sono eventi così rari soprattutto in determinate zone, dove il passaggio dell’uomo è frequente ([www.seaworld.org](http://www.seaworld.org)).

Anche i rifiuti abbandonati sulle spiagge possono incidere sulla sopravvivenza delle tartarughe marine: le femmine difficilmente depongono le uova in spiagge “pattumiera”, dove anche la risalita a terra diventa difficoltosa ([www.seaworld.org](http://www.seaworld.org)).

Le deforestazioni indirettamente incidono sulle aree di deposizione, come accade in Costa Rica dove il mare, non più trattenuto dalla vegetazione, risale a terra erodendo le spiagge ([www.seaworld.org](http://www.seaworld.org)).

## **6.3. MATERIALI E METODI**

### **6.3.1. Campionamento:**

Nell'anno 2003 sono state recuperate lungo le coste adriatiche della Romagna, in collaborazione con la Fondazione Cetacea di Riccione e la HERA di Ravenna, 11 esemplari di *Caretta caretta*.

Sottoposti ad esame autoptico è stato possibile prelevare campioni di cuore, fegato, muscolo, osso e rene da sottoporre all'analisi di metalli pesanti (Cd, Cr, Hg, Pb, e Se) e metalloidi (As).

Mentre nei mesi di agosto, settembre e ottobre del 2004 e di agosto e settembre del 2005, grazie alla collaborazione con la responsabile e i volontari del Centro Recupero Tartarughe Marine del WWF di Lampedusa e previo ottenimento dell'autorizzazione ufficiale da parte dei responsabili nazionali del "PROGETTO TARTARUGHE" del WWF – ITALIA, è stato possibile il prelievo di sangue da 128 animali per lo studio delle concentrazioni di metalli pesanti e di vitellogenina, considerata, negli animali ovipari, un biomarker di inquinamento da endocrine disruptors.

Da ogni individuo, registrati i dati biometrici (lunghezza e larghezza del carapace, sesso e peso), sono stati prelevati dalla giugulare circa 10 cc di sangue raccolti in provette eparinizzate; una aliquota di sangue intero, pari a circa 2 cc di ogni campione, è stata posta in provette ependorf eparinizzate e stoccate a -20 in attesa delle analisi per la ricerca sui metalli pesanti, mentre il rimanente sangue è stato centrifugato e il plasma così ottenuto posto sempre a -20 in attesa di altri tipi di analisi (endocrine disruptors e vitellogenina in primis) (foto. 6.4)



Foto.6.4 prelievo di sangue da giugulare

### 6.3.2. Analisi dei metalli pesanti e metalloidi in tessuti

Come descritto nel cap.4 lo studio dei metalli pesanti in tessuti prevede la liofilizzazione degli stessi, ad eccezione dell'osso e la successiva mineralizzazione di piccoli frammenti di tessuto osseo (0,300 – 0,500 g) e aliquote di tessuti liofilizzati (0,080 - 0,200 g) seguendo i protocolli già descritti per i cinghiali, i campioni da mineralizzare sono stati addizionati solo con acido nitrico, in quanto l'aggiunta di acqua ossigenata avrebbe impedito il rilevamento della presenza di mercurio.

#### 6.3.2.1. Analisi del mercurio con generazione di idruri

La tecnica analitica si basa sulla reazione del mercurio (Hg) con sodio boridruro e acido cloridrico, per formare l'idruro di mercurio. I vapori di mercurio sono convogliati in una cella cilindrica con finestra, di quarzo, posta nel cammino ottico di uno spettrofotometro per assorbimento atomico e la determinazione avviene mediante misure di assorbanza alla lunghezza d'onda di 253,7 nm.

Per l'analisi dei campioni è stato utilizzato uno spettrofotometro ad assorbimento atomico Varian SpectrAA 220 Fast Sequential abbinato ad un generatore di idruri Varian modello VGA-76 con autocampionatore SPS-5 Varian.

#### 6.3.2.2. Analisi dei metalli con tecnica di spettrometria di massa con sorgente al plasma (ICP-MS)

La spettrometria di massa con sorgente al plasma è una tecnica analitica utilizzata per determinare la composizione elementare inorganica presente in matrici differenti. Il campione viene nebulizzato, trasformato in aerosol e trasportato all'interno di un plasma dove è ionizzato. Gli ioni sono accelerati all'interno di un sistema analizzatore che prima li separa in funzione del rapporto massa/carica e poi li indirizza sul rivelatore il quale genera un segnale elettrico la cui intensità è proporzionale al numero di ioni incidenti

Il campione subisce quindi i seguenti processi: nebulizzazione, decomposizione termica delle molecole in ioni carichi all'interno del plasma, estrazione degli ioni nello spettrometro di massa, selezione degli ioni a seconda del rapporto massa/carica mediante un campo magnetico variabile, ed infine, la rivelazione degli ioni con elettromoltiplicatore.

Nel presente lavoro è stato utilizzato uno **Spettrometro di massa con sorgente al plasma (ICP-MS)** modello 7500 a, Agilent HP interfacciato ad un autocampionatore, modello ASX-500, CETAC

Le condizioni strumentali sono riportate nella seguente tabella 6.1:

<b>Flusso di Ar al plasma l min<sup>-1</sup></b>	14,85
<b>Flusso di Ar al nebulizzatore l min<sup>-1</sup></b>	1,20
<b>Potenza, W</b>	1350
<b>Risoluzione, amu</b>	1
<b>Replica</b>	3
<b>Tempo di lettura in secondi</b>	54
<b>Isotopi</b>	<b>u.m.a.</b>
<b>Cr</b>	53
<b>As (*)</b>	75
<b>Se</b>	82
<b>Cd</b>	111
<b>Pb (**)</b>	206 – 207 -

**Tab.6.1**

Equazioni elementari adottate:

$$(*) \text{As}^{75} = \text{As}^{75} - 3,087 + \text{Se}^{77} * 2,619 * \text{Se}^{82}$$

$$(**) \text{Pb} = \text{Pb}^{206} + \text{Pb}^{207} + \text{Pb}^{208}$$

La curva di calibrazione è stata realizzata, per i vari elementi, alle concentrazioni riportate nella tabella 6.2 Sono stati utilizzati come standard interni germanio (72-Ge) e rodio (103-Rh) e Lutezio (175 – Lu)

<b>Massa elemento</b>	<b>Livello 1 (ppb)</b>	<b>Livello 2 (ppb)</b>	<b>Livello 3 (ppb)</b>	<b>Livello 4 (ppb)</b>
<b>53 Cr</b>	0	4	20	40
<b>75 As</b>	0	1	5	10

<b>82 Se</b>	0	1	5	10
<b>111 Cd</b>	0	0,5	2,5	5
<b>206-207-208 Pb</b>	0	1	5	10

Tab. 6.2: curva di calibrazione: concentrazione di Cr, As, Se, Cd e Pb

### 6.3.3. Valutazione del Pb in campioni di sangue

Per quanto riguarda lo studio del Pb nel sangue le analisi sono state condotte con uno spettrofotometro a fornetto di grafite (VARIAN SPETRAA-220 ZEEMAN con autocampionatore) utilizzando il programma termico riportato in tabella, su campioni diluiti 1:20 con una soluzione di TRITON-X allo 0,05% in acqua deionizzata.

<b>PARAMETRO</b>	<b>METALLO</b>
	<b>PIOMBO</b>
<b>Lunghezza d'onda (<math>\lambda</math>) nm</b>	283.3

Temperatura di atomizzazione (°C)			2800								
Volume del campione	8 µl	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Programma termico adottato	<i>Standard Addition</i>	150	150	480	480	480	480	2400	2400	2800	40
Steps	1	40	30	10	20	20	2	1.2	2	2	21.9
Temp.(°C)	85	3	3	3	3	3	0	0	0	3	3
Hold (sec.)	5										
Argon (ml/min)	3										

Tab.6.3 programma termico

Da ogni campione di sangue sono stati, infatti, prelevati circa 100 µl di sangue posti in provette lavate in acqua e acido nitrico, per evitare una eventuale contaminazione esterna da metalli pesanti, ai quali sono stati aggiunti 1900µl della soluzione TRITON-X allo 0,05 %.

#### 6.3.4. Analisi statistica

La mancanza di caratteri sessuali secondari ben sviluppati, negli 11 esemplari campionati, non ha consentito di determinare l'età dei nostri soggetti, tranne in un caso (femmina) in cui sono stati individuati follicoli ovarici. D'altro canto proprio la mancanza di questi caratteri ha portato a considerare tutti i soggetti (tranne la femmina certa) classificabili quali giovani.

In conseguenza di ciò, non è stata effettuata un'analisi statistica in funzione né del sesso né dell'età.

Per quanto riguarda invece la ricerca di piombo nel sangue è stato possibile effettuare un'analisi statistica utilizzando il programma descritto nel cap.4 utilizzando come parametro di classificazione la misura della lunghezza del carapace, unico parametro util per quantificare l'età degli soggetti testati.

## **6.4. RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **6.4.1. Risultati delle indagini necroscopiche e istologiche**

Le indagini necroscopiche hanno messo in evidenza lesioni simili in tutti i soggetti. In particolare, il fegato risultava friabile anche applicando una moderata pressione, compatibile con uno stato steatosico. Nel soggetto n°8 si è potuto osservare una lesione circolare di circa 3 cm di diametro (Foto 6.6.) circondata da una zona di colore più scuro. In sezione, si osservava un liquido necrotico-emorragico. I polmoni risultavano collassati e talvolta congesti. Si notavano un'aumento moderato delle dimensioni della milza e i reni, ad un primo esame, risultavano normali e talvolta congesti. Il tessuto adiposo si presentava scarso e si rilevavano generalizzati edemi emorragici in quasi tutti gli animali. Inoltre, a livello delle articolazioni erano presenti lesioni contenenti materiale purulento dalle dimensioni variabili da pochi centimetri a 8 cm (Foto.6.5) in relazione allo spessore del grasso.

Le indagini istologiche hanno messo in evidenza steatosi a carico del fegato compatibile con il rilievo macroscopico; inoltre si è osservato necrosi, nubecole di batteri e stasi (Foto 6.11). A carico del polmone viene confermata la congestione, la stasi ematica e la necrosi. Per quanto riguarda la milza, sono stati confermati gli stati di necrosi, si è notata la presenza di formazioni cistiche, una sparsa apoptosi e nubecole di batteri. Nei reni sono stati rilevati: materiale eosinofilo (ialino) nello spazio di Bowman, scomparsa di diversi glomeruli, materiale necrotico in via di calcificazione, crescite batteriche in forma "cistica", fra l'altro osservabili anche in altri organi (Foto 6.12 & 6.13.). Nel grasso, le lesioni venivano identificate come ascessi purulenti a carico dei vasi sanguigni, confermata anche dalla citologia eseguita tramite strisci e impronte, dove si osservano cellule infiammatorie, batteri (sporigeni) e materiale necrotico (Foto 6.7, 6.8 & 6.9)



Foto. 6.5: tessuto adiposo sottocutaneo – molti vasi sanguigni ectasici contengono materiale purulento

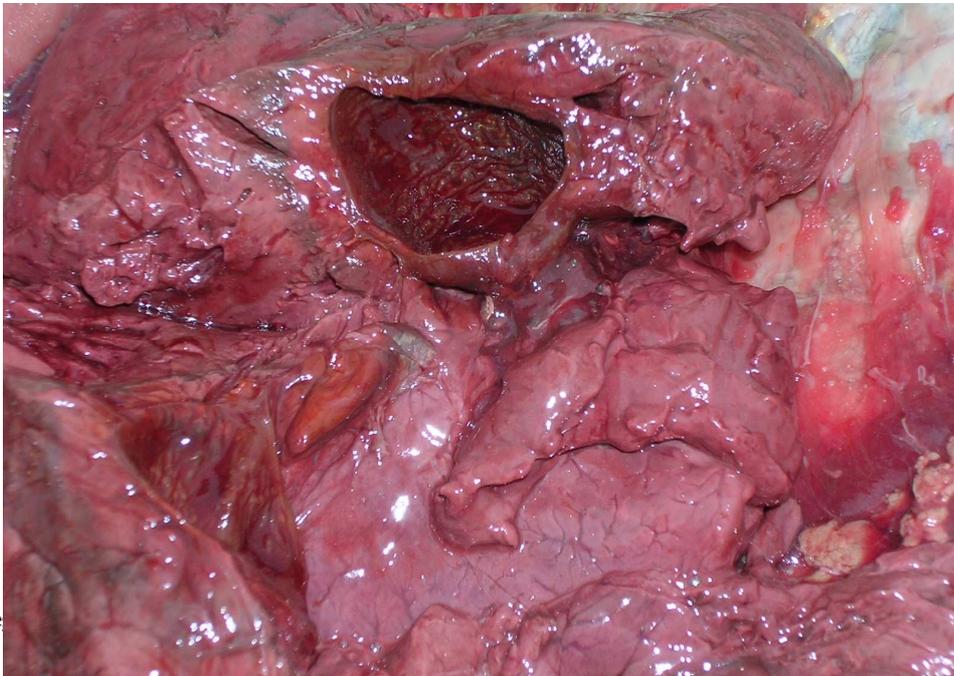
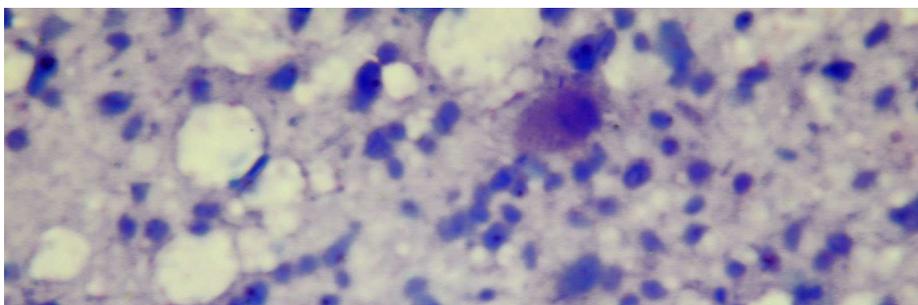
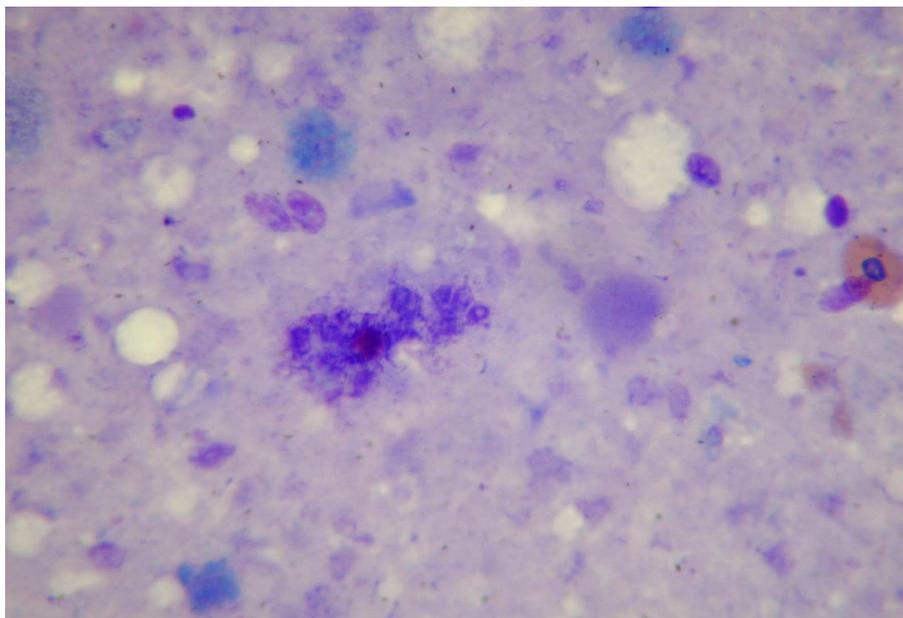


Foto 6.6: fe

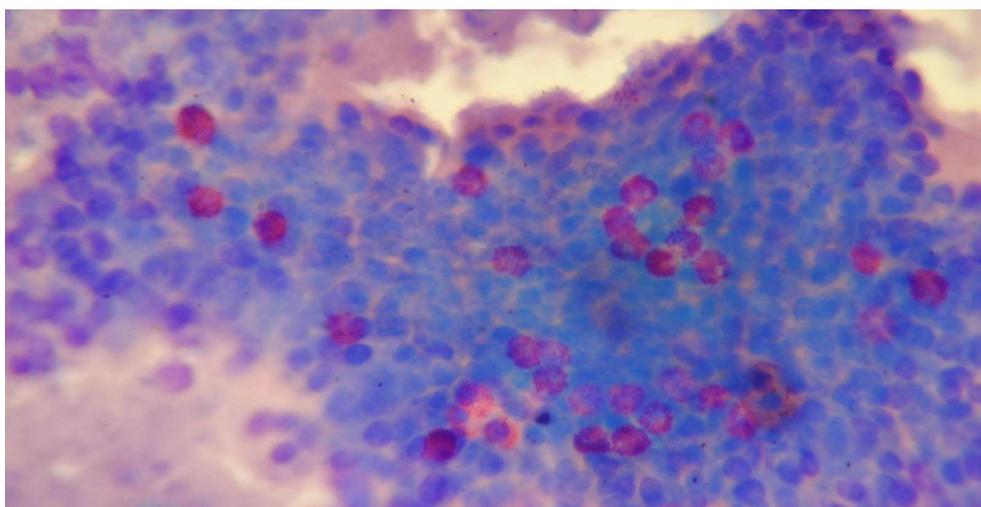
atociti in



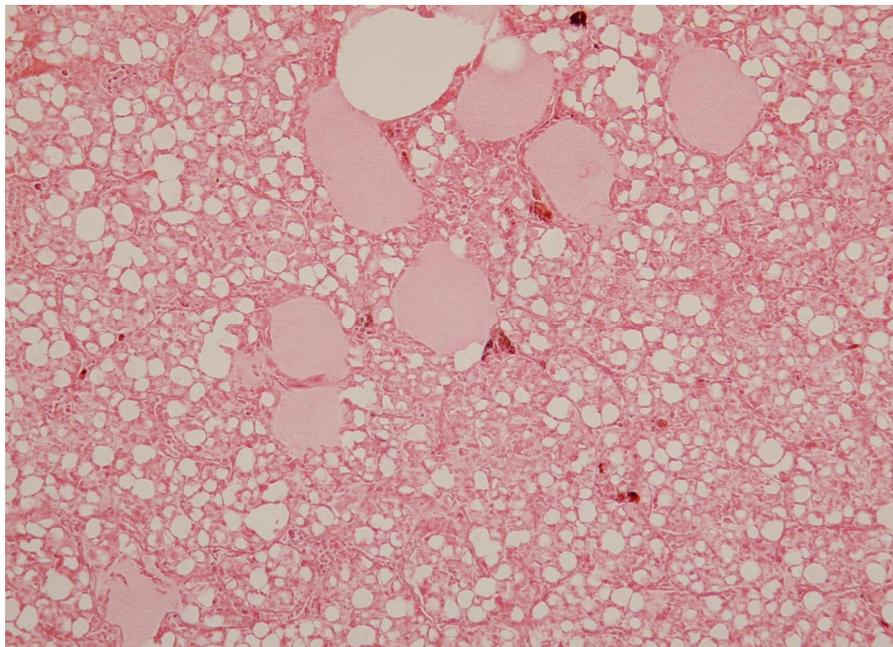
**Foto. 6.7: materiale purulento nel grasso sottocutaneo. Nello striscio si osserva, oltre a numerose cellule infiammatorie, un uovo di macroparassita. May-Gründwald-Giemsa . Ob 20X**



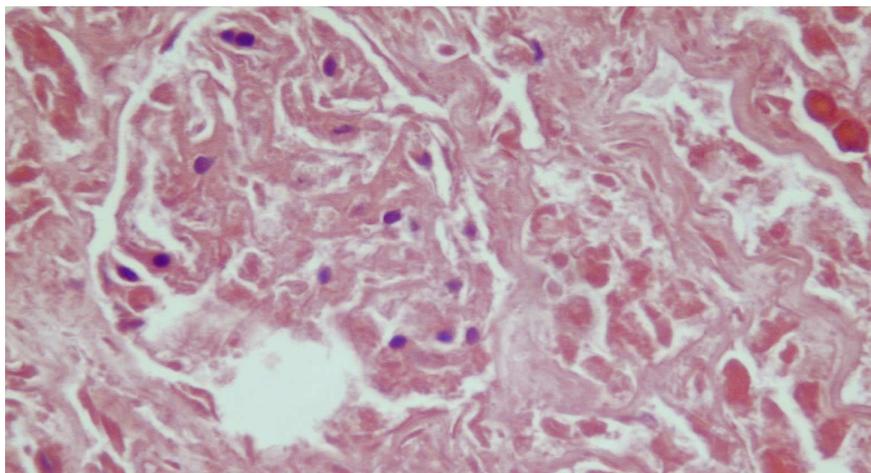
**Foto 6.8: materiale purulento nel grasso sottocutaneo. È ben evidente una colonia batterica. May-Gründwald-Giemsa. Ob 20X**



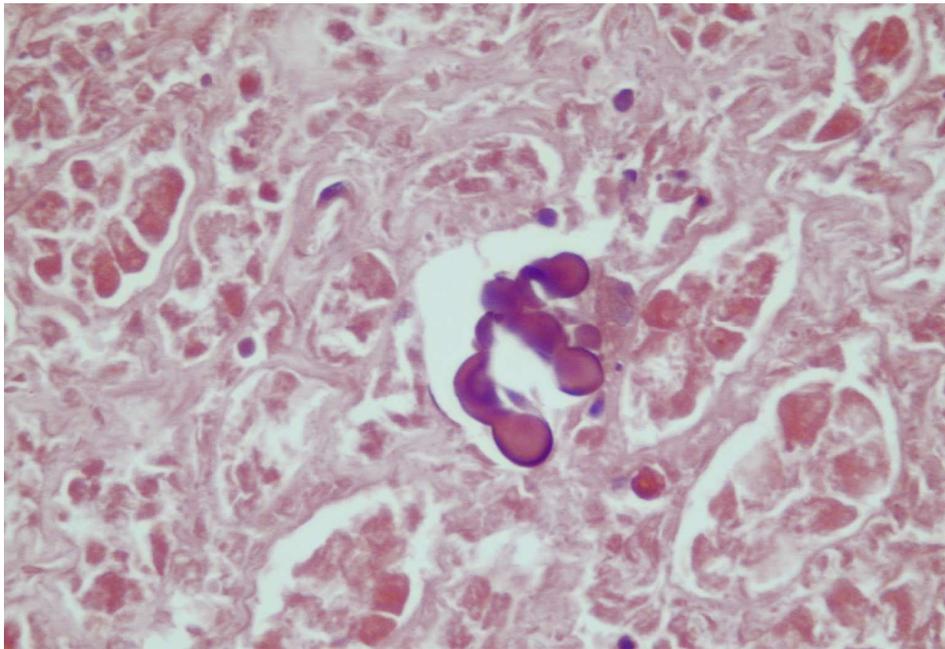
**Foto 6.9: materiale purulento nel grasso sottocutaneo. Essudato infiammatorio principalmente costituito da linfociti ed eterofili. May-Gründwald-Giemsa . Ob 40X**



**Foto 6.10: fegato. Statosi diffusa ed edema. E&E. Ob 10X**



**Foto 6.11:** rene. All'interno di glomeruli si osserva scarsità di elementi cellulari. E&E. Ob 25X



**Foto. 6.12:** rene. All'interno di un tubulo è presente materiale necrotico in via di calcificazione. E&E. Ob 25X

#### 6.4.2. Risultati dello studio dei metalli pesanti nei tessuti.

Le condizioni in cui sono stati reperiti gli esemplari spiaggiati hanno fortemente condizionato la possibilità di raccogliere gli organi da analizzare. In tabella 6.2 sono riportati per ogni singolo animale gli organi e tessuti che è stato possibile campionare.

Animali	Organi						
	Cuore	Fegato	Grasso	Milza	Muscolo	Osso	Rene
1	X	X	X		X	X	X
2			X		X	X	
3			X		X	X	
4	X	X	X		X	X	X
5	X	X	X		X	X	X
6	X	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X	X
8	X	X	X	X	X	X	
9		X	X	X	X	X	X
10		X	X		X	X	X
11	X	X	X	X	X	X	X

Tab.6.4

In tabella 6.3 e in fig. 6.7 e 6.8 sono riportati i valori medi  $\pm$  e.s. e i range di variazione relativi alle concentrazioni di ogni singolo metallo analizzato nei vari tessuti. Le concentrazioni, sempre relative ad ogni singolo metallo, reperite nei singoli soggetti sono invece rappresentate graficamente nelle figure 6.9, 6.10, 6.11, 6.12, 6.13 e 6.14.

<u>Metallo</u>	<u>Organo</u>				
	<u>Cuore</u>	<u>Fegato</u>	<u>Muscolo</u>	<u>Ossso</u>	<u>Rene</u>
<b>Arsenico</b>	28.85 ± 2.08 21.6-37.8	16.27 ± 1.78 6-22.7	83.81 ± 10.34 30.1-144	5.45 ± 1.40 1.02-18	25.2 ± 3.19 14.7-38.8
<b>Cadmio</b>	0.45 ± 0.07 0.20-0.87	1.46 ± 0.20 0.43-2.29	0.17 ± 0.06 < LOD-0.35	0.08 ± 0.01 < LOD-0.13	6.20 ± 2.52 0.57-19.4
<b>Cromo</b>	0.92 ± 0.25 0.41-2.55	0.46 ± 0.08 0.27-0.93	0.56 ± 0.05 0.30-0.91	0.38 ± 0.16 0.13-1.90	0.77 ± 0.15 0.42-1.37
<b>Mercurio</b>	0.75 ± 0.08 0.38-1.32	0.81 ± 0.11 0.34-1.33	0.70 ± 0.10 0.22-1.32	0.03 ± 0.003 0.02-0.06	0.70 ± 0.14 0.16-1.14
<b>Piombo</b>	0.34 ± 0.05 0.20-0.58	0.22 ± 0.02 0.13-0.34	0.10 ± 0.01 < LOD-0.16	1.46 ± 0.25 0.31-2.72	0.35 ± 0.05 0.21-0.55
<b>Selenio</b>	7.34 ± 4.48 4.48-10.5	5.54 ± 2.85 2.85-10.3	4.53 ± 2.52 3.07-6.93	0.74 ± 0.51 0.51-1.12	6.43 ± 0.76 3.90-9.73

**Tab.6.5:**

Il metallo reperito alle concentrazioni più elevate è l'**arsenico**, che in tutti i tessuti presenta valori superiori a 1 ppm (da 1.02 ppm nell'osso a 144 ppm nel muscolo).

Tali concentrazioni sono da considerarsi entro i range definiti per un'esposizione di background (inferiori a 100 ppm peso secco per gli organismi marini), ma risultano comunque più elevati rispetto a quanto riscontrato sempre nel bacino dell'Adriatico e in Giappone da altri autori (Storelli & Marcotrigiano, 2000).

L'organo che presenta le maggiori concentrazioni è il muscolo pettorale ( $83.81 \pm 10.34$  ppm), seguito dal cuore, che per altro presenta valori pari a circa un terzo di questo ( $28.85 \pm 2.08$  ppm), dal rene ( $25.2 \pm 3.19$  ppm), dal fegato ( $16.27 \pm 1.78$  ppm) e dall'osso ( $5.45 \pm 1.40$  ppm). Tali risultati sono in accordo con quanto riportato da Storelli & Marcotrigiano (2000), che rilevano concentrazioni circa doppie di metalloide nel muscolo rispetto al fegato e da Sakai *et al.* (2000), che individuano anche un andamento residuale analogo a quanto osservato nel presente studio (muscolo > rene > fegato). Storelli & Marcotrigiano (2000) rilevano una buona correlazione tra peso dell'animale e contenuto di arsenico; le condizioni degli animali utilizzati in questo studio non hanno consentito di ottenere una misurazione del peso

affidabile (molti soggetti, sebbene non in avanzato stato di decomposizione, avevano comunque iniziato il processo degenerativo), per cui non è stato possibile verificare l'esistenza di questa relazione anche in questo studio. Niente fa però ritenere che una simile correlazione non debba esistere anche per i soggetti da noi considerati.

Una possibile spiegazione degli elevati livelli di metalloide nei tessuti di *Caretta caretta* può essere la dieta che caratterizza questa specie: le tartarughe marine infatti si nutrono di elevati quantitativi di crostacei, che presentano normalmente e "fisiologicamente" concentrazioni notevoli di arsenico (da < 1 a 70 mg/kg), più elevate negli organismi bentonici (Norin *et al.*, 1985).

I livelli di arsenico reperiti nel presente studio, sebbene in accordo, quale profilo residuale, con quanto riportato da Storelli & Marcotrigiano (2000), sono comunque decisamente più elevati rispetto a quanto riportato dagli autori. In considerazione di quanto appena sottolineato, nonostante non sia stata effettuata in questo studio una speciazione del metalloide, si può temere per gli animali considerati, al pari di quanto concluso da Storelli & Marcotrigiano (2000), un effetto tossico dell'arsenico a livello epatico. Storelli & Marcotrigiano (2000) infatti valutano i rapporti tra arsenico totale ed inorganico, osservando come la percentuale di forme inorganiche a livello epatico sia decisamente più elevata rispetto a quella nel muscolo e come la quantità di arsenico inorganico aumenti all'aumentare dei livelli di arsenico totale. Poiché le forme inorganiche sono quelle maggiormente tossiche, per un'azione a livello di gruppi sulfidrilici degli enzimi, non è da escludere, sebbene non sia nota l'esatta pericolosità del metalloide per le tartarughe, una certa epatotossicità dei livelli riscontrati nel presente studio.

Il **selenio** è l'elemento che presenta, dopo l'arsenico, le concentrazioni più elevate pur rimanendo nel range di background (40 ppm). Tra gli organi da noi esaminati il cuore presenta la maggior concentrazione ( $7.34 \pm 4.48$  ppm) seguita dal rene ( $6.43 \pm 0.76$  ppm) e dal fegato ( $5.54 \pm 2.85$  ppm). Confrontando i nostri dati con quelli riportati nell'unico studio che valuta le concentrazioni di selenio nei tessuti di *Caretta caretta* (Storelli *et al.*, 1998) è possibile affermare che le concentrazioni di selenio da noi trovate sono inferiori rispetto a quanto riportato dagli autori. Inoltre il profilo residuale definito nello studio di Storelli *et al.*, (1998) è in accordo con quanto delineato nel presente studio. In considerazione del ruolo protettivo svolto dal selenio contro i radicali liberi, non stupisce il fatto che organi particolarmente sensibili quali il cuore siano quelli che presentano le concentrazioni più elevate di metallo.

In analogia con i livelli di selenio inferiori rispetto a quanto reperito in bibliografia anche il **mercurio**, che è strettamente correlato con le concentrazioni di selenio, presenta quantitativi minori rispetto a quelli riportati negli studi considerati (Storelli *et*

*al.*, 1998; Godley *et al.*, 1999). I risultati sono molto vicini ai valori di background, pari a 1 ppm, e presentano i livelli più elevati nel fegato ( $0.81 \pm 0.11$  ppm), nel cuore ( $0.75 \pm 0.08$  ppm) e nel muscolo ( $0.70 \pm 0.10$  ppm) e rene ( $0.70 \pm 0.14$  ppm), ma comunque la distribuzione è abbastanza omogenea in tutti i tessuti, ad eccezione dell'osso, in accordo con la cinetica del metallo.

Per quanto riguarda il  **Cromo**  i dati ottenuti sono in accordo con quanto ritrovato in letteratura (Storelli *et al.*, 1998) anche se i lavori svolti su questo metallo sono piuttosto scarsi. Dai risultati ottenuti si evince che l'organo dove più concentra è il cuore ( $0.92 \pm 0.25$  ppm) seguito dall'osso ( $0.38 \pm 0.16$  ppm) anche perché ricordiamo che l'osso, ed in particolare la regione epifisaria delle ossa lunghe, è sito di accumulo del metallo.

Il  **cadmio**  presenta nei vari tessuti presi in considerazione concentrazioni molto variabili, inferiori al LOD nell'osso e nel muscolo, e pari a 19.4 ppm nel rene; il secondo organo in ordine di concentrazione è il fegato ( $1.46 \pm 0.20$  ppm), seguito poi dagli altri organi, che presentano concentrazioni relativamente omogenee tra loro.

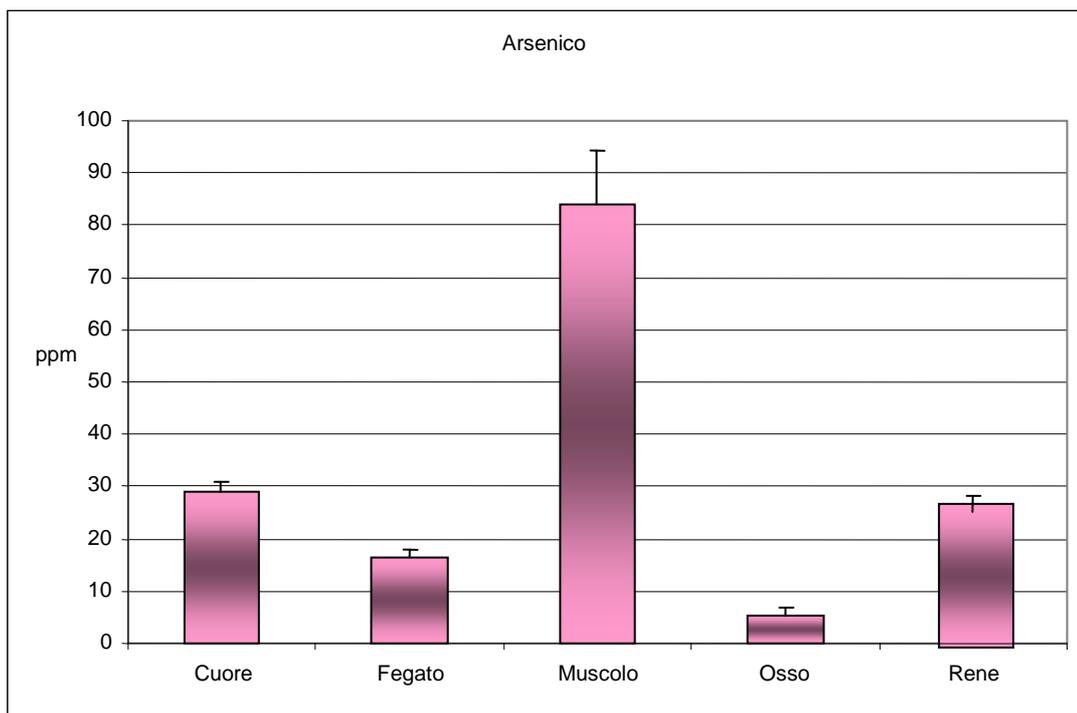
La presenza di concentrazioni elevate a livello renale ed epatico rispetto ad altri tessuti è spiegabile ricordando la cinetica del metallo stesso che prevede il legame con metallotioneine a livello epatico e il riassorbimento dei complessi Cd-tionina a livello del sistema tubulare renale.

Queste concentrazioni risultano essere, comunque, inferiori sia ai livelli di background, che negli organismi marini si aggirano sui 100 ppm, che a quelle riscontrate nell'Adriatico meridionale e in Giappone (Storelli *et al.*, 2003; Godley *et al.*, 1999; Sakai *et al.* 2000).

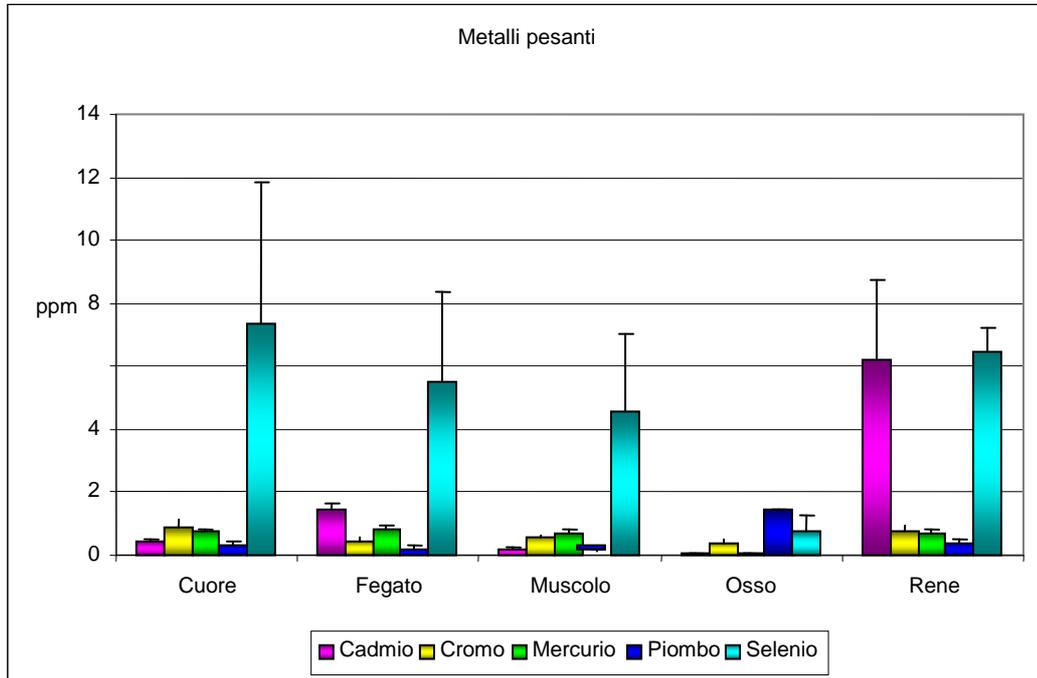
Il  **piombo**  ha una distribuzione omogenea nei vari tessuti esaminati, con valori inferiori all'1 ppm eccezion fatta per l'osso ( $1.46 \pm 0.25$  ppm) che presenta la maggior concentrazione in accordo con la cinetica del metallo. Tali concentrazioni risultano in accordo con i dati reperiti in letteratura (Storelli *et al.*, 2003; Godley *et al.*, 1999; Sakai *et al.* 2000) e sempre inferiori ai valori di background (1-20 ppm).

Dal punto di vista tossicologico, cadmio e piombo rivestono minore interesse a livello dell'ambiente marino perché scarse sono le possibili fonti di contaminazione.

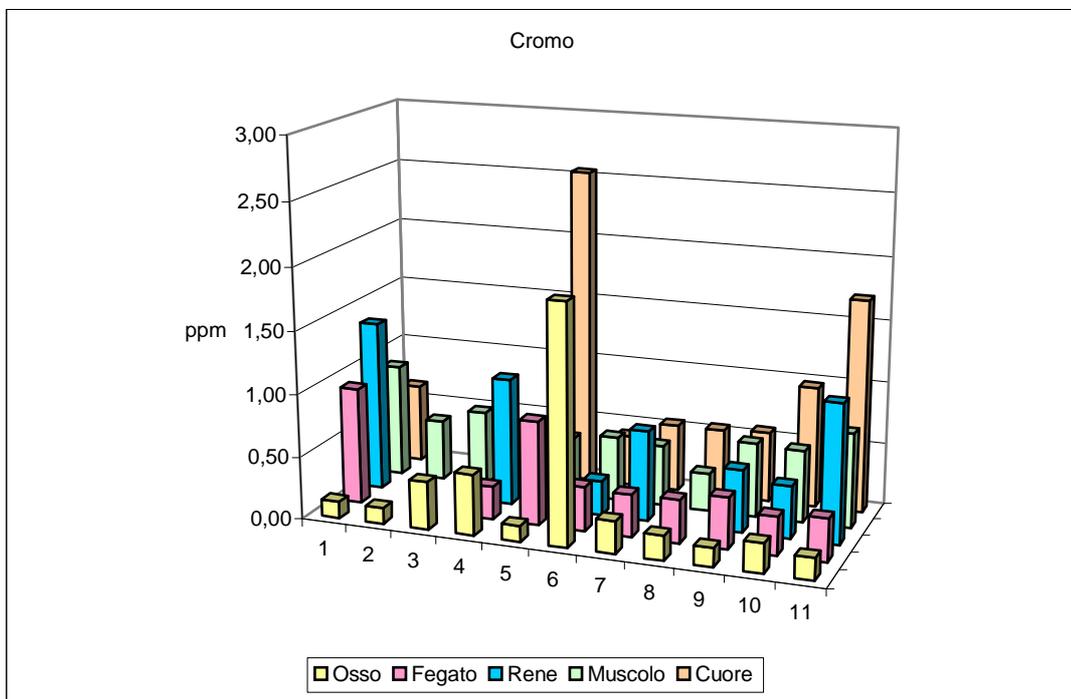
L'unica possibilità di ottenere dati certi sarebbe quella di compiere una adeguata sperimentazione su questi animali, cosa ovviamente ed eticamente non attuabile perché animali protetti.



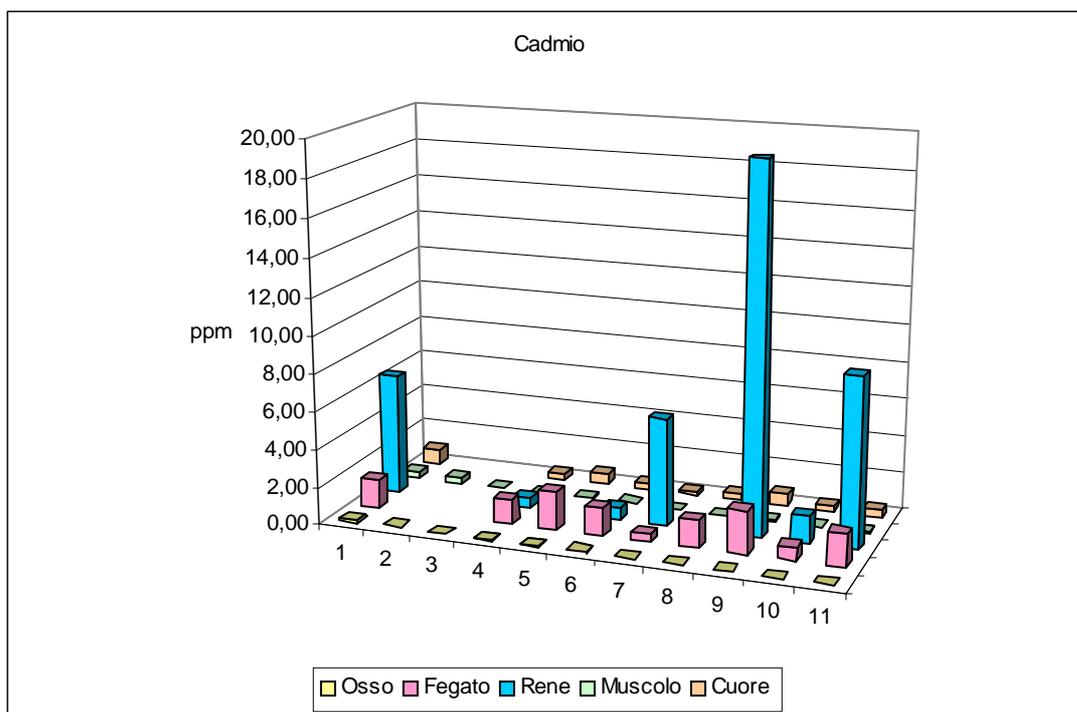
**Fig. 6.7:** Concentrazione Arsenico



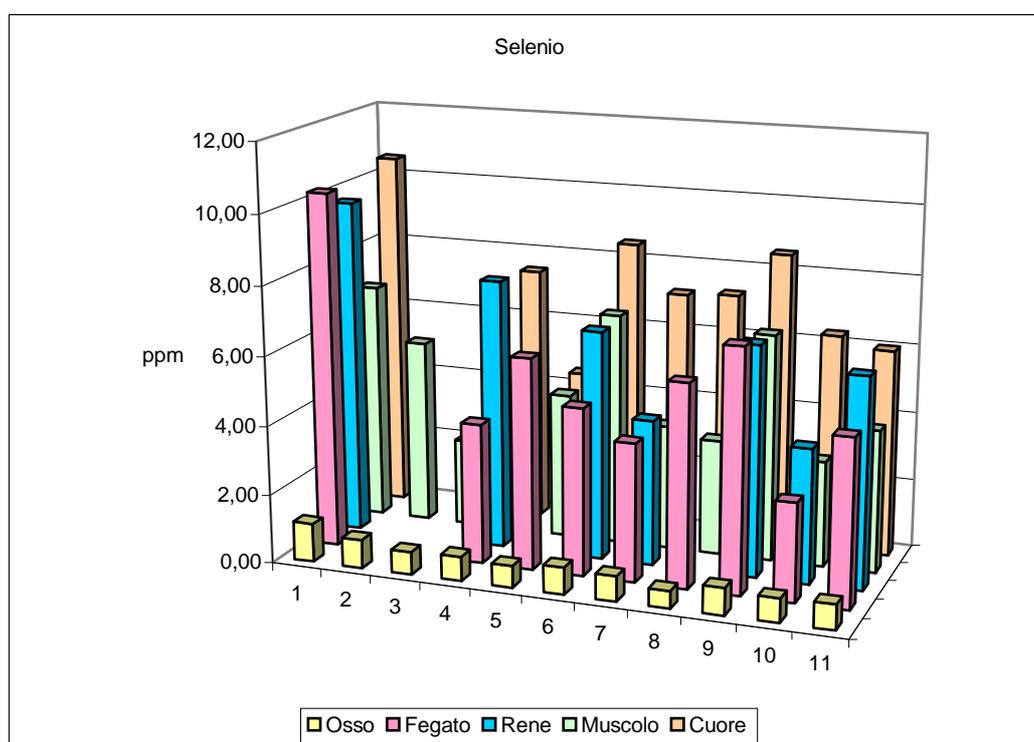
**Fig. 6.8:** Concentrazioni Cd, Cr, Hg, Pb, Se



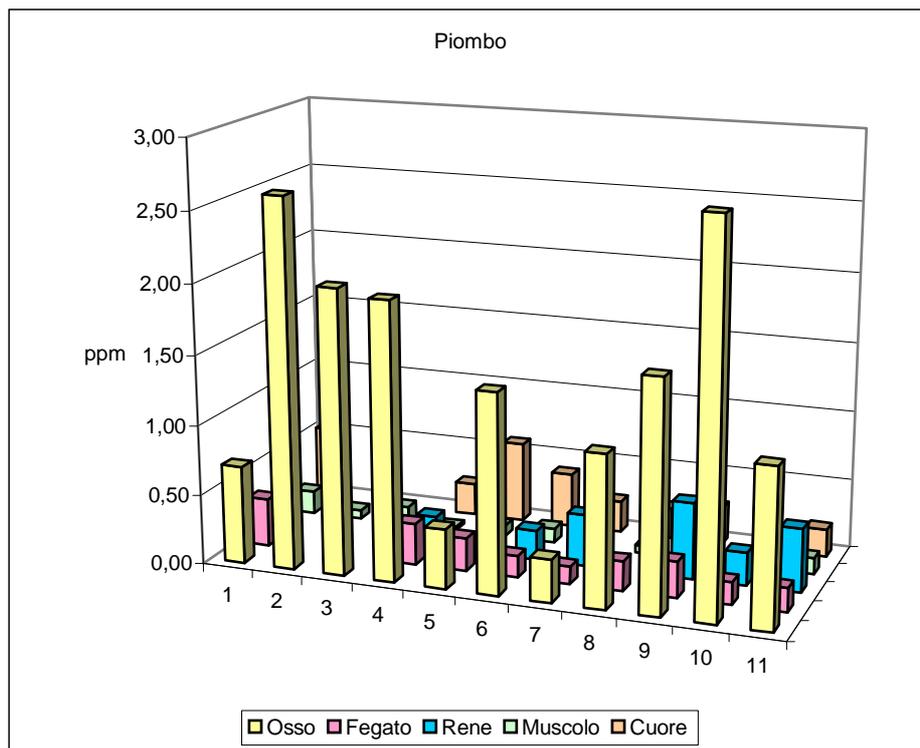
**Fig.6.9 :** Concentrazioni Cr nei vari tessuti



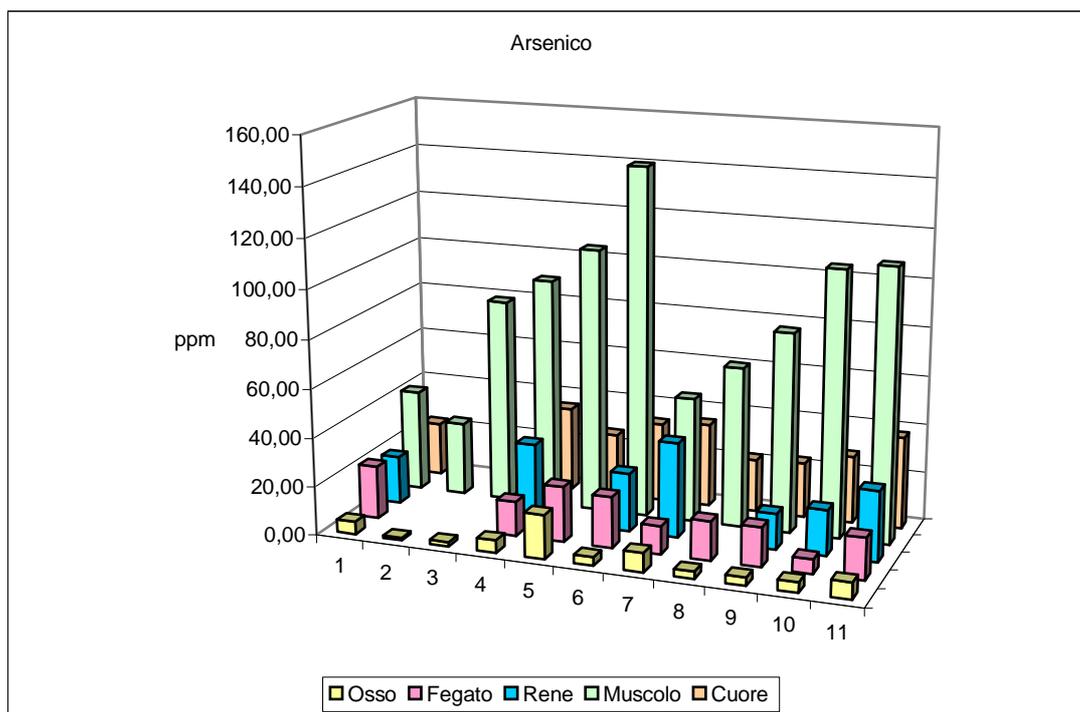
**Fig.6.10: Concentrazioni Cd nei vari tessuti**



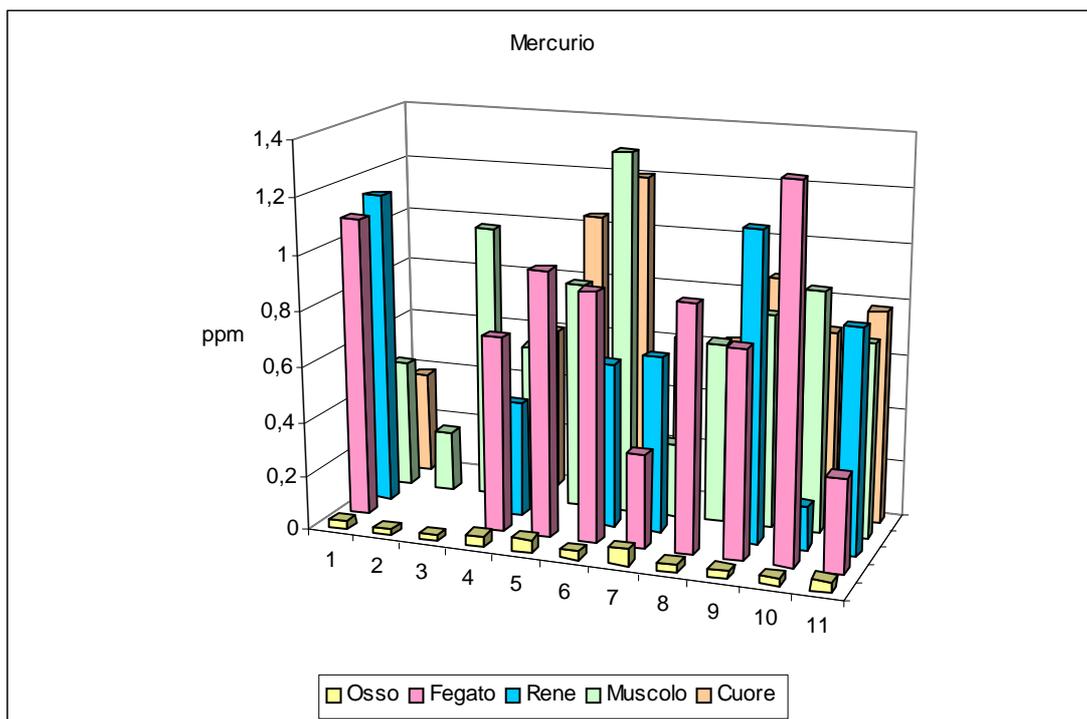
**Fig.6.11: Concentrazioni Se nei vari tessuti**



**Fig.6.12: Concentrazioni del Pb nei vari tessuti**



**Fig. 6.13: Concentrazioni del As nei vari tessuti**



**Fig.6.14 :Concentrazioni del Hg nei vari tessuti**

### 6.4.3. Risultati e discussione sullo studio del Pb in campioni di sangue

In tabella sono riportati i risultati della suddetta indagine espressi in  $\mu\text{l/l}$  sui campioni originali considerando la diluizione.

Gli animali sono stati divisi in tre gruppi in base alla lunghezza del carapace, unico parametro utile per stimare l'età delle tartarughe marine (Gruppo 1: 30-50 cm; Gruppo 2: 50-60 cm e Gruppo 3: oltre i 60 cm).

<b>LUNGHEZZA CARAPACE</b>	<b>MEDIE <math>\pm</math> DS (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
<b>1</b>	$29.44 \pm 2.42$
<b>2</b>	$32.33 \pm 6.79$
<b>3</b>	$34.74 \pm 3.05$

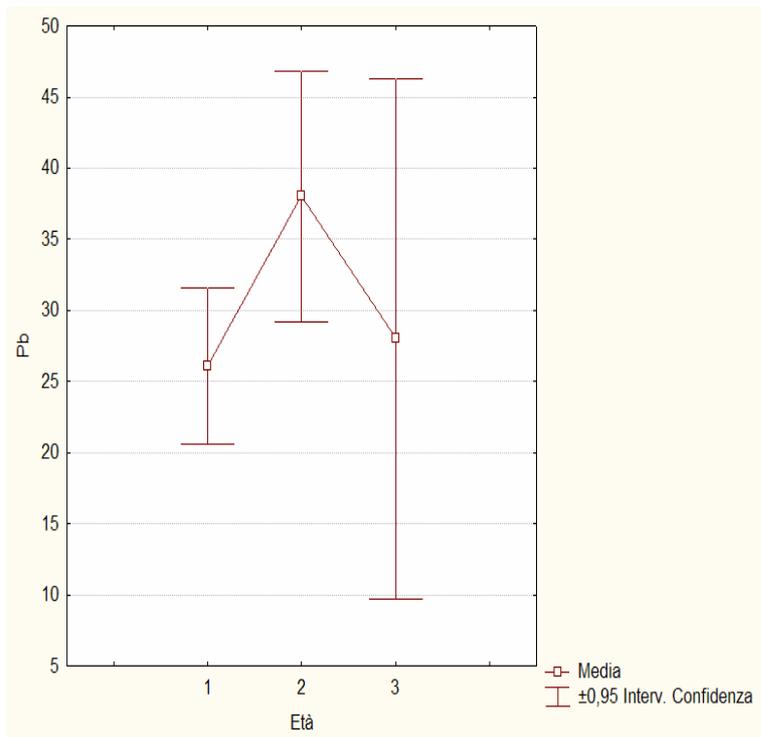
Molto poco si sa a proposito di tracce di metalli pesanti nel sangue di tartarughe marine, in particolare *Caretta caretta*. Solo Kenyon et al (2001) ha affrontato uno studio simile su campioni di sangue di *Lepidochelys kempii*, mentre altri autori hanno affrontato l'argomento focalizzando la ricerca di metalli pesanti su tessuti e uova, come descritto nel paragrafo precedente.

I valori di piombo da noi trovati sembrano essere più alti se non duplicati rispetto a quelli osservati da Kenyon et al (2001).

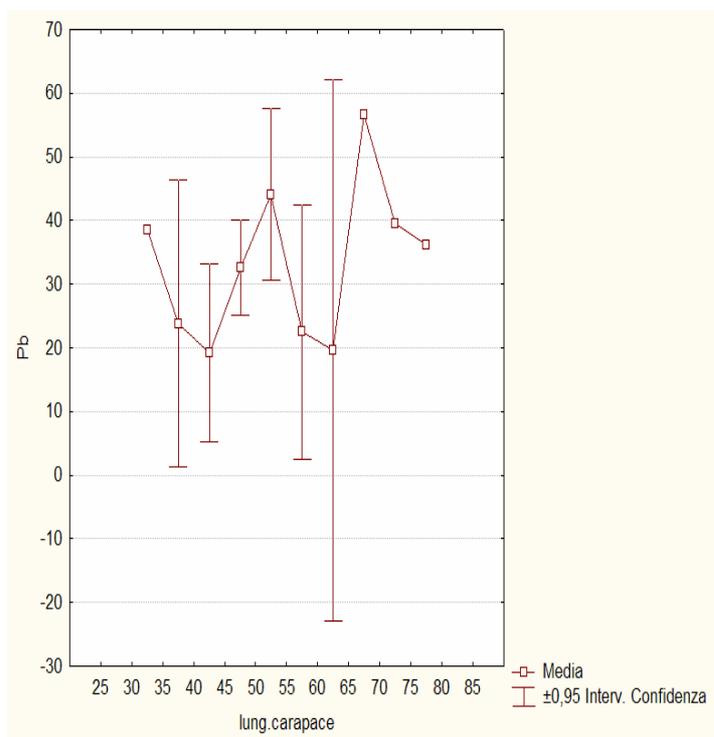
Questa differenza può essere spiegata dal fatto che le due specie studiate in questo e nel lavoro precedente siano diverse come diversa è stata la localizzazione dell'area di ricerca.

Ciò nonostante questi livelli, se pur elevati, sono inferiori al livello di background che per i rettili è stato calcolato aggirarsi sui 100 ppb (Beresford et al., 1981).

L'analisi statistica, al contrario, non ha messo in evidenza nessuna differenza statisticamente significativa tra i tre gruppi considerati. Tuttavia una certa variabilità è stata osservata tra gli individui più grandi (fig 6.15 & 6.16).

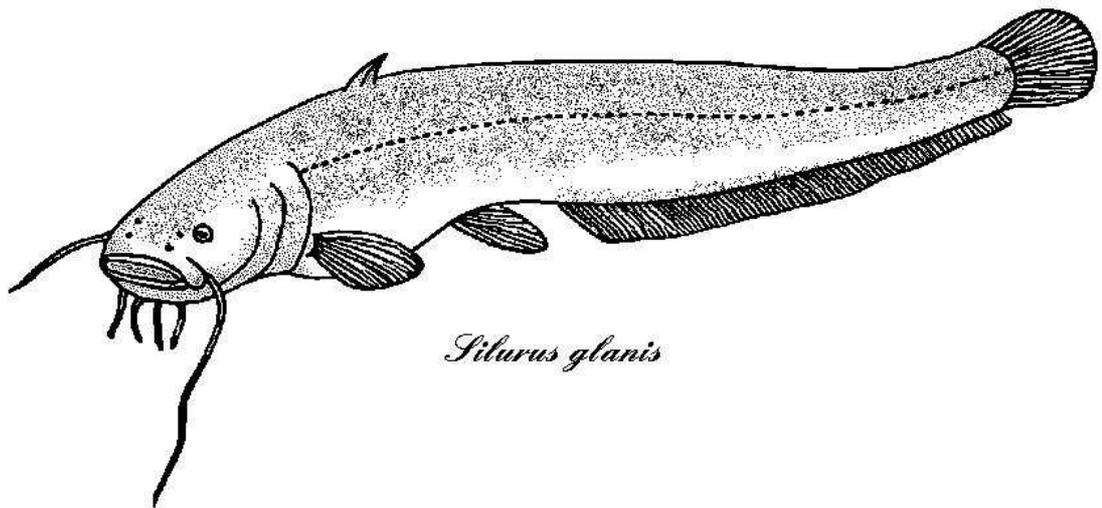


**Fig6.15.**statistical analysis (lead concentration /groups of carapace length)



**Fig:6.16** statistical analysis (lead concentration/ carapace length)

**7.STUDIO DELLA VITELLOGENINA IN PESCE  
SILURO (*Silurus glanis*)**



## **7.1.CENNI DI BIOLOGIA DEL PESCE SILURO**

Il pesce siluro (*Silurus glanis*), appartiene alla famiglia dei Siluridi.

È un pesce originario dei grandi bacini fluviali dell'Europa centrale ed orientale (Ungheria). In Italia è stato segnalato per la prima volta nell'Adda nel 1957 ([www.geocities.com/Eureka/Park/9546/pages/4.htm](http://www.geocities.com/Eureka/Park/9546/pages/4.htm)). L'introduzione sembra dovuta alla voglia di pesci "esotici" da parte dei pescatori e l'immissione degli stessi nei laghetti artificiali o ad una immissione involontaria di piccoli siluri insieme a carpe e a pesci gatti durante le campagne di ripopolamento dei fiumi.

Presenta un corpo allungato fusiforme di lunghezza variabile da 80 a 220 cm e con peso variabile da 10 a 100 kg.

La pelle è sprovvista di squame ma è durissima e ricoperta da un abbondante strato di muco prodotto dalle numerose ghiandole mucose che gli garantiscono un continuo ricambio d'acqua.

(<http://digilander.libero.it/catcarpfishing/siluro/chi.htm>).

La colorazione varia in base all'età: da giovane è gialla-olivastra scura sul dorso e più chiara nella zona ventrale mentre nell'adulto il colore assume tinte più scure con tendenze al bruno-verdastro screziato da eleganti marmoreggiature nere e grigie.

Presentano un'unica pinna dorsale, molto ridotta che contiene una spina rigida collegata a ghiandole che secernono una sostanza particolare che non è un veleno ma che può provocare un leggero gonfiore della parte punta.

La zona ventrale presenta, al contrario del dorso, pinne molto estese e portanti: una ventrale triangolare e un'altra lunghissima che va da metà corpo alla coda, caratteristica questa che lo distingue dal pesce gatto.

La testa è decisamente sproporzionata rispetto al resto del corpo, arrotondata e depressa, terminante in una bocca larghissima.

L'apparato dentario è costituito da due placche mandibolari su cui alloggiato numerosissimi denti, lunghi pochi millimetri, che nel loro insieme possono essere paragonati ad una carta vetrata molto forte.

Gli occhi sono piccolissimi ed inespessivi e questo suggerisce che il senso più sviluppato non sia la vista, infatti gran parte della capacità sensoriale del siluro è affidata alla linea laterale e ai bargigli (due lunghi che possono arrivare fino alla coda e quattro più corti) posti tra l'occhio e il labbro superiore (<http://www.fiumemincio.it/siluomrf.htm>).

Raggiunge la maturità sessuale a 3-4 anni di età e ad un peso > 3kg, si riproduce in primavera-estate quando la temperatura dell'acqua è > 20°C.

La temperatura condiziona la vita del siluro. Al di sotto degli 8-9 °C, infatti, il siluro è praticamente in letargo, si muove pochissimo, quasi non si alimenta e consuma il

grasso accumulato nella bella stagione. Da 10 a 15 °C iniziano i primi movimenti mentre da 18 a 25-30°C i siluri cacciano, crescono e si alimentano abbondantemente. Predilige acque tranquille, poco profonde a fondale molle con presenza di ricca vegetazione, dove tende a rimanere immobile sul fondo affondato nel fango ([www.acqueinterne.it/schede\\_pesci/pesce\\_siluro.htm](http://www.acqueinterne.it/schede_pesci/pesce_siluro.htm)).

Si tratta quindi di un pesce di fondo con abitudini e comportamento diversi da altri tipi di pesci. Non ama la luce, di giorno rimane rintanato nel fango e per questo ha la vista poco sviluppata, come già ricordato in precedenza, mentre ha una forte capacità sensoriale localizzata nei lunghi baffi che funzionano come un radar permettendogli di capire cosa sta succedendo intorno a lui anche nel buio più assoluto. Per lo stesso motivo caccia di notte, dal tramonto all'alba, nei cambi di luce e nelle ore più buie. In queste condizioni prede con vista molto sviluppata ma con scarsa capacità sensoriale finiscono nella sua bocca senza quasi accorgersene.

Il siluro è prevalentemente ittiofago anche se il termine più esatto dovrebbe essere carnivoro, in quanto la dieta di questo animale è molto varia, anche in base alla loro dimensione. Durante la fase giovanile si nutre normalmente di invertebrati di fondale, gli adulti si alimentano, invece, di pesci quali anguille e ciprinidi mentre esemplari di maggiori dimensioni si nutrono anche di rane, ratti e uccelli selvatici.

## **7.2.MATERIALI E METODI**

### **7.2.1. Campionamento:**

In tre periodi diversi (inverno 2002 e 2003, primavera 2004) presso le Valli di Campotto e Bassarone (Foto 7.1- Fig. 7.1) (Fe) in un'area di 400 ha perennemente allagate e che costituiscono le casse di espansione di una rete di bonifica della pianura bolognese grazie alla collaborazione del Consorzio Bonifica Renana è stato possibile ottenere un totale di 43 animali.



Foto. 7.1- Valli di Campotto e Bassarone.

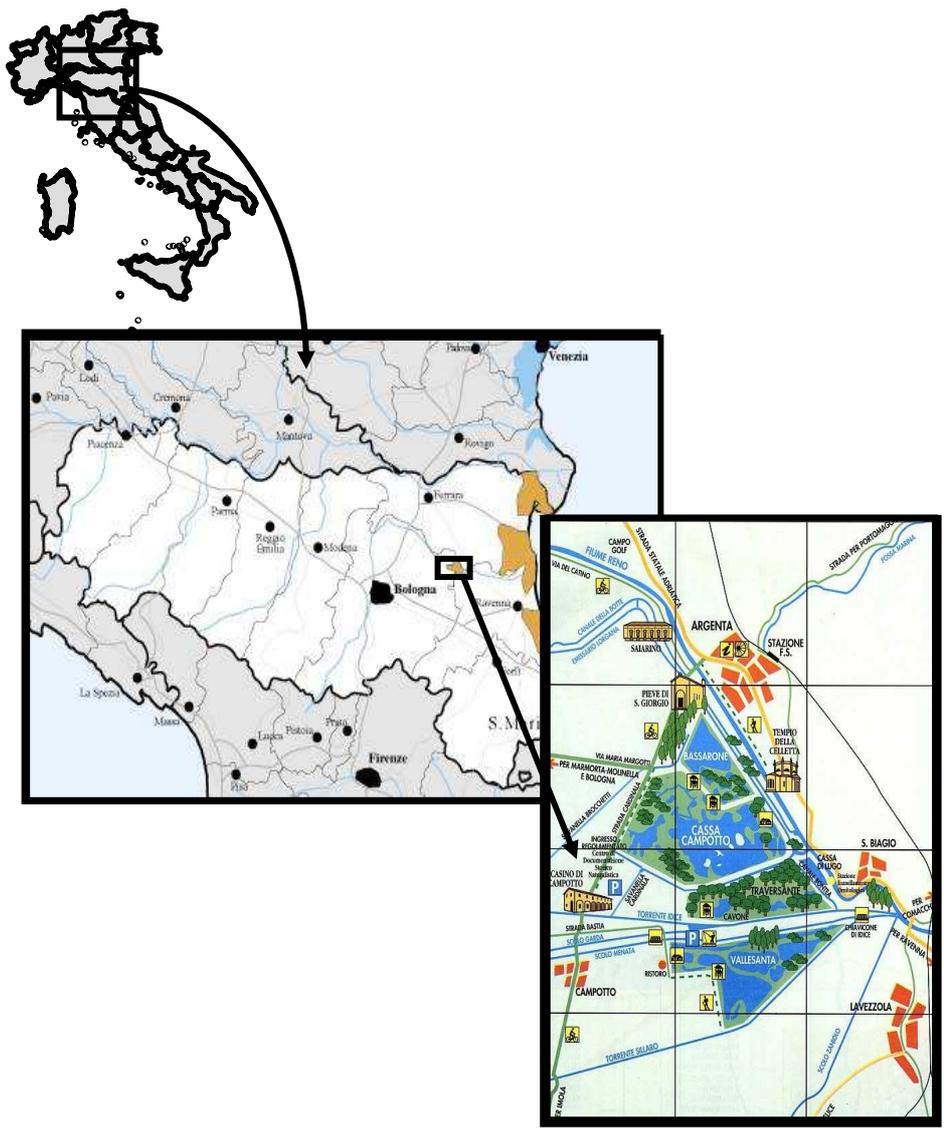


Fig.7.1- Localizzazione geografica dell'area oggetto di studio.

I campionamenti del 2003-2004 hanno previsto il prelievo di sangue dei soggetti pescati mentre da quelli catturati precedentemente si è proceduto al prelievo, in sede autoptica, di campioni di fegato ottenuti anche dagli ultimi soggetti pescati nella primavera del 2004.

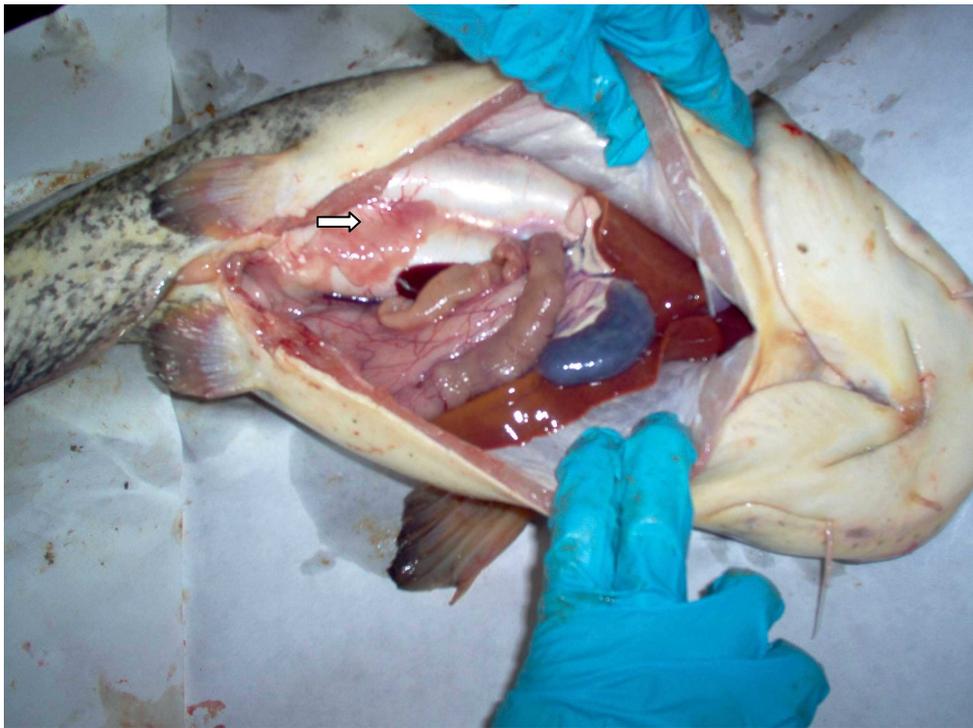
La pesca del siluro è stata realizzata con l'utilizzo di un elettrostorditore, immerso in acqua in punti di profondità medio-bassa.

Una volta trasportati a riva si è proceduto al riconoscimento del sesso in funzione della morfologia del poro genitale e al prelievo di sangue.

Il prelievo è stato eseguito con siringhe sterili lungo la linea laterale 2-5 cm prima della pinna caudale, i campioni ottenuti e raccolti in provette eparinizzate sono stati centrifugati (3000 g x min) per ottenere plasma.

Gli esami autoptici che hanno portato al prelievo di campioni di fegato sono stati eseguiti presso la facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna, dove i soggetti sono stati portati, anestetizzati con MS 222 e soppressi per decerebrazione (foto 7.2 & 7.3).

Campioni di sangue e fegato sono stati stoccati a  $-80^{\circ}\text{C}$  fino alle analisi.



**Fig. 7.2-** Aspetto degli organi interni di maschio. La freccia indica il testicolo

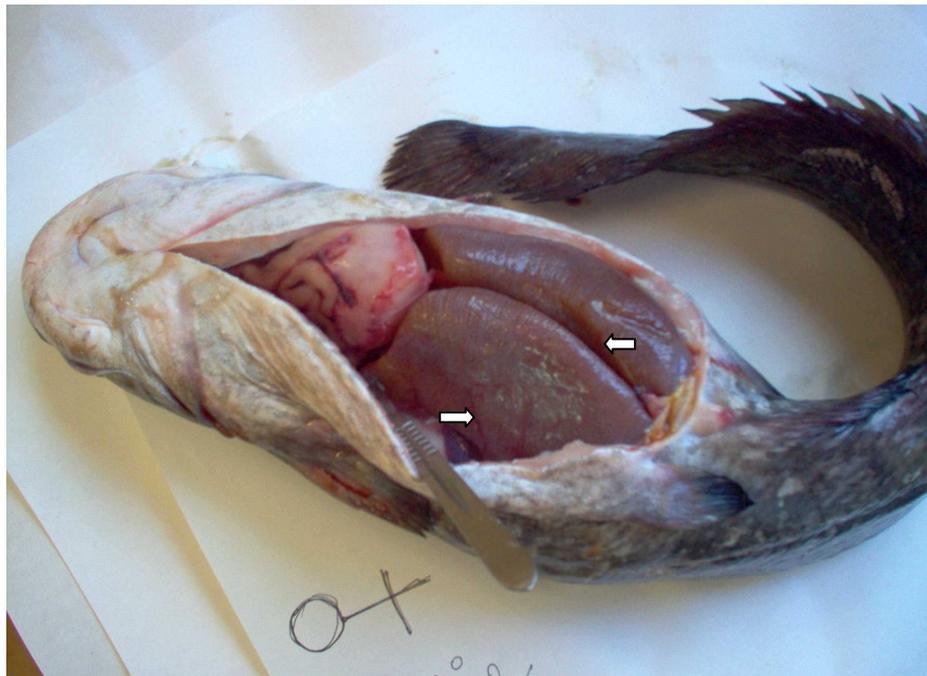


Foto. 7.3- Aspetto degli organi interni di femmina. Le frecce indica le uova

## 7.2.2 Modalità analitiche

### 7.2.2.1. Estrazione della VTG

Per l'estrazione della VTG si è applicata la metodica descritta da Palmer e Palmer (1993).

Nello specifico sono stati utilizzati 100mg di fegato o 100µl di plasma. Il fegato è stato omogenato con 1 ml di tampone tris HCl-EDTA 10mM a pH 6.8. L'omogenato è stato poi centrifugato a 800 x g per 15 min a 4°C e il surnatante ed il pellet sono stati separati e sottoposti alla medesima procedura estrattiva allo scopo di verificare dove fosse presente la VTG. A 100µl di surnatante o di pellet (risospeso in 1 ml di tampone tris HCl-EDTA) sono stati addizionati 400 µl di Na<sub>2</sub>EDTA 20 mM e di 32 µl di MgCl<sub>2</sub> 0.5 M e successivamente miscelati delicatamente. La sospensione così formata è stata centrifugata a 5600 x g per 15 min a 4°C, il surnatante è stato eliminato ed il pellet così ottenuto è stato ridissolto in 150µl di NaCl 1 M/ tris HCl 50 mM (pH 7.6).

Al campione sono stati aggiunti 500µl di acqua deionizzata e 100µl di acido tricloroacetico (TCA) al 10% e poi è stato vortexato e centrifugato a 5600 x g per 15-30 min a 4°C. Il surnatante è stato scaricato ed il pellet risospeso in una soluzione acqua deionizzata/glicerolo 0.1-0.2 % e successivamente sottoposto a quantificazione spettrofotometrica.

La stessa procedura estrattiva e di quantificazione è stata applicata alle aliquote di plasma (100 µl) partendo dallo step di aggiunta di Na<sub>2</sub>EDTA.

Tutti i campioni non utilizzati nell'immediato sono stati posti in freezer a -80°C sino all'analisi successiva.

### 7.2.2.2. Identificazione della VTG

L'identificazione della vitellogenina è stata eseguita utilizzando la metodica SDS-PAGE.

Tale metodica viene utilizzata nella determinazione delle masse molecolari relative delle proteine in quanto le separa in base al loro peso molecolare all'interno di un campo elettrico. Questo è possibile grazie all'attività del β-mercaptoetanolo che scinde eventuali ponti disolfuro presenti destabilizzando così la struttura terziaria e al Sodio-dodecil-solfato (SDS) che ha azione denaturante. L'SDS, avendo carica negativa e legandosi in un rapporto di uno ogni due amminoacidi, conferisce una carica netta negativa anche alle proteine. Questa viene sfruttata poi nella corsa elettroforetica per determinare una migrazione lungo il gel dipendente solamente dalle masse molecolari e non dalle singole cariche che le differenti proteine possono presentare.

I campioni sono stati diluiti in un rapporto di 1:2 in Laemmly Sample buffer e addizionati con  $\beta$ -mercaptoetanolo (5% del volume totale) e successivamente bolliti 5 min, immediatamente prima di essere caricati nel gel, per permettere la completa denaturazione proteica.

La cella utilizzata è del tipo BIO-RAD modello Mini Protean II a corsa verticale ed il quantitativo di campione caricato è risultato variabile tra i 10  $\mu$ l e 30  $\mu$ l per singolo pozzetto, in funzione delle diverse concentrazioni presenti nei singoli campioni. La corsa è stata seguita visivamente grazie al colorante tracciante ionizzabile Blu di Bromofenolo presente nel Laemmly Sample buffer.

Il gel di corsa è costituito da due componenti: lo “stacking gel” (4% bis-acrilammide) dell’altezza di circa 1 cm avente funzione di impaccare le componenti proteiche (isotacofresi) in una sottile banda al limite del gel di separazione, in modo da permettere un inizio sincrono della migrazione proteica, e dal “running gel” (12% bis-acrilammide) ove si verifica la discriminazione proteica sulla base dei relativi pesi molecolari.

Il tampone di corsa utilizzato è stato Tris-Glicina-SDS, pH 8.8 (BIO-RAD, cod. 161-0732) e la corsa è stata condotta ad amperaggi costanti di 30 mA e 70 mA per lo stacking gel e il running gel rispettivamente con una durata complessiva di circa 50 min. Finita la corsa il gel è stato rimosso e posto a fissare in colorante Coomassie<sup>®</sup> G250 (Bio-Safe<sup>™</sup> Coomassie, cod. 161-0786) per tempo 90 minuti e successivamente decolorato in acqua deionizzata per 20-30 minuti in agitazione. Nello stesso gel sono stati caricati anche standard purificati di vitellogenina di carpa (110 ng) (Biosense) e un marker per pesi molecolari al fine di poter discriminare la banda della fosfolipoproteina da noi purificata.

### *7.2.2.3. Quantificazione della VTG*

Una volta accertato che i campioni contenevano vitellogenina e determinato il suo peso molecolare, lo step successivo è stato quello di quantificarne il contenuto nei singoli campioni.

La quantificazione è stata svolta attraverso una lettura spettrofotometrica con spettrofotometro Beckman DU<sup>®</sup> 640 tarando lo strumento con quantitativi proteici noti al fine di poter estrapolare una curva di calibrazione attendibile.

La curva di calibrazione è stata eseguita in doppio utilizzando diluizioni seriali di una soluzione di Sieroalbumina bovina (Standard II BSA, BIORAD, cod. 500-0007) in acqua deionizzata (0,2-0,4-0,6-0,8-1-1,2-1,4-1,6-1,8-2 mg/ml) e nello stesso buffer di omogeneizzazione dei campioni, al fine di poter discriminare il background di fondo dovuto al buffer e poterlo così eliminare dalla lettura finale.

Per la determinazione proteica si è utilizzata la metodica colorimetrica Lowry (BIO-RAD) seguendo il protocollo base.

In provette sterili da 10ml sono stati caricati i campioni, la curva e il bianco (buffer di estrazione) in un volume di 100µl per ciascuno in provette separate.

Ad ogni provetta sono stati successivamente aggiunti 500µl di reagente A', (soluzione al 2% di reagente S in reagente A. BIO-RAD, COD. 500-0115, cod. 500-0113) ed ognuna è stata vortexata brevemente.

Successivamente sono stati aggiunti a ciascun campione, alla curva ed al bianco 4ml di reagente B (BIO-RAD, cod. 500-0114).

Dopo essere state vortexate tutte le provette sono poi state lasciate riposare per circa 15min. per permettere alla reazione colorimetrica di stabilizzarsi. Si è provveduto poi alla lettura del bianco, della curva e di tutti i campioni ad una lunghezza d'onda di 750nm, lunghezza d'onda alla quale le proteine presentano la massima assorbanza.

### **7.3. RISULTATI E DISCUSSIONE**

Il campionamento eseguito nel periodo 2002-2004 ha consentito di ottenere 26 campioni di plasma e 21 di fegato, che sono riportati in tabella 1 suddivisi in funzione del sesso degli animali e dell'anno di campionamento. Si ricorda che il sessaggio degli animali è stato effettuato sia in base ai risultati delle necroscopie (esemplari degli anni 2002 e 2004) che dell'esame del poro genitale esterno (esemplari degli anni 2003).

<b>Anno</b>	<b>Plasma</b>		<b>Fegato</b>	
	<b>Maschi</b>	<b>Femmine</b>	<b>Maschi</b>	<b>Femmine</b>
<b>2002</b>	/	/	12	4
<b>2003</b>	11	10	/	/
<b>2004</b>	2	3	2	3
<b>TOTALE</b>	13	13	14	7
	26		21	

tab. 7.1- **Composizione per sesso del campione utilizzato, distinto per anno di campionamento.**

### 7.3.1. Valutazione dell'efficacia della metodica UTILIZZATA

La metodica estrattiva utilizzata si è rivelata estremamente pratica, in quanto consente di lavorare contemporaneamente un ampio numero di campioni, riducendo conseguentemente tempi e costi dell'analisi.

L'analisi in parallelo del surnatante e del pellet ottenuti dall'omogenato epatico (effettuata per verificare in quale delle due matrici si trovasse la VTG) ha individuato la presenza di proteina nella frazione liquida.

La conferma dell'identità della proteina isolata, effettuata con SDS-PAGE, ha consentito di isolare una chiara banda, pari a 150 kDa, in corrispondenza dello standard di VTG di carpa, e questo sia da estratti di plasma che di tessuto epatico; il dato sembra testimoniare come la metodica sia ugualmente efficace nei due tessuti (fig. 7.1). In ogni caso la mancanza di un anticorpo specifico per la VTG di siluro ha impedito di effettuare una verifica dell'identificazione con metodica immunologica. Un passo ulteriore nella messa a punto della metodica è la verifica della cross-reattività di anticorpi esistenti per specie affini, quali pesce gatto, e non (carpa, trota, medaka), al fine di poter successivamente utilizzare l'anticorpo che presenta maggior affinità per il nostro purificato nei test immunologici di conferma.

Una volta verificata l'efficacia estrattiva della metodica applicata, si è proceduto a validare la stessa; i valori ottenuti per i principali parametri valutati, e più esattamente limite di sensibilità (LOD), percentuale di recupero (%) e coefficiente di variazione (CV), sono riportati in tabella 7.2.

La percentuale di recupero è stata stimata aggiungendo varie concentrazioni (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1 µg/ml) di VTG di carpa a plasma di maschi NON vitellogenici o con livelli estremamente bassi di proteina, ed applicando quindi la metodica estrattiva. Il CV è invece stato valutato effettuando prove di estrazione ripetute (n=3) di standard di VTG di carpa a concentrazioni diverse.

<b>Parametro</b>	<b>Valore</b>
<b>LOD (mg/ml)</b>	0.01

<b>%</b>	95-105
<b>CV</b>	< 10%

Tab. 7.2- **Principali parametri considerati nella validazione della metodica applicata.**

L'uso di VTG di carpa sia nelle prove di identificazione della proteina che nella validazione della metodica si è reso necessario in quanto manca al momento uno standard specifico per il siluro. Il controllo dei dati esistenti in bibliografia ha però evidenziato come le variazioni in peso molecolare delle varie vitellogenine di pesce siano estremamente ridotte e come quindi l'uso di VTG non di *S. glanis* per questo tipo di verifiche non falsi in maniera particolare il risultato delle stesse.

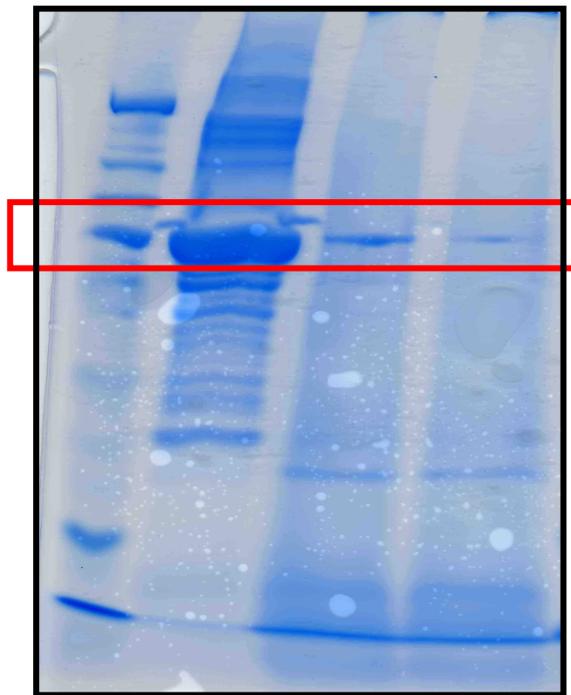
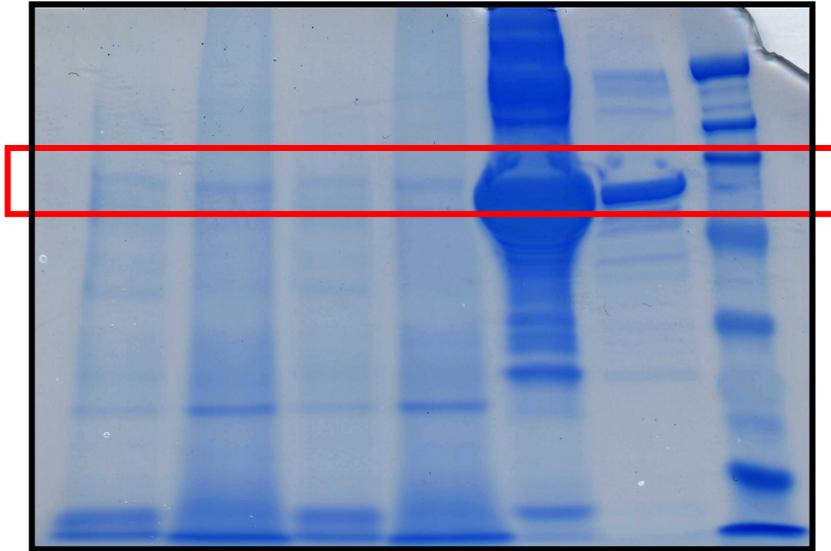


Fig. 7.1- SDS-PAGE in plasma (a) e fegato (b) di siluro. m.w.: pesi molecolari; standard VTG: vitellogenina di carpa ; M: plasma o fegato da soggetti maschi; F: plasma da soggetto femmina.

### 7.3.2. Valutazione dei livelli di vitellogenina nei campioni di *Silurus glanis*

Dopo aver validato la metodica si è passati alla sua applicazione in campo, andando a quantificare i livelli di VTG nel plasma e nei fegati di *Silurus glanis* catturati nelle valli interne di Campotto e Bassarone (FE).

Le concentrazioni rilevate, espresse in mg/ml, sono riportate per ogni singolo soggetto, nelle tabelle 7.3-7.5 (nelle quali viene riportato anche il valore medio  $\pm$  d.s. in funzione del sesso) e nelle figure 7.2-7.4.

Anno	Soggetto	Fegato	
		M	F
2002	1		0.664
	2		1.934
	3		1.253
	4		2.571
	5	1.691	
	6	1.217	
	7	1.747	
	8	0.684	
	9	1.056	
	10	2.956	
	11	2.074	
	12	2.840	
	13	2.791	
	14	3.662	
	15	3.747	
	16	2.946	
<b>Media <math>\pm</math> d.s.</b>		2.284 $\pm$ 1.017	1.606 $\pm$ 0.827

Tab. 7.3- Livelli di VTG (mg/ml) nei fegati dei soggetti campionati nell'anno 2002.

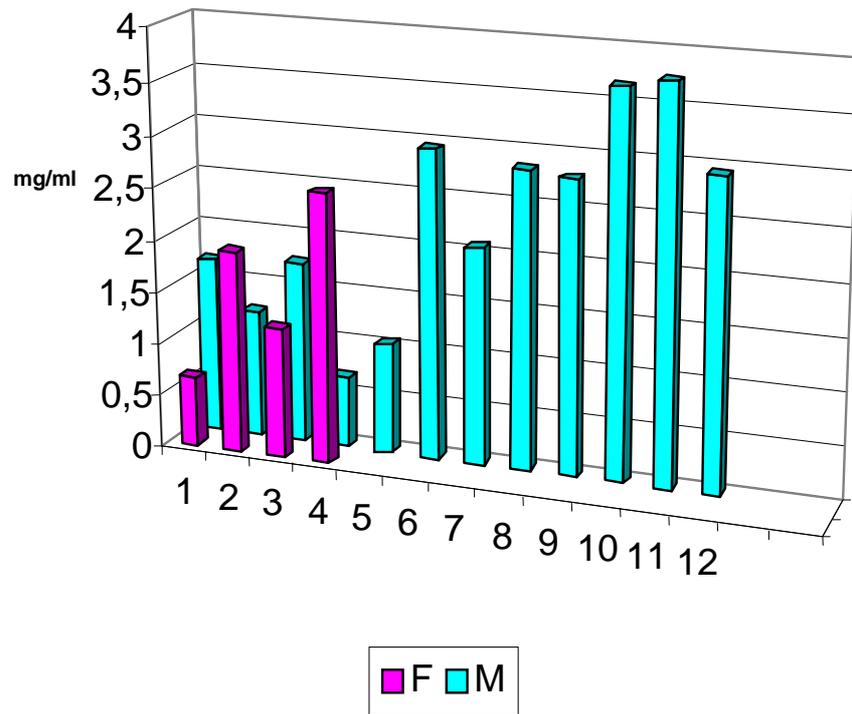


Fig. 7.2- Livelli di VTG (mg/ml) nei fegati dei soggetti campionati nell'anno 2002.

Anno	Soggetto	Plasma		
		M	F	
2003	17	6.199		
	18	n.d.		
	19	n.d.		
	20	3.917		
	21	2.686		
	22	0.988		
	23	0.859		
	24	3.340		
	25	2.024		
	26	1.167		
	27	2.999		
	28			21.717
	29			8.136
	30			8.299
	31			8.644
	32			7.208
	33			6.565
	34			44.718
	35			10.695
	36			7.954
	37			13.798
	<b>Media ± d.s.</b>		2.198 ± 1.875	13.773 ± 11.772

Tab. 7.4- Livelli di VTG (mg/ml) nel plasma dei soggetti campionati nell'anno 2003; n.d.: non rilevato.

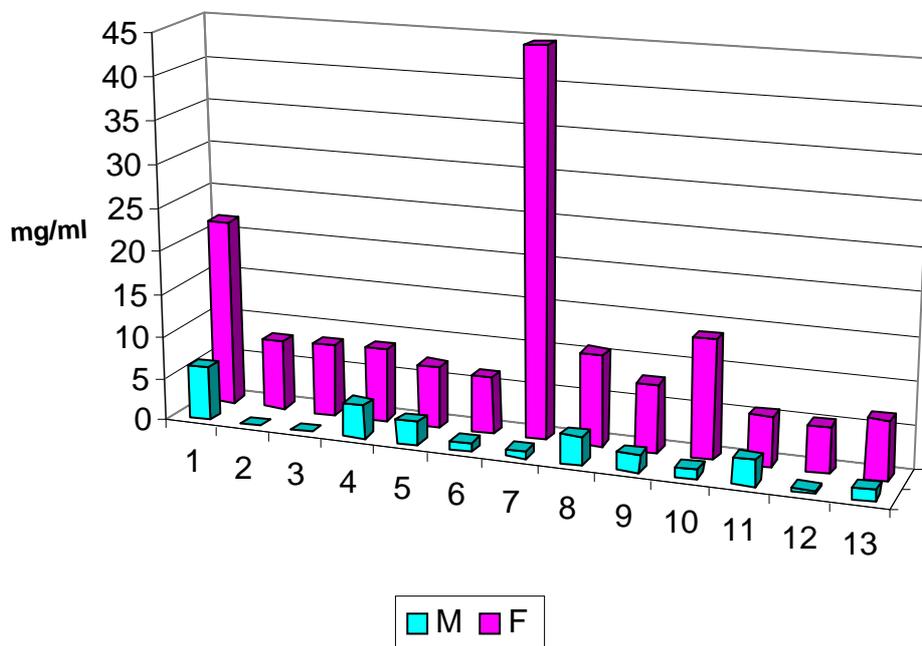


Fig. 7.3- Livelli di VTG (mg/ml) nel plasma dei soggetti campionati nell'anno 2003.

Anno	Soggetto	Plasma		Fegato	
		M	F	M	F
2004	38	0.349		0.485	
	39	1.306		0.255	
	40		5.806		0.848
	41		5.342		0.128
	42		6.855		0.529
<b>Media <math>\pm</math> d.s.</b>		0.828 $\pm$ 0.676	6.001 $\pm$ 0.775	0.370 $\pm$ 0.163	0.501 $\pm$ 0.361

Tab. 7.5- Livelli di VTG (mg/ml) nel plasma e nei fegati dei soggetti campionati nell'anno 2004.

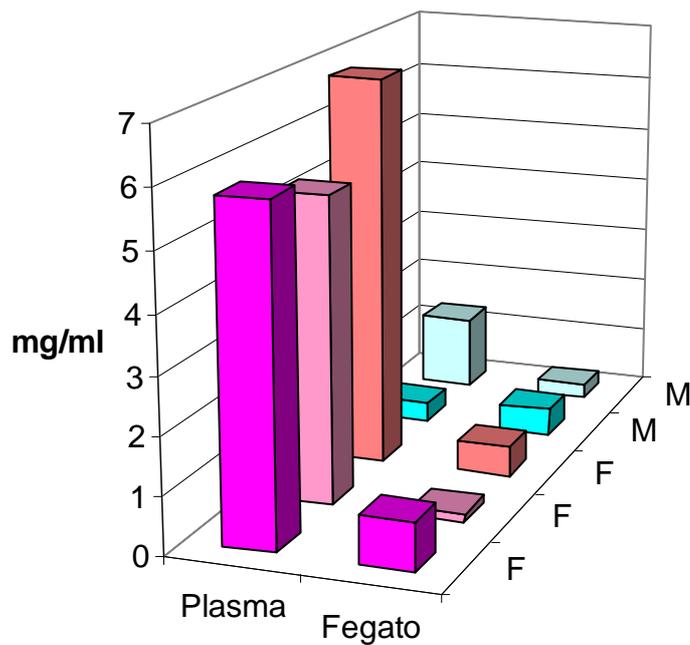


Fig. 7.4- Livelli di VTG (mg/ml) nel plasma e nei fegati dei soggetti campionati nell'anno 2004.

Dall'analisi dei dati conseguiti emerge innanzitutto come la VTG sia rilevabile in tutti i campioni analizzati, ad eccezione di 2 campioni di plasma della campagna 2003.

Nel **fegato** dei maschi si riscontrano concentrazioni di proteina analoghe a quelle delle femmine e non è dato rilevare alcuna differenza statisticamente significativa in funzione del sesso ( $p > 0.05$ ).

Questo dato è abbastanza interessante in quanto la maggior parte degli studi disponibili sono imperniati sulla ricerca degli mRNA della vitellogenina ed evidenziano una presenza di messaggero anche nel tessuto epatico dei maschi (Denslow et al., 2000; Hemmer et al., 2002; Okumura et al., 2002; Riley et al., 2002; ; Yadetie e Male, 2002; Garcia Reyero et al., 2004; Robinson et al., 2004; Scholz et al., 2004). Questi lavori sembrano quindi confermare un'avvenuta codifica della proteina in entrambi i sessi, ma non forniscono ulteriori informazioni relativamente al destino del messaggero e dell'eventuale fosfolipoproteina prodotta nel maschio.

Al momento gli unici studi relativi alla presenza di VTG a livello epatico in specie ittiche sono quelli di Foran *et al.* (2000) e di De Metrio *et al.* (2003).

I nostri dati risultano in accordo, per quanto riguarda l'andamento dei tenori di VTG nelle femmine e nei maschi, con quelli riportati da Foran *et al.* (2000), i quali riferiscono della presenza di VTG, espressa come densità ottica, non solo in medaka esposti a nonilfenolo ma anche nei soggetti di controllo (maschi e femmine). Il dato da noi riportato, anche nell'ottica delle considerazioni precedentemente fatte relativamente alla specificità della metodica, necessita comunque di ulteriori approfondimenti di carattere immunologico, per accertare che l'estrazione sia ugualmente efficace nel fegato e nel plasma.

De Metrio *et al.* (2003) invece riportano della presenza di cellule contenenti vitellogenina in maschi adulti e in immaturi di pesce spada (*Xiphias gladius* L.) provenienti dal Mediterraneo. Gli Autori però si limitano a rilevarne la presenza con metodiche immunoistochimiche, senza cercare di quantificare la proteina o di definirne il destino nell'organismo. I loro dati non sono quindi comparabili con quanto riportato nel presente studio, in quanto non viene in alcun modo quantificata la proteina.

In funzione di quanto sopra illustrato, il presente studio suggerisce quindi l'opportunità di effettuare ulteriori analisi ed indagini al fine di chiarire meglio il ruolo e il target metabolico della VTG nel fegato dei maschi delle specie ittiche.

A livello **plasmatico** si rileva invece una netta differenza nei contenuti di VTG tra maschi e femmine.

I livelli di VTG plasmatica sono stati significativamente maggiori ( $p << 0.01$ ) nelle femmine rispetto ai maschi (fig. 7.3-7.4) e vi è un buon accordo tra la determinazione del sesso effettuata al momento della cattura e quella rilevata durante l'autopsia; la quantificazione della VTG e potrebbe quindi essere utilizzata per identificare con

maggior precisione il sesso di quei soggetti che, ancora immaturi, non presentano chiari caratteri sessuali secondari e/ un mancato sviluppo delle gonadi. Va però rilevato che nel corso del monitoraggio sono stati riscontrati alcuni soggetti maschi che presentavano livelli di VTG plasmatica comparabili a quelli delle femmine (fig. 7.3). Il dato è in accordo con quanto già precedentemente rilevato da Zaccaroni *et al.* (2003) nella stessa area, i quali reperiscono in 2 maschi di *Cyprinus carpio* su 10 campionati, concentrazioni di vitellogenina analoghe a quelle delle femmine, avanzando quindi l'ipotesi di possibili effetti di alteratori endocrini nella fauna ittica dell'area di Campotto. La percentuale di maschi con vitellogenina a livelli analoghi alle femmine in *S. glanis* è sovrapponibile a quella di Zaccaroni *et al.* (2003), consentendo quindi di confermare l'ipotesi degli Autori. Questo anche alla luce del fatto che i livelli di VTG riscontrati nei maschi di *S. glanis* sono molto simili a quelli riportati da Nath e Maitra (2001) in femmine in fase di preovulazione di pesce gatto (*Clarias batrachus*) e da Tilton *et al.* (2001) in maschi di *Ictalurus punctatus* indotti con estriolo. Gli Autori riscontrano infatti concentrazioni di VTG pari a circa 1-2 mg/ml, che sono perfettamente sovrapponibili a quanto riscontrato nel presente studio per i maschi (tab. 7.4 e fig. 7.3). Le concentrazioni rilevate in *S. glanis* sono inoltre superiori a quanto riportato da Chatterjee *et al.* (2001) per femmine di *Heteropneustes fossilis* in preovulazione e da Nimrod e Benson (1996) in *Ictalurus punctatus*.

Il raffronto dei dati ottenuti nel presente studio, non solo con quanto riscontrato per le specie più affini a *S. glanis* vale a dire il pesce gatto, ma anche con altre specie ampiamente utilizzate come bio-indicatori per la presenza di IE in ambienti con forte impatto antropico, sembra confermare quanto precedentemente affermato e cioè che possa esservi il rischio di un effetto di disendocrinia nell'area di Campotto.

Da una prima analisi di questi dati risulta evidente come vi sia un'estrema disparità nei livelli "basali" di VTG in funzione della specie considerata, tanto che le concentrazioni riportate variano da <LOD in lampreda e in *Microproteus dolomieu* (Mewes *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 2003) a 317 ng/ml in carpa (Gimeno *et al.*, 1998a; Solè *et al.*, 2000; Solè *et al.*, 2002). Risulta quindi evidente come sia estremamente difficile stabilire un valore soglia oltre il quale si possa parlare di chiaro effetto di disendocrinia, specialmente quando si considerano specie poco o per nulla conosciute da questo punto di vista, quale *S. glanis*.

La somministrazione a carpe maschio adulte di 17 $\alpha$ -etinilestradiolo (EE<sub>2</sub>) per via intraperitoneale alla dose di 500  $\mu$ g/kg, è in grado ad esempio di indurre un incremento pari a 90 volte i livelli medi di VTG dopo soli 8 giorni, portando le concentrazioni plasmatiche di questi soggetti trattati a livelli simili a quelli riscontrati nelle femmine utilizzate come controlli positivi (Solè *et al.*, 2000).

Gimeno *et al.*, (1998a) hanno esposto avannotti di carpa per 110 giorni a diverse concentrazioni di 4-*tert*-pentyl-fenolo (TPP) (36, 90 e 256 µg/l) riscontrando al termine della sperimentazione concentrazioni medie di VTG nei controlli di  $317 \pm 260$  ng/ml e di  $127300 \pm 95500$  ng/ml nei soggetti esposti. In questi stessi soggetti è stata evidente la trasformazione delle gonadi maschili in gonadi femminili, a testimonianza di un chiaro effetto di ED. Un'ulteriore conferma di quanto affermato viene da Gimeno *et al.* (1998b), che rilevano in maschi adulti sessualmente maturi esposti a TPP (100, 320 e 1000 µg/l) regressione testicolare, inibizione della spermatogenesi, atrofia dell'epitelio germinale, fibrosi ed aumenti dei livelli di VTG fino a valori comparabili a quelli riscontrati nelle femmine.

Risultati contrastanti sono invece quelli riportati da Casini *et al.* (2002) e da Villeneuve *et al.* (2002) relativamente alla risposta di carpe maschio al trattamento con 4-nonil-fenolo (4-NP). Nel primo caso infatti la somministrazione per via intraperitoneale di 1, 10 o 100 mg/kg di surfattante in olio di arachide induce un aumento (espresso in unità di assorbanza) dei livelli di VTG pari al 61% (a fronte di un aumento del 156% dopo esposizione a  $17\beta$ -estradiolo ( $E_2$ )). Al contrario, Villeneuve *et al.* (2002) non riscontrano variazioni significative sia nei livelli di VTG che risultano compresi tra valori inferiori al LOD (pari a 1 µg/ml) e 52 µg/ml, che in quelli di testosterone e di  $E_2$  plasmatici in animali trattati con 4-NP disciolto in acqua a concentrazioni variabili tra 0.1 e 10 µg/l.

E' presumibile che i risultati contrastanti osservati possano essere influenzati dalle diverse modalità di trattamento e dalla maggiore o minore durata dell'esposizione, fattori che possono comportare un accumulo diversificato di principio attivo nell'organismo, e quindi una diversa intensità d'effetti.

Christiansen *et al.* (1998), lavorando sulla trota arcobaleno (*Oncorhynchus mykiss*), osservano un incremento dei livelli di VTG plasmatica pari a 300 volte i livelli basali a seguito di iniezione per via intraperitoneale di NP e bisfenolo A, e pari a 10000-100000 volte per somministrazione per la stessa via di DES,  $EE_2$  e  $E_2$ .

Nella stessa specie, Schwaiger *et al.* (2002), in uno studio trans-generazionale su due generazioni, riscontrano un incremento nei livelli di VTG (fino a  $309.6 \pm 103.6$  ng/ml, pari a circa 10 volte il livello basale) nella sola generazione parentale ( $F_0$ ) esposta a NP (1 e 10 µg/l), mentre nei maschi della generazione  $F_1$  non si rileva induzione della sintesi della VTG, le cui concentrazioni medie risultano pari a quelle dei controlli della  $F_0$ . Il dato pare quindi confermare quanto rilevato da Casini *et al.* (2002) mentre è in contrasto con i risultati di Villeneuve *et al.* (2002) anche se i lavori citati sono effettuati su una specie diversa che potrebbe quindi presentare una diversa sensibilità al NP.

Mewes *et al.*, (2002), somministrando per via intraperitoneale E<sub>2</sub> a lamprede maschio (una prima iniezione di 100 µg E<sub>2</sub> seguita da una seconda, 7 giorni dopo, di 500 µg), rilevano un incremento notevole (fino ad un massimo di 3566 µg/ml di plasma) nei livelli di VTG nei soggetti trattati, quando invece negli stessi animali prima del trattamento non era dato riscontrare la presenza della proteina.

Infine Monteverdi e Di Giulio (1999) espongono colture cellulari di epatociti di pesce gatto a varie sostanze a potenziale azione di ED (4-*tert*-octilfenolo (OP), NP, o,p'-DDT, benzo(a)pirene (BaP), effluenti di cartiera, stigmastanolo), utilizzando quali controllo positivo il DES. Gli autori inoltre utilizzano il tamoxifen quale antiestrogenico, al fine di valutarne l'effetto inibente sulla sintesi di VTG comparandolo con quello di altri composti ad azione simile. Dei composti saggiati, OP, o,p'-DDT e in misura minore il NP si sono rivelati IE, mentre il BaP, gli effluenti di cartiera e lo stigmastanolo non hanno mostrato né un'azione estrogeno-mimante né una antiestrogenica.

**8.STUDIO DELLA VITELLOGENINA IN ESEMPLARI  
DI TARTARUGA MARINA (*Caretta caretta*)**



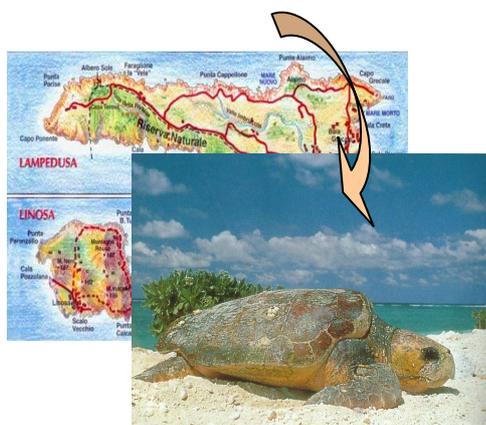
## 8.1. MATERIALI E METODI

### 8.1.1. Campionamento

Nei mesi di agosto, settembre e ottobre del 2004 e agosto-settembre 2005 sono stati ottenuti secondo le procedure descritte nel capitolo 7 aliquote di plasma di tartaruga marina (fig 8.1), per un totale di 36 campioni, mantenute a - 20 fino al momento delle analisi.



Fig.8.1



### 8.1.2. Modalità analitiche

Le aliquote di plasma sono state sottoposte ad analisi per la estrazione, l'identificazione e la quantificazione della vitellogenina secondo la metodologia descritta nel capitolo precedente

## 8.2. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il campionamento eseguito presso il Centro Recupero Tartarughe marine di Lamapedusa ha permesso l'ottenimento di 36 campioni (tab. 8.1); solo per un esemplare (M7, maschio) è stato possibile determinare il sesso in quanto tutti gli altri esemplari presentavano una lunghezza di carapace inferiore a 75 cm, limite definito da Casale et al nel 2005 per la determinazione sicura del sesso.

Tab.8.1: tabella riassuntiva dei campioni e rispettivi dati biometrici

<b>CAMPIONE</b>	<b>LUNG.CARAPACE (cm)</b>	<b>LARG.CARAPACE (cm)</b>
<b>M 1</b>	49,6	43
<b>M 2</b>	51	48,10
<b>M 3</b>	55	51
<b>M 4</b>	60	58
<b>M5</b>	69,20	66
<b>M 6</b>	43,6	41
<b>M 7</b>	76	66
<b>M 8</b>	65	62
<b>M 9</b>	43	41,60
<b>M 10</b>	61	56
<b>M 11</b>	72	65
<b>M 12</b>	40,50	39,60
<b>M 13</b>	59	56,20
<b>M 14</b>	32	29,50
<b>M 15</b>	43	41
<b>M 16</b>	57,20	55,80
<b>M 17</b>	59	54
<b>M 18</b>	45,90	42
<b>M 19</b>	56,10	53
<b>M 20</b>	51	46

**Tab.8.1: (continua) tabella riassuntiva dei campioni e rispettivi dati biometrici**

<b>CAMPIONE</b>	<b>LUNG.CARAPACE (cm)</b>	<b>LARG.CARAPACE (cm)</b>
<b>M 21</b>	46	44,50
<b>M 22</b>	37,20	35,10
<b>M 23</b>	42,10	41
<b>M 24</b>	50	46
<b>M 25</b>	47	43
<b>M 26</b>	49,10	44,50
<b>M 27</b>	54	50
<b>M 28</b>	62	56,50
<b>M 29</b>	54	51
<b>M 30</b>	50	44,60
<b>M 31</b>	48,20	46,30
<b>M 32</b>	50	44,70
<b>M 33</b>	36	34
<b>M 34</b>	47	44,20
<b>M 35</b>	48	44
<b>M 36</b>	47	43,10

In figura 8.2. sono riportati i livelli di VTG stimati per ciascun animale relazionati anche al valore soglia di 1 mg/ml definito da Tada et al (2004) in *Chrinemys reversii* quale valore discriminante tra i due sessi. Sebbene tale soglia sia stata determinata in una specie di acqua dolce, l'osservazione di una certa omogeneità di risposta a seguito di induzione con 17 $\beta$ -estradiolo o esposizione a interferenti endocrini ambientali sia in soggetti immaturi che in maschi di varie specie di tartarughe, sia d'acqua dolce che marine, ha portato a ritenere che tale limite potesse essere valido anche per *Caretta caretta* in attesa di ottenere un numero significativo di dati relativi a soggetti di tale specie di sesso certo (Shelby e Mendoca, 2001; Iwin et al., 2001; Selcer e Palmer, 1994; Duggan et al., 2001; Heck et al., 1997; Herbst et al., 2003).

Comparando i dati riportati in tabella 8.1 con i valori di Vtg indicati nella figura 8.2 è possibile notare come a valori elevati di proteina corrispondano soggetti di grosse dimensioni facendoci ritenere che la maggior parte dei soggetti campionati siano femmine e come il soggetto 7 (maschio) presenti livelli di Vtg inferiori alla soglia definita apparentemente confermandone la validità. Solo la valutazione di altri soggetti di sesso certo, come già accennato, permetterà di confermare la validità di tale soglia.

L'elevato numero di femmine "apparenti" potrebbe essere relazionato al fatto che Lampedusa è zona di riproduzione ed è quindi maggiormente probabile ritrovare femmine adulte o vicino alla maturità.

La figura 8.3. riporta la corsa elettroforetica effettuata per alcuni dei campioni testati. Come si può notare tale corsa avvalorata quanto detto sopra in quanto nel caso del campione 7, maschio, non è rilevabile presenza di Vtg, come dovrebbe essere considerando il ruolo fisiologico della proteina.

La corsa elettroforetica ha permesso di isolare una banda di circa 200 kDa riferibili a Vtg ma anche in questo caso, come per il siluro, la mancanza fino ad ora di un anticorpo specifico per le tartarughe marine non ha permesso di utilizzare le normali tecniche immunologiche che potrebbero avvalorare questi risultati.

I risultati ottenuti, inoltre, ci permettono di dire che al momento non ci sono nelle tartarughe marine (*Caretta caretta*) effetti di una esposizione ad interferenti endocrini.

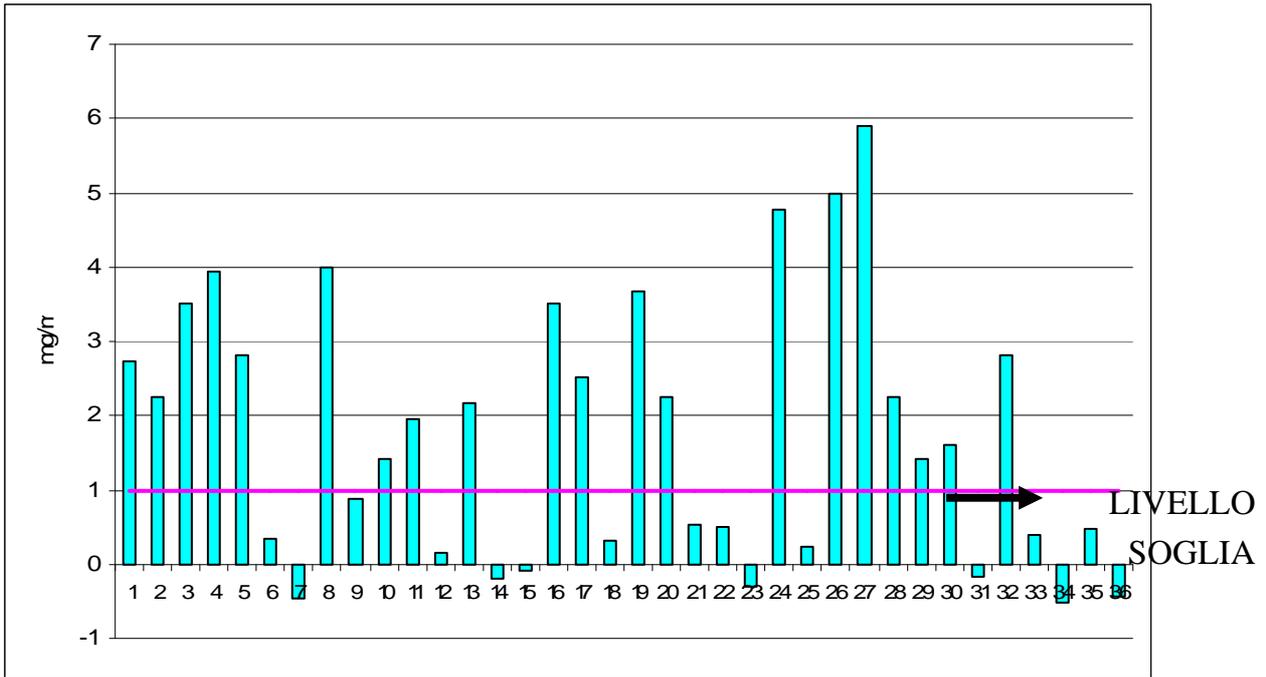


Fig.8.2: grafico dei valori stimati per ogni animale esaminato

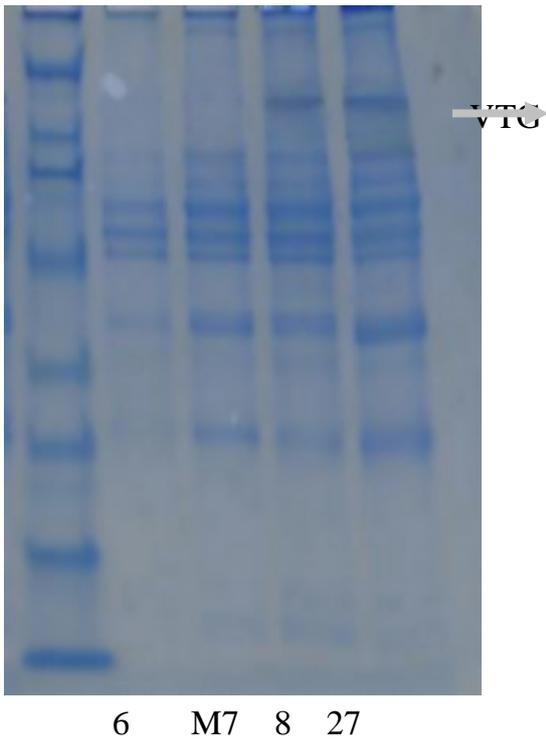
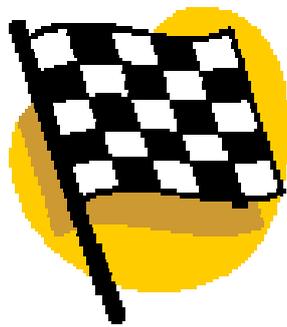


Fig.8.3.:corsa elettroforetica in gel

## 9. CONCLUSIONI



Quello che emerge dagli studi effettuati è innanzitutto come le aree monitorate relativamente alla contaminazione da metalli pesanti risultino poco contaminate da questi elementi.

Nel caso dei cinghiali, infatti, i livelli riscontrati sono comparabili a quelli reperiti nelle zone più pulite dell'Europa dell'est, risultando quelle dell'Europa occidentale maggiormente contaminate, evidentemente in ragione della superiore densità di stabilimenti industriali.

Considerando le caratteristiche ambientali delle zone studiate, i risultati ottenuti confermano come il cinghiale si dimostri una valida specie biomonitor. Infatti, vista la propensione del suide ad assumere le più disparate sostanze dall'ambiente e data la sua natura onnivora, questa specie selvatica può essere esposta a numerose fonti di contaminazione, rispecchiando i livelli di inquinanti depositati massicciamente nelle biocenosi.

In modo analogo il cinghiale dimostra di aver ben adattato il suo organismo agli effetti tossici provocati dalle esposizioni croniche ai metalli pesanti, come risulta dal rinvenimento di alterazioni morfologiche significative assolutamente aspecifiche negli animali del presente studio.

Quando si considerino le osservazioni effettuate su tessuti prelevati da esemplari di *Caretta caretta* spiaggiati, le concentrazioni reperate in tutti i soggetti sono infatti inferiori alle soglie tossiche definite per i singoli metalli e per l'arsenico. A questa osservazione si affianca il dato reattivo agli aspetti anatomo-isto-patologiche, che non delineano lesioni particolarmente gravi o patognomoniche specifiche e riconducibili ai tossici.

Le lesioni riscontrate, sebbene di gravità da media ad elevata, possono essere ritenute conseguenza di assunzione, mediante l'alimentazione, di sostanze a basso potere tossico, in quanto la distribuzione dei vacuoli lipidici è uniforme in tutto il parenchima, a dimostrazione che le lesioni non presentano caratteristiche di acutezza.

Le lesioni infiammatorie riscontrate a livello di tutti gli organi e parenchimi indicano che possono essere numerose le cause che danno origine a stati patologici in grado, nei casi più gravi, di portare gli animali a morte. L'aver trovato in preparati citologici ed istologici colonie di batteri e uova di macroparassiti non indica un necessario rapporto causale. È molto più probabile che gli animali colpiti da più di una noxa si trovino in uno stato cachettico tale da non consentire loro normali funzioni riguardanti aspetti essenziali della vita, che potrebbero spiegare gli episodi di spiaggiamento.

In conclusione il monitoraggio eseguito su *Caretta caretta* dimostra che l'ambiente marino in cui questi animali vivono non presenta livello di inquinamento tali da

portare all'accumulo di metalli pesanti ed arsenico nei tessuti e che quindi le manifestazioni patologiche riscontrate sono da ascrivere a noxae di origine biologica. Analogamente la valutazione dei livelli di piombo nel sangue di tartaruga marina effettuata presso il Centro Recupero di Lampedusa porta a ritenere come non vi siano particolari pericoli originati dall'esposizione a livelli tossici di metalli pesanti, che non vengono quindi a costituire un grave rischio per la sopravvivenza della specie.

In questo caso, tuttavia, la mancanza di letteratura inerente all'argomento rende necessario l'approfondimento dello studio. Si ritiene quindi utile effettuare una comparazione tra i livelli di metallo in campioni ematici e in tessuti provenienti dallo stesso animale, nel caso di decesso presso il Centro Recupero di Lampedusa. Dato il basso grado di mortalità riscontrato presso il Centro, l'attuazione di tale ricerca, per altro già in corso, richiede comunque un periodo lungo per poter ottenere risultati significativi.

Lo studio effettuato relativamente alla reale tossicità dei pallini di piombo in contrapposizione alla presunta atossicità dell'acciaio ferroso in *Anas platyrhynchos* ha consentito di dimostrare come il piombo sia effettivamente in grado di causare un grave quadro sintomatologico con depressione da lieve a grave, diarrea e disidratazione, ipotermia, atassia, debolezza muscolare e *wing drop*. Nel nostro caso alcuni soggetti hanno manifestato un decorso particolarmente rapido con morte dell'animale entro la prima settimana. In contrapposizione l'acciaio ferroso non ha causato nessun dato clinico rilevabile durante l'intero periodo di sperimentazione (45 gg.). A livello ematologico risulta chiaro come la capacità del piombo di interferire sulla sintesi dell'emoglobina e sulla permeabilità della membrana eritrocitaria, possa causare un serio stato anemico con crollo improvviso dei parametri di HB ed ematocrito, non riscontrabile nei soggetti trattati con acciaio ferroso. Allo stesso modo l'aumento dell'attività emocateretica splenica e la stasi biliare rilevata a livello anatomico patologico causano un danno epatico, come confermato dai dati biochimici che delineano un aumento dei livelli di AST (imputabile in parte anche al danno muscolare), non presente nei gruppi di animali trattati con acciaio ferroso e nel gruppo di controllo. I dati tossicologici riferiti a sangue e tessuti rivelano come il piombo possa, in certi casi, raggiungere concentrazioni elevate depositandosi prima a livello epatico poi renale. I dati del piombo ematico dei gruppi A, B2 e B4 ci portano a credere che ci sia stata una contaminazione dell'acqua di lavaggio comune tramite le feci dei soggetti trattati con piombo, non sufficiente comunque a raggiungere tassi ematici tossici. Di non facile interpretazione risultano gli alti livelli muscolari di zinco e rame, probabilmente conseguenza di un aumento di metallotioneine indotte dal piombo stesso e non presenti nei gruppi trattati con acciaio ferroso e nel gruppo di

controllo. E' in ogni caso difficile poter disegnare un quadro completo del problema, poiché in natura esistono molte variabili in grado di modificarlo. E' importante quindi considerare che i dati ottenuti in questo lavoro, seppur simili a quanto riportato in letteratura, possono in alcuni casi discostarsi da questi per il diverso protocollo utilizzato. Il lavoro ha in ogni caso dimostrato la pericolosità dei pallini di piombo per gli Anatidi a differenza della "innocuità" dell'acciaio ferroso. Sarebbe quindi importante considerare l'eventualità di utilizzare queste leghe anche nei nostri distretti venatori al fine di non procurare sofferenze inutili ad animali che per abitudini etologiche sono coinvolti in questo problema.

Relativamente allo studio concernente gli effetti di interferenti endocrini in specie ovipare e sulla base di quanto illustrato e di quanto reperibile in letteratura, si può concludere che la metodica utilizzata sia da considerarsi un valido strumento per la determinazione della vitellogenina nel plasma di queste specie, mentre per quanto riguarda la sua applicazione al tessuto epatico (al momento nel solo *Silurus glanis*) appare necessario approfondire ulteriormente la sua specificità nel purificare la proteina, discriminandola in modo certo da tutte le altre proteine presenti a livello epatico.

In linea generale comunque si può affermare come la metodica utilizzata si sia dimostrata veloce, di semplice applicazione, economica e, almeno per il plasma, affidabile. Vista la sua "aspecificità", in quanto basata su processi di precipitazione, è potenzialmente applicabile a tutte quelle specie per le quali non esistono sistemi immunoenzimatici di rilevamento. Inoltre, tenendo sempre presenti le considerazioni fatte per quanto riguarda il tessuto epatico, è auspicabile che la stessa metodica sia applicabile a tessuti diversi dal plasma sempre con buoni risultati.

Alla luce dei risultati da noi ottenuti in *Silurus glanis* in prima istanza possiamo ipotizzare che problematiche relative agli IE possano sussistere nelle acque dolci interne oggetto di studio.

Valutando la percentuale di positività riscontrata nel campione di siluri di sesso maschile oggetto della nostra ricerca (12.5%), questa risulta essere simile a quanto riscontrato da Zaccaroni *et al.* (2003) nella stessa area e superiore a quella riscontrata in una ricerca effettuata in fiumi spagnoli da Solè *et al.* (2002) su carpe selvatiche catturate a monte dell'immissione nel corso d'acqua dei reflui di un impianto di depurazione urbano (5%). Il numero ridotto di campioni analizzati non ci consente comunque di giungere a conclusioni definitive, ma solo di poter affermare che, vista la provenienza delle acque raccolte in questo bacino, queste possano essere causa di fenomeni di IE nell'area di Campotto, a seguito di episodi di immissione accidentale di acque reflue inquinate, e che sarà comunque opportuno effettuare ulteriori ricerche

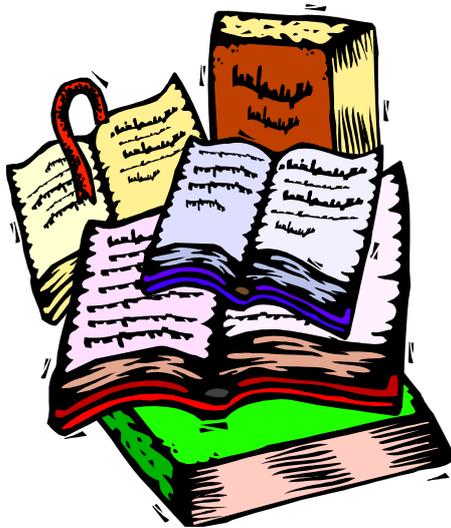
più approfondite non solo relative alla determinazione della Vtg, ma anche all'individuazione delle possibili cause delle variazioni della stessa.

Per quanto riguarda le valutazioni effettuate in *Caretta caretta*, non paiono sussistere fenomeni di interferenza endocrina negli esemplari monitorati. Considerando la determinazione non genetica del sesso, la valutazione dei livelli di Vtg in soggetti immaturi potrebbe rappresentare un valido strumento per discriminare i due sessi prima del raggiungimento della maturità sessuale, quando il dimorfismo sessuale diventa evidente.

Al momento attuale si sta programmando di verificare l'esistenza di cross-reattività tra anticorpi anti-Vtg di specie diverse ma affini. Tale studio è in via di attuazione, almeno per quanto riguarda le tartarughe marine, grazie alla collaborazione con il Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste (La Paz, México) che ha permesso di utilizzare un anticorpo anti-Vtg di *Chelonia mydas agasizii* (Sifuentes et al., 2006) per verificare l'esistenza di una sua eventuale cross-reattività nei confronti di Vtg di altre specie come la *Caretta caretta*, che porterebbe di conseguenza al miglioramento delle tecniche di monitoraggio degli effetti di interferenti endocrini, di cui la VTG rappresenta un ottimo biomarker, sulle tartarughe marine.

Da quanto descritto si può concludere come le specie considerate possano essere utilizzate in maniera efficace quali indicatori ambientali e come per altro la contaminazione degli ambienti studiati non raggiunga livelli preoccupanti sia per la sicurezza dell'ambiente che per quella delle specie che vi vivono e per l'uomo.

## 10.BIBLIOGRAFIA



- ❖ **Adams R.H.**, (1999). “*Farmacologia e terapeutica veterinaria*”. Edizione italiana a cura di C. Beretta, EMSI (Ed.), Roma, pp. 793-823.
- ❖ **Affronte M., Bortolotto A-** “*Dossier- Parenti Serpenti*” da CETACEA informa, anno VIII n .15, pag. 4-10
- ❖ **Aguilar R. & Pastor X:** (1995). “*Impact of Spanish Swordfish Longline fisheries on the loggerhead sea turtle *Caretta caretta* population in the Western Mediterranean*”. In: Richardson J.I & Richardson T.H. (Eds.), PROCEEDING OF THE 12<sup>TH</sup> ANNUAL WORK-SHOP ON SEA TURTLE BIOLOGY AND CONSERVATION. NOAA tech. Mem. NMFS-SEFSC-361 pp.1-6.
- ❖ **Akerman K.E.O., Honkaniemi J., Scott I.G., Andersson L.C.**, (1985) “*Interaction of  $Ca^{2+}$  with calmodulin activated ( $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ )-ATPase activity of human erythrocyte ghosts*”. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, **845**: 48
- ❖ **Alden C. L. e Frith C. H.**, (1991). *Urinary system*. In: HANDBOOK OF TOXICOLOGIC PATHOLOGY. W. M. Haschek e C. G. Rousseaux (eds.) Academic Press, San Diego, California, pp.334-344.
- ❖ **Alexander J., Mikalsen A., Ryberg D.**, (1986) “*Microsomal reduction of Cr VI*”. ACTA PHARMACOL. TOXICOL. (COPENH), **59**: 267
- ❖ **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
- ❖ **Anderson M.J., Cacela D., Beltman D., Teh S.J., Okihiro M.S., Hinton D.E., Denslow N., Zelikoff J.T.** (2003), “*Biochemical and toxicopathic biomarkers assessed in smallmouth bass recovered from a polychlorinated biphenyl-contaminated river*”, BIOMARKERS, **8 (5)**: 371-393.
- ❖ **Anderson R.A.**, (1986) “*Chromium metabolism and its role in disease processes in man*”. CLIN. PHYSIOL. BIOCHEM., **4**. 31
- ❖ **Anderson R.A., Polansky M.M., Bryden N.A., Roginski E.E. Mertz W., Glinsmann W.**, (1983) “*Chromium supplementation of human subjects: effects on glucose, insulin, and lipid variables*”. METABOLISM, **32**: 894
- ❖ **Anderson R.L., Walbridge C.T., Fiandt J.T.**, (1980) “*Survival and growth of *Tanytarsus dissimilis* (Chironomidae) exposed to copper, cadmium, zinc and lead*”. ARCH. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., **9**: 329.
- ❖ **Andersson T., Drakenberg T., Forsen S., Thulin E.**, (1982) “*Characterization of the  $Ca^{2+}$  binding sites of calmodulin from bovine testis using  $^{43}Ca$  and  $^{113}Cd$  NMR.* Eur”. J., BIOCHEM., **126**: 501

- ❖ **Anke M., Henning A., Schneider H.J., Ludke H., Von Cager W., Schlegel 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.
- ❖ **Appenroth D. e Braunlich H.,** (1988) “*Age dependent differences in sodium dichromate nephrotoxicity in rats*”. EXP. PATHOL., **33**: 179.
- ❖ **Applequist H., Asbirk S., Drabaek I.,** (1984) “*Mercury monitoring: mercury stability in bird feathers*”. MAR. POLLUT. BULL., 15:22-24.
- ❖ **Aranyi C., Bradof J.N., O’Shea W.J.,Graham J.A. & Miller F.J.,** (1985) “*Effects of arsenic trioxide inhalation exposure on pulmonary antibacterial defence in mice*” in J.TOXICOL.ENVIRON. 15: pp 163-172.
- ❖ **Arean J.M.,** (1974) POISONING, 3<sup>rd</sup> ed., Charles C. Thomas, Pubbl., Springfield, III.
- ❖ **Arena J.M.,** (1970). “*POISONING*”. 2<sup>nd</sup> Ed., Thomas, Springfield, p.369.
- ❖ **Arthur J.R., Boyne R., Hill H.A.O. e Okolow-Zubkowska M.J.** (1981) “*The production of oxygen-derived radicals by neutrophils from selenium-deficient cattle*” FEBS LETT. 135, pp 187-190.
- ❖ **Ashby J.** (1998), “*Issues associated with the validation of in vitro and in vivo method for assessing endocrine disrupting chemicals*”, PURE AND APPLIED CHEMISTRY, **70 (9)**: 1735-1745.
- ❖ **Ashby J.** (2000), “*Getting the problem of endocrine disruption into focus: The need for a pause for thought*”, APMIS, **108**: 805-813
- ❖ **Astolfi E.; Taccagno A. ; Fernandez J.C.G. ; Vaccaio R. & Stimola R.,** (1981) in BIOL. TRACE ELEM.RES. 3:133
- ❖ **Baggiolini M., de Duvé C., Masson P.L. e Heremans J.F.,** (1970). “*Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes*”. J. EXP. MED., 131:559.
- ❖ **Baker A.J.M. & Brooks R.R.,** (1989). “*Terrestrial higher plants which hyperaccumulate metallic elements – A review of their distributions, ecology and phytochemistry*”. BIORECOVERY, 1: 81-126.
- ❖ **Baker E.L., Goyer R.A., Fowler B.A.,** (1980): “*Occupational lead exposure, nephropathy and renal cancer*”. AM J INDUSTR MED 1:139-148
- ❖ **Bancks R.B. e Cooke R.T. Jr,** (1986) “*Chromate reduction by rabbit liver aldehyde oxidase*”. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., **137**: 7.

- ❖ **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.
- ❖ **Barltrop D.**, (1969) In: MINERAL METABOLISM IN PEDIATRICS. D. Barltrop e W.L. Burland Eds., Davies, Philadelphia, p. 135.
- ❖ **Barrett J. e Livesey P.J.**, (1983) "*Lead induced alterations in maternal behavior and offspring development in the rat*". NEUROBEHAV. TOXICOL. TERATOL., **5**:557.
- ❖ **Barth D., Berlin A., Engel R., Recht P., Smeets J. Eds.**, (1973) "*Proceedings international symposium. Environmental health aspects of lead.*" COMIS. EUROPEAN COMMUN., Luxembourg. 1,168 pp.
- ❖ **Beach R.S., Gershwin M.E. & Hurley L.S.**, (1982) III. "*Zinc deprivation versus restricted food intake in MRL/l mice- the distinction between interacting dietary influences*". J.IMMUNOL. **129**: pp 2686-2692
- ❖ **Becker W.M. e Hoekstra W.G.**, (1971). „*The intestinal absorption of zinc*". In: INTESTINAL ABSORPTION OF METAL IONS, TRACE ELEMENTS AND RADIONUCLIDES (S.C. Skoryna and D.Waldron-Edward Eds.), Pergamon Press, Oxford, pp. 229.256.
- ❖ **Beiglböck C., Steineck T., Tataruch F. e Ruf T.**, (2002). „*Environmental Cadmium induces histopathological changes in kidneys of roe deer*". ENVIRON. TOXIC. AND CHEM., **21**,9: 1811-1816
- ❖ **Beijer K., Jernelov A.**, (1979) "*Methylation of mercury in natural waters*". In J.O. Nriagu (ed.). THE BIOGEOCHEMISTRY OF MERCURY IN THE ENVIRONMENT. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, New York, 201-210.
- ❖ **Bellrose F.C.**, (1959). "*Lead poisoning as a mortality factor in waterfowl population*". ILLINOIS NATIONAL HISTORY SURVEY BULLETIN, **27**, 235-288
- ❖ **Beneko V.; Wagner V.; Wagnerova M. & Botola J.** (1988) in J.HYG.EPIDEMIOL. MICROBIAL. IMMUNOL. **32**:137
- ❖ **Benes P., Cejchanova M., Havlik B.**, (1985) "*Migration and speciation of lead in a river system heavily polluted from a smelter*". WATER RES., **19**: 1.
- ❖ **Benson W.W., Pharaoh B., Miller P.**, (1974). "*Lead poisoning in a bird of prey*". BUL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL. **11**:105-108.
- ❖ **Bentley PJ** (1998) COMPARATIVE VERTEBRATE ENDOCRINOLOGY, Third Edition. Cambridge: Cambridge University Press.

- ❖ **Beresford, W.A., M.P. Donovan, J.M. Henninger, and M.P. Waalkes.** (1981). “*Lead in the bone and soft tissues of box turtles caught near smelters*”. BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL. 27:349-352.
- ❖ **Beretta C.,** (1994) “*Piombo*”. In: TOSSICOLOGIA VETERINARIA, a cura di C. Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, p. 153.
- ❖ **Bergeron JM, Crews D & McLachlan JA** (1994) “*PCBs as environmental estrogens: Turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination*”. ENVIRON HEALTH PERSPECT, 102(9):780-781.
- ❖ **Bernstein J.,Evan A.P., Gardner K.D.** (1987): “*Epithelial hyperplasia in human polycystic kidney disease. Its role in pathogenesis and risk of neoplasia*”. AM J PATHOLOGY 129:92-101
- ❖ **Bertusi M.G. e Tosetti T.,** (1986) “*I Mammiferi dell’Emilia-Romagna*” I.B.C. Regione Emilia-Romagna
- ❖ **Bhattacharyya M.H.,** (1991) “*Cadmium-induced bone loss: increased susceptibility in females*”. WATER AIR SOIL POLLUTION, **57-58**: 665.
- ❖ **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.
- ❖ **Birdsall C.W., Grue C.E., Anderson A.,** (1986) “*Lead concentrations in bullfrog Rana catesbeiana and green frog R. clamitans tadpoles inhabiting highway drainages*”. ENVIRON. POLLUT., **40A**:233.
- ❖ **Birnbaum L.S** (1994), “*Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs , dioxins and other xenobiotics: Implications for policy and research*”, ENVIRON HEALTH PERSPECT, **102**: 676-679.
- ❖ **Bishop C., Brooks R.J., Carey J.H., Norstrom R.J. & Lean D.R.S.** (1991) “*The case for a cause-effect between environmental contamination and development in eggs of the common snapping turtle (Chelydra S. Serpentina) from Ontario, Canada.*” In JOURNAL OF TOXICOLOGY ENVIROMENTAL HEALTH, 33, pp 521-547
- ❖ **Bishop C.W. e Surgenor D.M. Eds.,** (1964) “*The red blood cell: a comprehensive treatise*”. ACADEMIC PRESS, New York, p. 110.
- ❖ **Bjorndal K.A.** (1999). “*Priorities for research in foraging habitats*”. In: Eckert K.L., Bjorndal K.A., Abreu-Grobois F.A., Donely M. (eds.), RESEARCH AND MANAGEMENT TECHNIQUES FOR THE CONSERVATION OF SEA TURTLE. IUCN/SSC Marine Turtle Specialist Group Publication No. 4, pp. 2-14.

- ❖ **Blumton A.K., Fraser J.D., Young R.W., Goodbred S., Porter S.L. & Luukkonen D.L.** (1990) "*Pesticide and PCB residues for Loggerhead shrikes in the Shenandoah Valley, Virginia, 1985-88*" in BULLETIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY 45, pp 697-702
- ❖ **Boggess W.R.** Ed., (1977) "*Lead in the environment*". NATL. SCI. FOUND. REP.NSF/RA-770214. 272 pp. Avail. from U.S. Gov. Printing Office, Washington, D.C. 20402.
- ❖ **Bolander F.F.** (1994), "*Molecular Endocrinology*", Second Edition. San Diego, CA: ACADEMIC PRESS, Inc.
- ❖ **Booker D.V., Chamberlain A.C., Newton D., Stott A.N.B.**, (1969) "*Uptake of radioactive lead following inhalation and injection*". BRIT. J. RADIOL., 42: 459.
- ❖ **Borgman R.F., Au B. e Chandra R.K.**, (1986) "*Immunopathology of chronic cadmium administration in mice*". INT. J. IMMUNOPHARMACOL., 8: 813
- ❖ **Bottarelli F.**, (1993a) "*Arsenico As*" in MANUALE DI TOSSICOLOGIA VETERINARIA ,T.P.E. veterinaria, pag 59-63.
- ❖ **Bottarelli F.**, (1993b) "*Mercurio Hg*" in MANUALE DI TOSSICOLOGIA VETERINARIA ,T.P.E. veterinaria, pag 59-63.
- ❖ **Bottarelli F.**, (1993c) "*Slenio, Se*" in MANUALE DI TOSSICOLOGIA VETERINARIA ,T.P.E. veterinaria, pag 368-370.
- ❖ **Bottarelli F.**, (1993d) "*Zinco Zn*" in MANUALE DI TOSSICOLOGIA VETERINARIA ,T.P.E. veterinaria, pag 427-429.
- ❖ **Boudou A., Ribeyre F.**, (1983) "*Contamination of aquatic biocenoses by mercury compounds: an experimental toxicological approach*". In J.O. Nriagu (ed.). AQUATIC TOXICOLOGY. John Wiley, New York, 73-116.
- ❖ **Bowler K. e Duncan D.J.**, (1970). "*The effect of copper on membrane enzymes*". BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA., 196:116-119.
- ❖ **Boyland E., Dukes C.E., Grover P.L., Mitchley B.C.V.**, (1962) "*The induction of renal tumors by feeding lead acetate to rats*". BR. J. CANCER, 16: 283.
- ❖ **Boyne R. e Arthur J.R.**, (1981) "*Effects of selenium and copper deficiency on neutrophil function in cattle*" J.COMP.PATHOL 92: pp 271-276
- ❖ **Bragt P.C. e van Dura E.A.**, (1983) "*Toxicokinetics of hexavalent chromium in the rat after intratracheal administration of chromates of different solubilities*". ANN. OCCUP. HYG., 27: 315.

- ❖ **Brewer N.R.**, (1987). “*Comparative metabolism of copper*”. J. AM. VET. MED. ASSOC., 190:654-658.
- ❖ **Brink M.F., Becker D.E., Terrill S.W. & Jensen A.H.** (1959) J.ANIMAL.SCI. 18 pp 836
- ❖ **Broderick A.C. & Godley B.J.** (1996). “*Population and nesting ecology of the green turtle, Chelonia mydas, and the loggerhead turtle, Caretta caretta, in northern Cyprus*”. ZOOLOGY IN TH MIDDLE EAST, 13: 27-46.
- ❖ **Brown David R.**, (2001). “*Copper and prion disease*”. BRAIN RESEARCH BULLETIN, Vol.55, 2:165-173.
- ❖ **Bruno S.** (1986) “*Guida a tartarughe e sauri d’Italia*”in Ed. Giunti-Martello, Firenze
- ❖ **Buck W.B.** (1978 ) “*Toxicity of inorganic and aliphatic organic arsenicals*” in TOXICITY OF HEAVYMETALS IN THE ENVIRONMENT Part.I 16: pp 357-374.
- ❖ **Bullen J.J. e Rogers H.K.**, (1969). „*Bacterial iron metabolism and immunity to Pasteurella spetica and Escherichia coli*”. NATURE, 224:380.
- ❖ **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.
- ❖ **Burger J., Gaines K.F., Lord C.G., Brisbin Jr. I.L., Shukla S. e Gochfeld M.**, (2002). “*Metal levels in Raccoon tissues: differences on and off the Department of Energy’s Savannah River site in South Carolina*”. ENVIRON. MONITORING AND ASSESSMENT, 74:67-84.
- ❖ **Burk R.F.**, (1976) “*Selenium in man*” in Prasad A.S. & Oberleas D. (eds) TRACE ELEMENTS IN HUMAN HEALTH AND DISEASE. Vol II Accademic Press Inc. New York, pp 105-134
- ❖ **Burk R.F., Seely R.J. & Kiker K.W.**, (1973) “*Selenium: dietary threshold for urinary excretion in the rat*” in PROC.SOD.EXP.BIOL.MED. 142, pp 214-216
- ❖ **Burns R.K.**, (1961) “*Role of Hormones in the differentiation of sex*”. Young W;C., ed. SEX AND INTERNAL SECRETION, III Ed., Baltimore, MD: Wilkins & Wilkins CO., pp. 76-161
- ❖ **Burton J.L., Mallard B.A., Mowat D.N.**, (1993) “*Effects of supplemental chromium on immune responses of periparturient and early lactation dairy cows*”. J. ANIM. SCI., **71**: 1532.
- ❖ **Bustars R.H.** (1972) “*Sea Turtle. Their natural History and Conservation*” in W.COLLINS SONS & COMP. Ed., London pp 220

- ❖ **Callister S.M., Winfrey H.R.**, (1986) “*Microbial methylation of mercury in upper Wisconsin River sediments*”. WATER, AIR, SOIL POLLUT., 29:453-465.
- ❖ **Camañas J.A. & de la Serna J.M.** (1995). « *The loggerhead distribution in the Western Mediterranean Sea as deduced from captures by the Spanish long-line fishery*”. In: Llorente G.A., Montori A., Santos X., Carretero M.A. (eds.), SCIENTIA HERPETOLOGICA, Barcelona, pp. 316-323.
- ❖ **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
- ❖ **Capanna E., Ghirardelli E.** “*Phylum Cordati (Cordata)- Filogenesi e sistemica*” da LINEAMENTI DI ZOOLOGIA SISTEMATICA , Zanichelli, 1988, cap. 28, pag. 495-496
- ❖ **Cardona E., Lessler M.A., Brierly G.P.**, (1971) “*Mitochondrial oxidative phosphorylation- interaction of lead with inorganic phosphate*”. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 136: 300.
- ❖ **Carlomagno M.A. & McMurray D.N.**, (1983) “*chronic zinc deficiency in rats: its influence on some parameters of humoral and cell-mediated immunity*” NUTR.RES. 3: pp 69-78
- ❖ **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.
- ❖ **Casale P., Freggi D., Basso R. & Argano R.** (2005), “*Size at male puberty, sexing method, and adult sex ratio in loggerhead turtles (Caretta caretta) from Italian waters investigated through tail measurements*” HERPETOLOGICAL JOURNAL. In press
- ❖ **Casini S., Fossi M.C., Mori G., Bjornstad A.** (2002), “*Vitellogenin induction in Cyprinus carpio treated with 17 $\beta$ -estradiol and 4-nonylphenol*”, ENVIRON. MONIT. ASSESS., 75: 235-239.
- ❖ **Castellan A.L.; Viniegra G.; Eslava G.R. & Alvarez A.J.**, (1964) in SALUD. PUBL. MEX. 6: 375.
- ❖ **Caurant F., Bustamante P., Bordes M. & Miramand P.** (1999) “*Bioaccumulation of cadmium, copper and zinc in some tissues of three species of marine turtles stranded along the French Atlantic Coasts*” in MARINE POLLUTION BULLETIN, 12(38), pp 325-332

- ❖ **Cavalleri A., Minoia C., Richelmi P., Baldi C., Micoli G.**,(1985) “*Determination of total and hexavalent chromium in bile after intravenous administration of potassium dichromate in rats*”. ENVIRON. RES., **37**: 490.
- ❖ **Chamberlain A.C.**, (1985) “*Prediction of response of blood lead to airborne and dietary lead from volunteer experiments with lead isotopes*”. PROC. ROY. SOC. LONDON B, **224**: 149
- ❖ **Chan S.T.H. & Yeung W.S.B.** (1983), “*Sex control and sex reversal in fish under natural conditions*”. In: Hoar W.S., Randall D.J. & Donaldson E.M., (eds.), FISH PHYSIOLOGY, Vol. 9B. New York: Academic Press, 171-222.
- ❖ **Chandra R.K., Heresi G.& Au B.**, (1980) “*serum thymic factor activity in deficiencies of calories, zinc, vitamin A and pyridoxine*”. CLIN.EXP.IMMUNOL. **42**: pp 332-335
- ❖ **Chang X. e Mowat D.N.**, (1992) “*Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves*”. J. ANIM. SCI., **70**: 599.
- ❖ **Chao S.H., Suzuki Y., Zysk J.R., Cheung W.Y.**, (1984) “*Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius*”. MOL. PHARMACOL., **26**: 75
- ❖ **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
- ❖ **Chatterjee S., Dasmahapatra A.K., Ghosh R.** (2001), “*Disruption of pituitary-ovarian axis by carbofuran in catfish, Heteropneustes fossilis (Bloch)*”, COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHISIOLOGY PART C, **129**: 265-273.
- ❖ **Chau Y.K., Wong P.T.S., Kramer O., Bengert G.A., Cruz R.B., Kinrade J.O., Lye J., Van Loon J.C.**, (1980) “*Occurrence of tetraalkyllead compounds in the aquatic environment*”. BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., **24**:26.
- ❖ **Chen N.S.C., Tsai A., Dyer I.A.**, (1973) “*Effect of chelating agents on chromium absorption in rats*”. J. NUTR., **103**: 1182.
- ❖ **Chen Y.C. e Smith J.B.**, (1992) “*A putative lectin-binding receptor mediates cadmium-evoked calcium release*”. In TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **117**: 249
- ❖ **Chennekatu P.P., Burek J.D. e van Zwieten M.J.**, (1986). “*Spontaneous nephropathies in rats*”. TOXICOL. PATHOL., **14**:91-100

- ❖ **Cherian M.G., Goyer R.A., Delaquerriere-Richardson L.**, (1976) “*Cadmium-metallothionein-induced nephrotoxicity*”. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **38**: 399
- ❖ **Cheung W.Y.**, (1984) “ *Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity*”. FED. PROC., **43**:2995
- ❖ **Chiquoine A.D. e Suntzeff V.**, (1965) “*Sensitivity of mammals to cadmium necrosis in the testis*”. J. REPROD. FERTIL., **10**: 455
- ❖ **Chmielnicka J., Halatek T. e Jedlinska U.**, (1989). „*Correlations of cadmium-induced nephropathy and the metabolism of endogenous copper and zinc in rats*”. ECOTOXICOL. ENVIRON. SAFETY, 18:268-276
- ❖ **Choie D.D. e Richter G.W.**, (1972) “*Lead poisoning: rapid formation of intranuclear inclusions*”. Science, **117**: 1195.
- ❖ **Christiansen L.B., Pedersen K.L., Korsgaard B., Bjerregaard P.** (1998), “*Estrogenicity of xenobiotics in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) using in vivo synthesis of vitellogenin as a biomarker*”, MAR. ENVIRON. RES., **46 (1-2)**: 137-140
- ❖ **Chu R.C e Cox D.H.**. (1972). “*Zinc, iron, copper, calcium, cytochrome oxidase and phospholipids in rats of lactating mothers fed excess zinc*”. NUTR. REP. INT., 5:61-66.
- ❖ **Chvapil M., Ryan J.N. e Zukoski C.F.**, (1972). “*The effect of zinc and other metals on stability of lysosomes*”. PROC. SOC. EXP. BIOL-MED., 140:642-644.
- ❖ **Cikrt M., Bencko V.**, (1979) “*Biliary excretion and distribution of <sup>51</sup>Cr(III) and <sup>51</sup>Cr(VI) in rats*”. J. HYG. EPIDEMIOL. MICROBIOL. IMMUNOL., **23**: 241
- ❖ **Clark D.R. & Krynitsky A.J.** (1985) “*DDE residues and artificial incubation of Loggerhead Sea Turtle eggs*” in BULLETIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY 34, pp 121-125
- ❖ **Clarke E.G.C. & Clarke M.L.** (1975) “*Mineral or inorganic Substance-Arsenic*” in VETERINARY TOXICOLOGY, Bailliere Tindal, London pag 34-43.
- ❖ **Clarkson T.W., Hamada R., Amin-Zaki L.**, (1984) “*Mercury*”. In J. O. Nriagu (ed.). CHANGING METAL CYCLES AND HUMAN HEALTH. Springer-Verlag, Berlin, 285-309
- ❖ **Cobb GP & Wood PD** (1997) “*PCB concentrations in eggs and chorioallantoic membranes of loggerhead sea turtles (Caretta caretta)*

from the Cape Romain National Wildlife Refuge".CHEMOSPHERE, 34(3):539-549.

- ❖ **Combs G.F., Noguchi T. e Scott M.L.** (1975). FED. PROC. 34: 2090.
- ❖ **Congdon JD, Tinkle DW, Breitenbach GW & van Loben Sels RC** (1983) "*Nesting ecology and hatching success in the turtle *Emydoidea blandingii**". HERPETOLOGICA, 39:417-429.
- ❖ **Coni E.** – [www.ilcacciatore.com/diario/schede\\_germano.htm](http://www.ilcacciatore.com/diario/schede_germano.htm)
- ❖ **Coogan T.P., Bare R.M., Waalkes M.P.,** (1992) "*cadmium-induced Dan damage: effects of zinc pre-treatment*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., 113: 227.
- ❖ **Cook R.,e Trainer D,** (1996). "*Experimental lead poisoning of Canada Geese*". THE JOURNAL OF WILDLIFE MANAGEMENT, 30:1-8.
- ❖ **Cooper W.C., Gaffey W.R.** (1975): "*Mortality of lead workers*". J OCCUP MED 17:100-107
- ❖ **Corbett & Overden,** (1985) "*guida ai mammiferi d'Europa*" Marzio editore - <http://digilander.libero.it/verdecammuna/cinghiale.htm>
- ❖ **Cottenie A.** (1979). "*Essential and non essential trace elements in the system soilwater-plant*". GLENT UNIVERSITY, p.171.
- ❖ **Cotzias G.C., Borg D.C. e Selleck B.,** (1961). "*Virtual absence of turnover in cadmium metabolism: <sup>109</sup>Cd studies in the mouse*". AM. J. PHYSIOL., 201:927
- ❖ **Coulson E.J., Remington R.E. and Lynch K.M.** (1935) "*Toxicity of naturally occurring arsenic in food*"in J. NUTRI. 10: 255
- ❖ **Cox D.H. e Harris D.L.,** (1960). "*Effect of excess dietary zinc on iron and copper in the rat*". J. NUTR., 70:514-520.
- ❖ **Cox D.H. e Harris D.L.,** (1962). "*Reduction of liver xanthine oxidase activity and iron storage proteins in rats fed excess zinc*". J. NUTR., 78:415
- ❖ **Cox J.L. e Harrison S.D. Jr,** (1983) "*Correlation of metal toxicity with in vitro calmodulin inhibition*". BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., 115: 106
- ❖ **Craik JCA** "*Simultaneous measurement of rates of vitellogenin synthesis and plasma levels of estradiol in an the elasmobranch*" da GEN. COMP. ENDOCRINOLOGY 1979, 38: pag. 264-266.
- ❖ **Craik JCA** (1978a) "*Plasma levels of vitellogenin in the clasmobranch *Scyliorhinus canicida* L. (Lasser spotted dogfish)*" da COMP. BIOCHEM. PHYSIOLOGY, 60B: pag. 9-18

- ❖ **Craik JCA** (1978b) “*Kinetic studies of vitellogenin metabolism in the elasmobranch Scyliorhinus canicida L.*” da COMP. BIOCHEM. PHYSIOLOGY, 61A: pag. 355-361
- ❖ **Craik JCA** (1978c) “*An annual cycle of vitellogenesis in the elasmobranch Scyliorhinus canicida*” da JOURNAL OF MARINE BIOLOGY ASS UK, 58: pag. 719-726
- ❖ **Craik JCA** (1978d) “*The effects of the oestrogen treatment on vcertain plasma conscimentts associated with vitellogenesis in the elasmobranch Scyliorhinus canicida*” da GEN. COMP. ENDOCRINOLOGY, 35: pag. 455-464
- ❖ **Crain DA & Guillette LJ Jr** (1998) “*Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption*”. ANIM REPROD SCI, 53(1-4):77-86.
- ❖ **Crecelius E.A.**, (1974) in Thesis University of Washington, Seattle, Washington.
- ❖ **Crête M, Potvin F., Nault M., Walsh P., Benedetti J.L., Lefebvre M.A., Weber J.P., Paillard G. e Gagnon J.**, (1987). „*Pattern of cadmium contamination in the liver and kidneys of moose and white-tailed deer in Québec*”. SCI. OF TOTAL ENVIRON., 66:45-53.
- ❖ **Crews D & Bergeron JM** (1994) “*Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (Trachemys scripta), a turtle with temperature-dependent sex determination*”. JENDOCRINOL, 143(2):279-289.
- ❖ **Crews D, Bergeron JM & McLachlan JA** (1995) “*The role of estrogen in turtle sex determination and the effect of PCBs*”. ENVIRON HEALTH PERSPECT, 103(Suppl 7):73-77.
- ❖ **Crouse D.T., Crowder L.B. e Caswee H.** (1987). “*A stage-based population model for loggerhead sea turtle and implicatios for conservation*”. ECOLOGY, 68(5): 1412-1423.
- ❖ **Crowley C., Young J.D. e Tucker E.M.** (1977). *Bioch. Soc. Trans.*, 5: 1455.
- ❖ **Damek-Poprawa M. e Sawicka-Kapusta K.**, (2003). “*Damage to the liver, kidney and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworks and zinc smelters in Poland*”. TOXICOLOGY, 186:1-10.
- ❖ **Darlington D.N. & Dallman M.F.** (1995), “*Feedback control in endocrine systems*”. In: Becker K.L., ed. PRINCIPLES AND PRACTICE OF ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, Second Edition. Philadelphia, PA: Lippincott.
- ❖ **Das S.K., Sharma A., Talukder G.**, (1982) “*Effects of mercury on cellular systems in mammals - a review*”. NUCLEUS (Calcutta), 25:193-230.

- ❖ **Dawson D.A., Stebber E.E., Burks S.L. & Banale J.A.,** (1988) “*Evaluation of the developmental toxicity of metal-contaminated sediments using short-term fathead minnow and frog embryo-larval assays*”. ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY 7, pp 2744
- ❖ **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.
- ❖ **de Bruin A.,** (1971) “*Certain biological effects of lead upon the animal organism*”. ARCH. ENVIRON. HEALTH, 23: 249.
- ❖ **De Metrio G., Corriero A., Desantis S., Zubani D., Cirillo F., Deflorio M., Bridges C.R., Eicker J., de la Serna J.M., Megalofonou P., Kime D.E.** (2003), “*Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (Xiphias gladius L.)*”, MAR. POLL. BULL., 46: 358-361
- ❖ **De Voogt P., Van Hattum B., Feenstra J.F. e Copius Peereboom J.W.,** (1980). “*Exposure and health effects of cadmium*”. TOXICOL. ENVIRON. CHEM. REV., 3:89-109.
- ❖ **Decker L.E., Byerrum R.U., Decker C.F., Hoppert C.F. e Langan R.F.,** (1958). “*Chronic toxicity studies: 1. Cadmium administered in drinking water to rats*”. ARCH. IND. HEALTH, 18:228-234
- ❖ **Decker W.J., Goldsmith W.A., Mills R.C. e Banez R.J.,** (1972). “*Systemic absorption of copper after oral administration of radioactive copper sulfate emetic in rats*”. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., 21:331-334
- ❖ **Del Carratore R., Cundari E., Morganti C., Moretton J., Bauer C., Corsil C., Nieri R., Paolini M., Bronzetti G.,** (1984) “*Detection of mutagens in leather and tannery industry assay of 28 commercial mixtures*”. BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., 32: 400.
- ❖ **Delbeke K., Joiris C., Decadt G.,** (1984) “*Mercury contamination of the Belgian avifauna 1970-1981*”. ENVIRON. POLLUT., 7:205-221.
- ❖ **Demayo A., Taylor M.C., Taylor K.W., Hodson P.V.,** (1982) “*Toxic effects of lead and lead compounds on human health, aquatic life, wildlife plants, and livestock*”. CRC CRIT . REV. ENVIRON. CONTROL, 12: 257.
- ❖ **Denslow N.C., Chow M.C., Kroll K. j., Green L.** “*Vitellogenin as a Biomarker of Exposure for Estrogen or Estrogen Mimics*” da ECOTOXICOLOGY 1999, 8: pag. 385-398
- ❖ **Denslow N.D., Lee H.S., Bowman C.J., Hemmer M.J., Folmar L.C.,** (2000), “*Multiple responses in gene expression in fish treated with estrogen*”,

4. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FISH ENDOCRINOLOGY, Seattle, WA (USA), 31 July-4 Aug 2000

- ❖ **Depasquale-jardieu P. & Fraker P.J.**, (1979) “*The role of corticosterone in the loss of immune function in the zinc-deficient A/J mouse*”. J. IMMUNOL., 109: pp 1847- 1855
- ❖ **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
- ❖ **Descostes J., Verdier F., Brouland J.P. & Pulce C.**, (1989) “*Immunotoxicity of lead, cadmium and arsenic: experimental data and their relevance to man*” in IMMUNOTOXICITY OF METALS AND IMMUNOTOXICOLOGY di Dayan A., Hertel R.F., Heseltine E., Kazantzis G., Smith E.M. & Van der Venne M.T. Plenum Press New York, pp 209-213
- ❖ **Descotes J.**, (1992) “*Immunotoxicology of cadmium*”. In: Nordberg G.F., Herbert R.F.M., Alessio L. Eds. CADMIUM IN THE HUMAN ENVIRONMENT. TOXICITY AND CARCINOGENICITY. INTL. AGENCY RES. CANCER, Lyon, France, p. 385
- ❖ **Descotes J.**, (1999) “*Immunotoxicology of drugs and chemicals: experimental and clinical perspectives*”, 3<sup>rd</sup> edition. New York, Elsevier.
- ❖ **Descotes J., Evreux J.C., Laschi-Loquerie a., Tachon P.**, (1984) “*Comparative effects of various lead salts on delayed hypersensitivity in mice*”. J. APPL. TOXICOL., 4: 265
- ❖ **Desvages G & Pieau C** (1992) “*Aromatase activity in gonads of turtle embryos as a function of the incubation temperature of the egg*”. J STEROID METABOL BIOCHEM MOL BIOL, 41:851-853.
- ❖ **Desvages G, Girondot M & Pieau C** (1993) “*Sensitive stages for the effects of temperature on gonadal aromatase activity in embryos of the marine turtle Dermochelys coriacea*”. GEN COMP ENDOCRINOL, 92(1):54-61.
- ❖ **Devenport J. & Wrench J.** (1990) “*Metals level in a Leatherback turtle*” in MARINE POLLUTION BULLETIN 21, pp 40-41
- ❖ **DG ENVIRONMENT** (2000) “*Ambient air pollution by As Cd, Ni compounds*” POSITION PAPER, Working group on Arsenic, Cadmium and Nickel Compounds, DG Environmental European Commission
- ❖ **Dickhoff W., Brown C.L., Sullivan C.V. e Bern H.A.** (1990), “*Fish and amphibian models for developmental endocrinology*”, J. EXP. ZOOL., 12(Suppl. 4): 90-97.

- ❖ **Dieter M.P.**, (1979) “*Blood delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) to monitor lead contamination in canvasback ducks (Aythya valisineria)*”. Pages 177-191 in NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. ANIMALS AS MONITORS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS. Washington, D.C.
- ❖ **Dingwall-Fordyce I. & Lane R.E.** (1963): “*A follow-up study of lead workers*”. BRITISH JOURNAL OF INDUSTRIAL MEDICINE, 20:313-315.
- ❖ **Dominici A.** (1998). Progetto Caretta-Loggerhaed Sea Turtle Project. *Hydrosphera*, Linosa
- ❖ **Donaldson R.M. Jr e Barreras R.F.**, (1966) “*Intestinal absorption of trace quantities of chromium*”. J. LAB. CLIN. MED., **68**: 484
- ❖ **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
- ❖ **Doyle J.J. e Spaulding J.E.**, (1978). «*Toxic and essential trace elements in meat-a review*”. J. ANIM. SCI., 47:398-419
- ❖ **Dudley R.E., Gammal 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
- ❖ **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.
- ❖ **Duggan A., Paolucci M., Tercyak A., Gigliotti M., Small D. & Callard I.**, (2001) “*Seasonal variation in plasma lipids, lipoproteins, apolipoprotein A-I and vitellogenin in the freshwater turtle, Chrysemys picta*” COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART A 130, pp 253-369
- ❖ **Dwivedi C.**, (1983) “*Cadmium-induced sterility: possible involvement of the cholinergic system*”. ARCH. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., **12**: 151
- ❖ **Eaton J.G.**, (1974) “*Chronic cadmium toxicity to the bluegill (Lepomis macrochirus Rafinesque)*”. TRANS. AM. FISH. SOC., **103**: 729
- ❖ **Ecological Analysts, Inc.**, (1981) “*The sources, chemistry, fate, and effects of chromium in aquatic environments*”. AVAIL. FROM AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE, 2101 L St., N.W., Washington, DC 20037. 207 pp.
- ❖ **Edel J. e Sabbioni E.**, (1985) “*Oathways of Cr(III) and Cr(VI) in the rat after intratracheal administration*”. HUMAN TOXICOL., **4**: 409.

- ❖ **Eisler R.**, (1985) “*Cadmium hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review*”. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 2.
- ❖ **Eisler R.**, (1986) “*Chromium hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review*”. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 6.
- ❖ **Eisler R.**, (1987) “*Mercury hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review*”. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 10.
- ❖ **Eisler R.**, (1988) “*Lead hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review*”. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 14.
- ❖ **Eisler R.**, (1988) “*Arsenic hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review*”. Patuxent Wildlife Research Center, Biological Report n. 12.
- ❖ **Eisler R.**, (1993) “*Zinc hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review*”. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 26
- ❖ **Eisler R.**, (1985). “*Selenium hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review*”. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT, n.5.
- ❖ **Elhassani S.B.**, (1983) “*The many faces of methylmercury poisoning*”. J. TOXICOL., 19:875-906.
- ❖ **Elinder C.G.**, (1986) “*Zinc*” in L.Friberg, G.E. Nordberg & Vouk V.B. editors HANDBOOK ON THE TOXICOLOGY OF METALS II ED., Volume II: specific metals. Elsevier, New York pp. 664-679
- ❖ **Elinder C.G., Kjellström T., Hogstedt C., Anderson K., Spang G.**, (1985) “*Cancer mortality of cadmium workers*”. BR. J. IND. MED., 42: 651
- ❖ **Elless M.P., Blaylock M.J., Huang J.W., Gussman C.D.**, (2000). “*Plants as a natural source of concentrated mineral nutritional supplements*”. FOOD-CHEMISTRY, 71: 2, 181-188.
- ❖ **Elsby R., Maggs J.L., Ashby J., Paton D., Sumpter J.P., Park B.K.** (2001), “*Assessment of the effects of metabolism on the estrogenic activity of xenoestrogens: A two stage approach coupling human liver microsomes and a yeast estrogenicity assay*”, PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS, 296(2): 329-337.
- ❖ **Ensley S.**, (2003) “*Lead-Metals and Minerals*”in CLINICAL VETERINARY TOXICOLOGY di Plumlee K.H.,Mosby, 22, pp 204-210

- ❖ Env. Health & Toxicology :**Toxics Release Inventory (TRI)** - Annual environmental releases of over 600 toxic chemicals by U.S. facilities.
- ❖ **EPA**, (1980) “*Ambient water quality criteria for cadmium*”. U.S. ENVIRON. PROTECTION AGENCY REP. 440/5-80-025.
- ❖ **EPA**, (1980)- “*Ambient water quality criteria for lead*”. U.S. ENVIRON. PROTECTION AGENCY REP., 440/5-80-057.
- ❖ **EPA**,(1980), “*Ambient water quality criteria for arsenic*” in US.ENVIRON.PROTECTION AGENCY REP. 440/5-80-021 pp 205.
- ❖ **EPA**,(1980), “*Ambient water quality criteria for chromium*” in US.ENVIRON.PROTECTION AGENCY REP. 440/5-80-057 pp 205
- ❖ **EPA**,(1985), “*Ambient water quality criteria for arsenic*” in US.ENVIRON.PROTECTION AGENCY REP. 440/5-84-033 pp 66
- ❖ **Eskew M.L., Scholz R.W., Reddy C.C., Todhunter D.A. e Zarkower A.,** (1985) “*Effects of vitamin E and selenium deficiencies on rat immune function*” IMMUNOLOGY 54, pp 173-180.
- ❖ **Etchberger CR, Ewert MA, Philips JB, Nelson CE & Prange HD** (1992) “*Physiological responses to carbon dioxide in embryonic reared slider turtles, Trachemys scripta*”. J EXP ZOOL, 264:1-10.
- ❖ **Etzel K.R., Swerdl M.R., Swerdl J.N., Cousins R.J.,** (1982). “*Endotoxin-induced changes in copper and zinc metabolism in the Syrian hamster*”. J. NUTR.,112:2363-2373.
- ❖ **European Workshop on the Impact of Endocrine Disrupters on Human Health and Wildlife**, Weybridge, 2-4 dicembre 1996.
- ❖ **Evans G.W.,** (1973). “*Copper homeostasis in the mammalian system*”. PHYSIOL. REV., 53:535-570.
- ❖ **Evans G.W.,** (1989) “*The effect of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans*”. INT. J. BIOSOC. MED. RES., **11**: 163.
- ❖ **Fahim M.S., Webb M., Hildebrand D.C., Russel R.L.,** (1972) “*Effect of lead acetate on male reproduction*”. FED. PROC., **31**: 272.
- ❖ **Falandysz J.,** (1993b). *Some toxic and essential trace metals in swine from the northern part of Poland*. Sci. Total Environ., 136, 1-2:193-204.
- ❖ **Falandysz J.,** (1994). “*Some toxic and trace metals in big game hunted in the northern part of Poland in 1987-1991*”. THE SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT, 141: 59-73
- ❖ **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.

- ❖ **Ferm V.H. e Carpenter S.J.**, (1968) “*The relationship of cadmium and zinc in experimental mammalian teratogenesis*”. LAB. INVEST., **18**: 429.
- ❖ **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
- ❖ **Ferri V.** (2003). Tartarughe e testuggini. *Mondadori, seconda edizione*, Milano
- ❖ **Ferriera R.M. C.d.C., Maquiegui I.M. & Elizaga I.V.**, (1989) “*Teratogenicity of zinc deficiency in the rat: study of the fetal skeleton*”. TERATOLOGY 39, pp 181-194.
- ❖ **Flammarion P., Brion F., Babut M., Garrie J., Migeon B., Noury P., Thybaud E., Tyler C.R., Palazzi X.** (2000), “*Induction of fish vitellogenin and alterations in testicular structure: Preliminary results of estrogenic effects in chub (Leuciscus cephalus)*”, ECOTOXICOL., **9**: 127-135.
- ❖ **Foote R.H.**, (1999). “*Cadmium affects testes and semen of rabbits exposed before and after puberty*”. REPROD. TOXICOL., 13:269-277.
- ❖ **Foran C.M., Bennett E.R., Benson W.M.** (2000), “*Exposure to environmentally relevant concentrations of different nonylphenol formulations in Japanese medaka*”, MAR. ENVIRON. RES., **50**: 135-139.
- ❖ **Fordyce F.M., Williams T.M., Pajilpapapon & Charoenchaisci P.**, (1995) in BRITISH GEOL. SURVEY. Keyworth
- ❖ **Forni A., Cambiaghi G., Sechi G.C.**,(1976) “*Initial occupational exposure to lead. Chromosome and biochemical findings*”. ARCH. ENVIRON. HEALTH, **27**: 73.
- ❖ **Forsen S., Thulin E., Lilja H.**, (1979) “*<sup>113</sup>Cd NMR in the study of calcium binding proteins: troponin*” C. FEBS LETT., **104**: 123
- ❖ **Fort D.J., James B.L. & Banale J.A.**, (1989) “*Evaluation of the developmental toxicity of five compounds with the frog embryo teratogenesis assay. Xenopus (FETAX) and a metabolic activation system*”. JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY 9 pp 377-388.
- ❖ **Foulkes E.C.**, (1978) “*Renal tubular transport of cadmium-metallothionein*”. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **45**: 505.
- ❖ **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. Kägi e Y. Kojima Eds., Birkhauser Verlag, Basel.

- ❖ **Fox M.R.S. e Fry B.E.Jr**, (1970) "*Cadmium toxicity decreased by dietary ascorbic acid supplements*". SCIENCE, **169**: 989
- ❖ **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
- ❖ **Franchini I, Mutti A.**, (1988) "*Selected toxicological aspects of chromium (VI) compounds*". SCI. TOTAL ENVIRON, **71**: 379.
- ❖ **Frank A.**, (1986). « *In search of biomonitors for cadmium: cadmium content of wild Swedish fauna during 1973-1976* ". SCI.TOTAL ENVIRON., 57:57-65
- ❖ **Frank A., Petersson L. e Mörner T.**, (1981). „*Bly-och kadmiumpulter i organ från älg, rådjur och hare; kadmiumpulter-finns de?*“. SVENSK VETERINÄRTIDNING, 33:151-156
- ❖ **Frank A., Petersson S. e Mörner T.**, (1981). „*Lead and cadmium in tissues from elk Alces alces, roe deer Capreolus capreolus and hares Lepus europaeus, Lepus timidus*“. VÅR FÖDA, 33:151-156.
- ❖ **Freeland J.H. e Cousins R.J.**, (1973) "*Effect of dietary cadmium on anemia and iron absorption*". FED. PROC., **32 (3)**: 924
- ❖ **Friberg L., Kjellström T., Nordberg G.F.**, (1986) „*Cadmium*“. In: Friberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B. Eds., HANDBOOK ON THE TOXICOLOGY OF METALS, Vol. 2, 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier, New York, p.130
- ❖ **Friberg L., Piscator M., Nordberg G.F. e Kjellström T.**, (1974). „*Cadmium in the environment*". 2nd edn. CRC Press, Cleveland Ohio.
- ❖ **Friend M.**, (1987). "*Lead poisoning*". In: FIELD GUIDE TO WILDLIFE DISEASES di Friend M., vol.1, pp.175-189. Washington D.C.: US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service.
- ❖ **Frøslie A., Sivertsen T. e Lochmiller R.**, (2001). „*Perissodactyla and Artiodactyla*. In: *Ecotoxicology of Wild Mammals*" (EDITED BY R.F.SHORE AND B.A.RATTNER), JOHN WILEY & SONS LTD., pp. 510-538
- ❖ **Frosly A., Norheim C., Rambaek J.P. e Steinnes E.**, (1984). „*Levels of trace elements in liver from Norwegian moose, reindeer and red deer in relation to atmospheric deposition*". ACTA VET. SCAND., 25:333-345.
- ❖ **Frost D.V., Overby L.R. and Spurth H.C.**, (1955) "*Studies with arsenic acid and related compounds*" in J.AGRIC.FOOD CHEM. 3:235
- ❖ **Fujimaki H., Shimizu F., Kawamura R., Kubota K.**, (1983) "*Inhibition of delayed hypersensitivity reaction in mice by cadmium*". TOXICOL. LETT., **19**: 241

- ❖ **Fukada H, Fujiwara Y., Takahashi T., Hiramatsu N., Sullivan C.V. & Hara A.** (2003): “*Carp (Cyprinus carpio) vitellogenin: purification and development of a simultaneous chemiluminescent immunoassay*” in *Comp. Biochem. and Physiol. Part A* 134, pp 615-623
- ❖ **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.
- ❖ **Gad S.C.,** (1989) “*Acute and chronic systemic chromium toxicity*”. *SCI. TOTAL ENVIRON.*, **86**: 149.
- ❖ **Gaillard RC** (1994) “*Neuroendocrine-immune system interactions: the immune-hypothalamo-pituitary-adrenal axis*”. *TRENDS ENDOCRINOL METAB*, 5:303-309.
- ❖ **Gainer J.H.,** (1972) “*Effects of arsenicals on interferon formation and action*” in *AM.J.VET.RES.* 33: pp 2579.
- ❖ **Gale T.F.** (1978). “*Embryotoxic effects of chromium trioxide in hamsters*”. *ENVIRON. RES.* 16:101-109.
- ❖ **Galton V.A.** (1992), “*The role of Thyroid Hormones in amphibian metamorphosis*”, *TRENDS ENDOCRINOL. METAB.*, **3**: 96-100.
- ❖ **Ganther H.E.** (1968). *Biochemistry*, 7: 2898.
- ❖ **Garcia Reyero N., Raldua D., Quiros L., Llaveria G., Cerda J., Barcelo D., Grimalt J.O., Pina B.** (2004), “*Use of vitellogenin mRNA as a biomarker for endocrine disruption in feral and cultured fish*”, *ANAL. BIOANAL. CHEM.*, **378** (3): 670-675.
- ❖ **García-Fernández A.J., Sánchez-García J.A., Gómez-Zapata M. e Luna A.,** (1996). «*Distribution of cadmium in blood and tissues of wild boars*”. *ARCH. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL.*, 30:252-258.
- ❖ **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.
- ❖ **Gennaro S.M. & Nebbia C.** (1984). “*Selenio*”. In *TOSSICOLOGIA VETERINARIA*. A cura di C. Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 180-188.
- ❖ **Gennaro S.M., Nebbia C., Valenza F., Cagnasso A. e Guglielmino R.** (1983). *Arch. Vet. Ital.* 34: 65.
- ❖ **Giavini E., Prati M., Vismara C.,** (1980) “*Effects of cadmium, lead and copper on rat preimplantation embryos*”. *BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL.*, **25**: 702.

- ❖ **Gibbons JW & Semlitsch RD** (1982) “*Survivorship and longevity of a long-lived vertebrate species: How long do turtles live?*” J ANIMECOL, 51:523-527.
- ❖ **Gilani S.H. e Marano M.**, (1979) “*Chromium poisoning and chick embryogenesis.*” ENVIRON. RES. **19**: 427
- ❖ **Gilliavod N. e Leonard A.**, (1975). “*Mutagenicity tests with cadmium in the mouse*”. TOXICOLOGY, 5, 1:43-47.
- ❖ **Gimeno S., Komen H., Jobling S., Sumpter J., Bowmer T.**, (1998b), “*Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis*”, AQUAT. TOXICOL., **43**: 93-109.
- ❖ **Gimeno, S., Komen, H., Gerritsen, A.G.M., Bowmer, T.** (1998a), “*Feminisation of young males of the common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-ter-pentyl-phenol during the sexual differentiation*”, AQUAT. TOXICOL., **43**: 77-92.
- ❖ **Girod C. e Chauvineau A.**, (1964) « *Nouvelles observations concernano l'influence du chlorure de cadmium sur le testicule du Singe *Macacus irus** ». F. CUV. C. R. SOC. BIOL. (Paris), **158** : 2113
- ❖ **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
- ❖ **Godley B.J., Thompson D.R. e Furness R.W.** (1999). “*Do heavy metal concentrations pose a threat to marine turtles from the Mediterranean Sea?*” MARINE POLLUTION BULLETTIN, 38(6): 497-502.
- ❖ **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
- ❖ **Gonsebatt M.E., Vega L., Montero R., Garcia-Vargas G., Del Razo L.M., Albores A., Cebrian M.E. & P. Ostrosky-Wegman** (1994) “*Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water*” in MUTA.RES. 313 (2-3): pp 293-299
- ❖ **Gorbman A, Nozaki M & Kubokawa K** (1999) “*A brain-Hatschek's pit connection in amphioxus*”. GEN COMP ENDOCRINOL 113(2):251-254.
- ❖ **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.

- ❖ **Goyer R.A. e Cherian M.G.**, (1992) “*Role 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.
- ❖ **Goyer R.A.**, (1968) “*The renal tubule in lead poisoning: 1. Mitochondrial swelling and amino aciduria*”. LAB. INVEST., **19**: 71.
- ❖ **Goyer R.A.**, (1989). “*Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity*”. TOXICOL.LETT., 46:153.
- ❖ **Goyer R.A.**, (1990) “*Environmentally related diseases of the urinary tract*”. ENVIRON. MED., **74**: 377
- ❖ **Goyer R.A.**, (1996). “*Toxic effects of metals*”. In: Casarett&Doull’s *Toxicology; THE BASIC SCIENCE OF POISONS*, 5<sup>th</sup> edn., Klaassen C.D. (Ed.), McGraw-Hill, New York, pp.691-736.
- ❖ **Gramentz D.** (1988).” *Involvement of loggerhead turtle with the plastic, metal, and hydrocarbo pollution in the central Mediterranean*”. MARINE POLLUTION BULLETTIN, 19: 11-13.
- ❖ **Grant-Frost D.R. e Underwood E.J.**, (1958). „*Zinc toxicity in the rat and his relation with copper*”. AUST. J. EXP. BIOL., 36:339-346.
- ❖ **Greener Y., Kochen J.A.**, (1983) “*Methyl mercury toxicity in the chick embryo*”. TERATOLOGY, 28:23-28.
- ❖ **Grimmet R.E.R., McIntosh I.C, Wall E.M. & Hopkirk C.S.M.** (1937) N.Z.J.AGRC. , 54 PP. 216
- ❖ **Groot Bruinderink G.W.T.A., Lammertsma D.R. e Hazebroek E.**, (2000). “*Effects of cessation of supplemental feeding on mineral status of red deer Cervus elaphus and wild boar Sus scrofa in the Netherlands*”. ACTA THERIOLOGICA, 45, 1:71-85.
- ❖ **Gumbleton M. e Nichols P.J**, (1988) “*Dose-response and time-response biochemical and histological study of potassium dichromate-induced nephrotoxicity in the rat*”. FOOD CHEM. TOXICOL., **26**: 37
- ❖ **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
- ❖ **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.
- ❖ **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.

- ❖ **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.
- ❖ **Gutteridge J.M.C.**, (1987). “*Lipid peroxidation: some problems and concept*”s. In: OXYGEN RADICALS AND TISSUE INJURY (B.Halliwell Ed.), The Upjohn Company, Bethesda, Maryland, pp. 9-19.
- ❖ **Gutzke WH & Paukstis GL** (1983) “*Influence of the hydric environment on sexual differentiation of turtles*”. J EXP ZOOL, 226(3):467-469.
- ❖ **Habermann E., Crowell K.,Janicki P.**, (1983) “*Lead and other metals can substitute for  $Ca^{2+}$  in calmodulin*”. ARCH. TOXICOL., **54**:61.
- ❖ **Haddow A. e Horning E.S.**,(1960). “*On the carcinogenicity of an iron-dextran complex*”. J. NATL. CANCER INST., 24:109.
- ❖ **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
- ❖ **Hahn C.J. e Evans G.W.**, (1975) “*Absorption of trace metals in the zinc-deficient rat*”. AM. J. PHYSIOL., **228**: 1020.
- ❖ **Hall RJ & Henry PFP** (1992) “*Assessing effects of pesticides o amphibians and reptiles: status and needs*”. HERPETOL J, 2:65-71.
- ❖ **Hanson I.e., Carpenter, Anunan W.J. and Ferrin E.F.**,(1955) “*the use of arsanilic acid in the production of market pig*” in J.ANIM.SCI. 14:513
- ❖ **Harr J.R.**, (1978) “*Biological effects of selenium*” in TOXICITY OF HEAVY METALS IN THE ENVIRONMENT ed: Frederick W.Oehme part 2 cap.18: pp 393-426
- ❖ **Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Routledge E., Rycroft R., Sumpter J.P., Tylor T.** (1996), “*A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland wathers*” ,ENVIRON. TOXICOL. CHEM., **15**: 1993-2002
- ❖ **Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Sumpter J.P., Tylor T., Zaman N.** (1997), “*Estrogenic activity in five United Kingdom rivers detected by measurement of vitellogenesis in caged male trout*”, ENVIRON. TOXICOL. CHEM., **16**: 534-542
- ❖ **Harries J.E.,Janbakhsh A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Sumpter J.P., Tyler C.R.** (1999), “*Estrogenic potency of effluent from two sewage tretament works in the United Kingdom*”, ENVIRON. TOXICOL. CHEM., **18**: 932-937.

- ❖ **Harvey J.W, French T.W, Meyer D. J.** (1982). “*Chronic iron deficiency anemia in dogs*”. J. AMER. ANIM. HOSP. ASSOC., 18:946-960.
- ❖ **Hatch R.C.** (1982). Poisons causing respiratory insufficiency, in "Veterinary Pharmacology and Therapeutics", 5<sup>th</sup> edition ed. by N.H. Booth and L.E. McDonald, Iowa State University Press. Ames. P. 965.
- ❖ **Hatherill J.R.,** (1981) “*A review of the mutagenicity of chromium*”. DRUG CHEM. TOXICOL., 4: 185.
- ❖ **Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A & Thomas P** (2000) “*Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts*”. PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, USA 97(20):10751-10756.
- ❖ **Hayes TB** (1998) “*Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms*”. J EXP ZOOL, 281:373-99.
- ❖ **Heath J.C., Daniel M.R., Dingle J.T., Webb M.,** (1962) “*Cadmium as a carcinogen*”. Nature, 193: 592.
- ❖ **Hecht H.,** (1986). „*Unterschiede im Schwermetallgehalt in Muskeln und Organen freilebender und im Gatte gebaltener Tiere*“. FLEISCHWIRTSCHAFT, 67: 1145-1149.
- ❖ **Hecht H.,** (1996). „*Copper in muscle and livers of calves and other mammals*“. FLEISCHWIRTSCHAFT, 76: 5, pp. 492-494.
- ❖ **Heck J., MacKenzie D.S., Rostal D, Medler K., Owens D.,** (1997) “*Estrogen induction of plasma vitellogenin in the Kemp’s Ridley Sea Turtle (Lepidochelys kempi)*” GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY 107, pp 280-288
- ❖ **Heinrich U., Peters I., Ernst H., Rittinghausen S., Dasenbrock C., König H.,** (1989) “*Investigation on the carcinogenic effects of various compounds after inhalation in hamster and mice*”. EXP. PATHOL., 37: 253.
- ❖ **Hemmer M.J., Bowman C.J., Hemmer B.L., Friedman S.D., Marcovich D., Kroll K.J., Denslow N.D.,** (2002), “*Vitellogenin mRNA regulation and plasma clearance in male sheepshead minnows, (Cyprinodon variegatus) after cessation of exposure to 17 beta -estradiol and p-nonylphenol*”, AQUAT. TOXICOL., 58 (1-2): 99-112.
- ❖ **Hemminki K. e Lindbohm M.L.,** (1986) “*Reproductive effects of welding fumes: experimental and epidemiological studies with special reference to chromium and nickel compounds*”. In: HEALTH HAZARD AND BIOLOGICAL EFFECTS OF WELDING FUMES AND GASES, R.M. Stern,

A. Berlin, A.C. Fletcher and J. Jarvisalo Eds. p. 291, Excerpta Med. Congr. Ser. 676, Elsevier, Amsterdam

- ❖ **Herbst L.H., Siconolfi-Baez L., Torelli J.H., Klein P.A., Kerben M.J. & Schumacher I.M.**, (2003) “*Induction of vitellogenesis by estradiol-17 $\beta$  and development of enzyme-linked immunosorbent assays to quantify plasma levels in green turtles (Chelonia mydas)*” COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY PART B 135, pp 551-563.
- ❖ **Hilderbrand D., Olds M., Der R., Fahim M.S.**, (1972) “*Effect of lead acetate on reproduction*”. AM. J. OBSTET. GYNECOL., **115**: 1058.
- ❖ **Hödrejärv H. e Ott R.**, (1983). “*On the occurrence of heavy metals in elks (Alces alces)*”. INT. CONF. HEAVY METALS IN THE ENVIRONMENT, September 1983, Heidelberg. Vol. 1, pp. 533-536
- ❖ **Hoffman G.R.**, (1991) “*Genetic toxicology*” in Amdur M.O., Doull J., Klaassen C.D. Eds. CASARETT AND DOULL’S TOXICOLOGY, THE BASIC SCIENCE OF POISONS, 4<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill Pergamon, New York, p 201-205.
- ❖ **Holm J.**, (1984). “*Aufbau eines ursachenorientierten Monitoring-Systems für Schadstoffbelastungen beim Wild, 2. Mitt.: Belastungen von Wild mit Schwermetallen aus unterschiedlich strukturierten Herkunftsregionen*“. FLEISCHWIRTSCHAFT, 64:613-619.
- ❖ **Hood R.D. & Bishop S.L.**, (1972) “*Teratogenic Effects of Sodium Arsenate in mice*” in ARCH ENVIRON. HEALTH 24: pp 62-65
- ❖ **Hopkins L.L. Jr**, (1965) “*Distribution in the rat of physiological amounts of injected Cr<sup>51</sup> (III) with time*”. AM. J. PHYSIOL., **209**: 731.
- ❖ **Hopkins L.L. Jr e Schwartz K.**, (1964) “*Chromium (III) binding to serum proteins, specifically siderophilin*”. BIOCHIM. BIOPHYS ACTA, **90**:484
- ❖ **Horiuchi K., Horiguchi S., Suekane M.**, (1959) “*Studies on industrial lead poisoning*”. OSAKA C. MED. J., **5**:41.
- ❖ **Houck LD & Woodley SK** (1994) “*Field studies of steroid hormones and male reproductive behavior in amphibians*”. In: Heatwole H, ed. AMPHIBIAN BIOLOGY, Vol. 2: Social Behavior. Chipping Norton, Australia: Surrey Beatty & Sons
- ❖ **Huebers H.A., Huebers E., Csiba E., Rummel W. e Finch C.A.**, (1987). “*The cadmium effect on iron absorption*”. AM. J. CLIN. NUTR., 45:108-114
- ❖ **Hursh J.B. e Mercer T.T.**, (1970) “*Measurement of <sup>212</sup>Pb loss rate from human lungs*”. J. APPL. PHYSIOL., **28**: 268.

- ❖ **Hursh J.B. e Suomela J.**, (1968)- “Absorption of  $^{212}\text{Pb}$  from the gastrointestinal tract of man”. ACTA RADIOL., 7: 108.
- ❖ **Hutchinson J. & Simmonds M.** (1991). “A review of the effects of pollution on marine turtles”. In: thames polytechnic (eds.), A GREENPEACE ECOTOXICOLOGY PROJECT, London. pp.27+II
- ❖ **Hyvarinen H. e Nygren T.**, (1993). “Accumulation of copper in the liver of moose in Finland”. JOURNAL OF WILDLIFE MANAGEMENT, 57: 3, pp. 469-474.
- ❖ **IARC**, (1976) “Cadium, nickel, some epoxides, miscellaneous industrial chemicals and general considerations on volatile anesthetics”. INTL. AGENCY RES. CANCER, Vol 11. Lyon, France, p. 39.
- ❖ **IARC**, (1980) “IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some metals and meltallic compounds”. INTL. AGENCY RES. CANCER, Vol 28. Lyon, France, p. 205
- ❖ **IARC**, (1987) “Monograph on the evaluations of carcinogenicity: an update of IARC Monographs”. WORLD HEALTH ORGANIZATION, INTL. AGENCY RES. CANCER, Vols. 1-42, Suppl. 7. Lyon, France.
- ❖ **IARC**, (1993) “Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry”. INTL. AGENCY RES. CANCER, Vol 58. Lyon, France, p. 119
- ❖ **IPCS** “Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors”, WHO/PCS/EDC/02.2, 2002 (see <http://endocrine.ei.jrc.it>).
- ❖ **Isaacson-Kerkvielt N., Baecher-Steppan L., Koller L.D. & Exon J.H.**, (1980) “Immunotoxicology studies of sodium arsenate- effects of exposure on tumor growth and cell-mediated tumor immunità” in J.ENVIRON.PATHOL.TOXICOL., 4: pp 65-79.
- ❖ **Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP & Schreck CB** (1997) “Fish Stress and Health in Aquaculture”. Cambridge: CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS, 166 pages.
- ❖ **Iwata T., Incefy G.S., Tanaka T., Fernandes G., Mendez-Botet C.J., Pih K. & Good R.A.**, (1979) “Circulating thymic hormone levels in zinc deficiency.” CELL.IMMUNOL. 47: pp 100-105.
- ❖ **Iwin L.K.; Gray S. & Oberdörster E.**, (2001) “Vitellogenin induction in painted turtle, *Chrysemys picta*, as a biomarker of exposure to enviromental levels of estradiol” ACQUATIC TOXICOLOGY 55, pp 49-60
- ❖ **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.

- ❖ **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. Ganther e W. Mertz Eds.), University Park Press, Baltimore, p. 684.
- ❖ **Jacobson-Kram D. & Montalbano D.**, (1985) in ENVIRON. MUTAGE. **7**: 787
- ❖ **Jahn W.** (1976). Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **89**. 50.
- ❖ **James B. R. e Bartlett R.J.**, (1983a) "*Behavior of chromium in soils: V. Fate of organically complexed Cr (III) added to soil*". J. ENVIRON. QUAL. **12**: 169
- ❖ **James B. R. e Bartlett R.J.**, (1983b) "*Behavior of chromium in soils. VI. Interactions between oxidation-reduction and organic complexation*". J. ENVIRON. QUAL. **12**: 173
- ❖ **Jenkins D.W.** (1980) "*Biological monitoring of toxic trace metals. Volume 2. Toxic trace metals in plants and animals of the world. Part II. Mercury*". U.S. ENVIRON. PROTECTION AGENCY REP. 600/3-80-091:779-982.
- ❖ **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
- ❖ **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.
- ❖ **Johnson F.A. e Stonehill R.B.**, (1961). "*Chemical pneumonitis from inhalation of zinc chloride*". DIS. CHEST., **40**: 619-624.
- ❖ **Jones R.L.**, (2002). "*Zinc, iron, and sodium in hair of deer from areas of contrasting soil productivity*". BIOLOGICAL TRACE ELEMENT RESEARCH, **86**, 3: 217-226.
- ❖ **Kägi 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
- ❖ **Kakin H.W.** (1973). ADV. CHEM. SERV., **123**. 96
- ❖ **Kanisawa M. e Schroeder H.A.**, (1969) "*Renal arterial changes in hypersensitive rats given cadmium in drinking water*" EXP. MOL. PATHOL., **10**: 81

- ❖ **Kao R.L.C. e Forbes R.M.**, (1973) “*Effects of lead on heme-syntesising enzymes and urinary aminolevulinic acid in the rat*”. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., **143**: 234
- ❖ **Kawanishi S., Inoue S., Sano S**, (1986) “*Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide*”. J. BIOL. CHEM., **261**: 5952.
- ❖ **Kelly M.E., Fitzgerald S.D., Aulerich R.J., Balander R.J., Powell D.C., Stickle R.L., Stevens W., Cray C., Tempelman R.J., Bursian S.J.**, (1998). «*Acute effects of lead, steel, tungsten-iron, and tungsten-polymer shot administered to game-farm mallards*”. JOURNAL OF WILDLIFE DISEASE. 34(4): 673-687
- ❖ **Kenyon L.O., Landry A.M., Jr., Gill G.A.**, (2001). “*Trace metal concentrations in blood of the kemp’s ridley sea turtle (Lepidochelys kempii)*”. CHELONIAN CONSERVATION AND BIOLOGY 4 (1): pp 128-135.
- ❖ **Khalid R.A., Gambrell R.P., Patrick W.H. Jr**, (1981) “*Chemical availability of cadmium in Mississippi River sediment*”. J. ENVIRON. QUAL. **10**: 523.
- ❖ **Kikuyama S, Kawamura K, Tanaka S & Yamamoto K** (1993) “*Aspects of amphibian metamorphosis:hormonal control*”. INT REV CYTOL, 145:105-148.
- ❖ **Kim J.P., Fitzgerald W.F.**, (1986) “*Sea-air partitioning of mercury in the equatorial Pacific Ocean*”. SCIENCE 231:1131-1133
- ❖ **Kime D.E., Nash J.P., Scott A.P.** (1999), “*Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics*”, AQUACULT., **177**: 345-352.
- ❖ **Klaassen C.D.**, (1990) “*Heavy metals and heavy-metal antagonists*”. 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
- ❖ **Klasing K.C.**, (1984). „*Effect of inflammatory agents and interleukin-1 on iron and zinc metabolism*”. AM. J. PHYSIOL., 247:R901-R904.
- ❖ **Kleiminger J.**, (1983). „*Untersuchungen über die Eignung von freilebenden Wildarten als Bioindikatoren zur Erfassung von flächenhaften Schwrmetallkontaminationen in Niedersachsen*“. PHD THESIS, Hanover.
- ❖ **Klein-Langenhoff U. e Vetter H.**, (1986). „*Cadmiumanreicherung von Futterpflanzen durch Aufnahme aus Boden und Luft. In: Zum Carry-over von Cadmium*“. SCHRIFTENREIHE DES BUNDESMINISTERS FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND FORSTEN. R.A, H 335, pp. 30-45.

- ❖ **Koelsch F.**, 1959- Bleivergiftung and Zahn Ausfall. Zbl. Anheitsmed, **9**: 114.
- ❖ **Koller L.D. e Kovacic S.**, (1974) “*Decreased antibody formation in mice exposed to lead*”. NATURE, **250**: 148.
- ❖ **Koller L.D. e Roan J.G.**, (1977) “*Effects of lead and cadmium on mouse peritoneal macrophages*”. J. RETOCULOENDOTHEL. SOC., **21**: 7.
- ❖ **Koller L.D., Exon J.H., Talcott P.A., Osborne C.A. e Henningsen G.M.**, (1986) “*Immune response in rats supplemented with selenium*” CLIN.EXP.IMMUNOL. **63**, pp 570-576.
- ❖ **Kornegay E.T., van Heugten P.H.G., Lindemann M.D., Blodgett D.J.**, 1989. “*Effect of biotin and high copper levels on performance and immune response of weanling pigs*”. J. ANIM. SCI., **67**:1471-1477.
- ❖ **Kotsonis F.N. e Klaassen C.D.**, (1977) “*Toxicity and distribution of cadmium administered to rats at sublethal doses*”. TOXICOL. APPL. OHARMACOL., **41**: 667.
- ❖ **Kottferová J. e Koréneková B.**, (1998). “*Distribution of Cd and Pb in the tissues and organs of free-living animals in the territory of Slovakia*”. BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., **60**:171-176.
- ❖ **Kraintz L.,Talmage R.V.**, (1952) “*Distribution of radioactivity following intravenous administration of trivalent chromium 51 in the rat and rabbit*”. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., **81**: 490
- ❖ **Kreuzer W. e Rosopulo A.**, (1981). „*Zur gegenwärtigen Rückstandssituation bei Cadmium, Blei, Quecksilber und Arsen in Fleisch u. Organen von Schlachttieren*“. ARCH. LEBENSMITTELHYG., **32**, 181-199.
- ❖ **Krishnaja A.P. e Rege M. S.**, (1982) “*Induction of chromosomal aberrations in fish Boleophthalmus dussumieri after exposure in vivo to mitomycin C and heavy metals mercury, selenium and chromium*”. MUTAT. RES., **102**: 71
- ❖ **Kuiters A.T.**, (1996). „*Accumulation of cadmium and lead in red deer and wild boar at the Veluwe, the Netherlands*”. THE VETERINARY QUARTERLY, Vol.18, pp. S134-S135.
- ❖ **Kumada H., Kimura S., Yokote M.**, (1980) “*Accumulation and biological effects of cadmium in rainbow trout*”. BULL. JPN. SOC. SCI. FISH., **46**: 97
- ❖ **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. (Tokyo), **22**: 157.
- ❖ **Kunifuji Y., Nakamura T. e Tagasugi M.**, (1987). “*Influence of cadmium on the distribution of the essential trace elements zinc and copper in the liver and kidneys of rat*”. BIOL. TRACE ELEMENTS RES., **14**:237-248

- ❖ **Lafuente A. e Esquifino A.I.**, (2002). “*Effects of oral cadmium exposure through puberty on plasma prolactin and gonadotropin levels and amino acid contents in various brain areas in pubertal male rats*”. NEUROTOXICOLOGY, 23, 2:207-213
- ❖ **Laj S., Jain V.K., Tandon S. K.**, (1984) “*Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium IV: biochemical changes in blood and liver of rat*”. J. ENVIRON. BIOL. 5: 29.
- ❖ **Lamb T, Bickham JW, Lyne TB & Gibbons JW** (1995) “*The slider turtle as an environmental sentinel: Multiple tissue assays using flow cytometric analysis*”. ECOTOXICOL, 4(1):5-13.
- ❖ **Lampert P., Garro F., Pentschew A.**, (1967) “*Lead encephalopathy in suckling rats*”. In: BRAIN EDEMA, I Klatzo e F. Seitelberger Eds., Springer Verlag, New York, p. 207.
- ❖ **Lance VA** (1994) “*Introduction: Environmental sex determination in reptiles: Patterns and processes*”. J EXP ZOOL, 270:1-2.
- ❖ **Langård S. e Norseth T.**, (1979) « *Chromium* ». In: HANDBOOK ON THE TOXICOLOGY OF METALS. L. Friberg, G. Nordberg e V.B. Vouk Eds., Elsevier, Amsterdam, p.383
- ❖ **Langård S.**, (1990) “*One hundred years of chromium and cancer: a review of epidemiological evidence and selected case reports*”. AM. J. IND. MED., 17: 189
- ❖ **Larsson D.G.J., Adolfsson-Erici M., Parkkonen J., Pettersson M., Berg A.H., Olsson P.-E., Förflin L.** (1999), “*Ethinylestradiol- an undesired fish contraceptive?*”, AQUAT. TOXICOL., 45: 91-97
- ❖ **Laschi-Loquerie A., Descotes J., Tachon P., Evreux J.C.**, (1984) “*Influence of lead acetate on hypersensitivity. Experimental study*”. J. IMMUNOPHARMACOL., 6: 87.
- ❖ **Laschi-Loquerie A., Eyraud A., Morisset D., Sanou A. Tachon P., Veysseyre C., Descotes J.**, (1987) “*Influence of heavy metals on the resistance of mice toward infection. Immunopharmacol*”. IMMUNOTOXICOL., 9: 235.
- ❖ **Latimer K.S., Jain A.V., Inglesby H.B., Clarkson W.D., & Johnson G.B.**, (1989) “*Zinc-induced hemolytic anemia caused by ingestion of pennies by a pup*”. JOURNAL OF THE AMERICAN VETERINARY ASSOCIATION 195, pp 77-80
- ❖ **Laurent L., Casale P., Bradai M.N., Godley B.J., Gerosas G., Broderick A.C., Schroth W., Schierwater B., Levy A.M., Freggi D., El-Mawla E.M., Hadoud D.A., Gomati H.E., Domingo M., Hadjichristophorou M.**,

- Kornaraky L., Demirayak F. e Gautier C.H.** (1998). “*Molecular resolution of marine turtle stock composition in fishery bycatch: a case study in the Mediterranean*”. *MOLECULAR ECOLOGY*, 7: 1529-1542.
- ❖ **Lawrence D.A.**, (1981) “*In vivo and in vitro effects of lead on humoral and cell-mediated immunity*”. *INFECT. IMMUNOL.*, **31**: 136.
  - ❖ **Le Boeuf R.A. & Hoekstra W.G.** (1983). *J. Nutr.* 113: 845
  - ❖ **Lee D. e Matrone G.**, (1969). “*Iron and copper effects on ceruloplasmin activity of rats with zinc-induced copper deficiency*”. *PROC. SOC. EXP. BIOL. MED.*, 130:1190-1193.
  - ❖ **Lee H.J. e Jones G.B.**, (1976). “*Interactions of selenium, cadmium and copper in sheep*”. *AUSTR. J. AGRIC. SCI.*, 27:447-452
  - ❖ **Lee-Feldstein A.**, (1986) in *J.OCCUP.MED.* 28: 296
  - ❖ **LeFleur G.J.Jr** (1998), “*Vitellogenins and vitellogenesis*”. In: Knobil E. & Neil J.D., (eds.), *ENCYCLOPEDIA OF REPRODUCTION*, 4: 985-993.
  - ❖ **Leonard A. & Gerber G.B.**, (1989) “*Zinc toxicit: does it exist?*”. *JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF TOXICOLOGY* 8, pp 1285-1290.
  - ❖ **Leonard A. e Lauwerys R.R.**, (1980) “*Carcinogenicity and mutagenicity of chromium*”. *MUTAT. RES.* **76**: 227
  - ❖ **Leonard A. e Lauwerys R.R.**, (1980) in *MUTAT RES.* 75: 873
  - ❖ **Lessler M.A. e Walters M.I.**, (1973) “*Erythrocyte osmotic fragility in the presence of lead or mercury*”. *PROC. SOC. EXP. BIOL. MED.*, **142**. 548.
  - ❖ **Levander O.A., Morris V.C., Higgs D.J., Feretti R.J.**, (1975) “*Lead poisoning in vitamin E deficient rats* ». *J. NUTR.*, **105**. 1481.
  - ❖ **Lilis** (1981): “*Long-term occupational lead exposure: Chronic nephropathy and renal cancer: A case report*”. *AM J IND MED* 2:293-297.
  - ❖ **Lindsay R.C., Dimmick R.W.**, (1983) “*Mercury residues in wood ducks and wood duck foods in eastern Tennessee*”. *J. WILDL. DIS.*, 19:114-117
  - ❖ **Løbersli E., Gjengedal E. e Steinnes E.**, (1991). „*Impact of soil acidification on the mobility of metals in the soil-plant system*. In: *Heavy metals in the environment*”. *VERNET JP (ED.), ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM*, pp. 37-53.
  - ❖ **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.
  - ❖ **Lohiya N.K., Arya M., Shivapuri V.S.**, (1976) “*The effects of cadmium chloride on the testis and epididymis of the Indian hanuman lanugr, Presbytis entellus entellus Dufresne*”. *ACTA EUR. FERTIL.*, **7**: 339

- ❖ **Lotti G., Galoppini C. e Lo Moro A.** (1966). ATTI SOC. TOSC. SC. NAT., MEM, 52:490.
- ❖ **Lucisano A.** (1994) “*Arsenico*” in TOSSICOLOGIA VETERINARIA. A cura di C.Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp 140-145.
- ❖ **Lucisano A.** (1994) “*Cadmio*” in TOSSICOLOGIA VETERINARIA. A cura di C.Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp 167-170
- ❖ **Lucisano A.,** (1994) “*Mercurio*”. In TOSSICOLOGIA VETERINARIA. A cura di Beretta C., Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 150-156.
- ❖ **Luecke R.W., Simonel C:E: & Fraker P.J.,** (1978) “*The effect of restricted dietary intake on the antibody mediated response of the zinc deficient A/J mouse*”. J.NUTR. 108: pp 881-887
- ❖ **Lumeij J.T.,** (1985). “*Clinicopathologic aspects of lead poisoning in birds: a review*”. THE VETERINARY QUARTERLY, 7, 133-138.
- ❖ **Lusky K., Bohm D., Stoyke M., Hecht H., Luthardt M. e Lippert A.,** (1992). “*Untersuchungen auf Umweltkontaminanten in Schwarz-, Rot-, Reh-, Muffel- und Damwild aus dem Biosphärenreservat Schorfheide-Chorin*“. ARCHIV. FÜR LEBENSMITTELHYGIENE, 43:121-148.
- ❖ **Ma W.,** (1996). “*Lead in mammals*”. In: ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS IN WILDLIFE. Beyer W.N., Heinz G.H. e Redmon-Norwood A.W. (Eds), Lewis Publ., Boca Raton, Florida, pp. 281-296.
- ❖ **MacKenzie R.D., Anwar R.A., Byerrum R.U., Hoppert C.A.,** (1959) “*Absorption and distribution of Cr<sup>51</sup> in the albino rat*”. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS., 79: 200.
- ❖ **MacKenzie R.D., Byerrum R.U., Dekker C.F., Hoppert C.A.,** (1958) „*Chronic toxicity studies. II. Hexavalent and trivalent chromium administered in drinking water to rats*”. AMA ARCH. IND. HEALTH, 18: 232.
- ❖ **Macneil J.D., Patterson A.R., Fesser C.D., Salisbury C.D. e Tessaro S.V.,** (1987).” *Trace metal and persistent organochlorine levels in woold bison (Bison bison athabasce) from the Mackenzie Bison Sanctuary*”. INT. J. ENVIRON. ANAL. CHEM., 30:145-153.
- ❖ **Magee A.C e Matrone G.,** (1960). “*Studies on growth, copper metabolism, and iron metabolism of rats fed high levels of zinc*”. J. NUTR., 72:233-242.
- ❖ **Maitani T., Watahiki A., Suzuki K.T.,** (1985). “*Induction of metallothionein after lead administratin by three injection routes in mice*”. NATIONAL INSTITUTE FOR ENVIROMENTAL STUDIES, Yabate, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan.

- ❖ **Malavè I e DeRuffino D.T.**, (1984) “*Altered immune response during cadmium administration in mice*”. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **74**: 46.
- ❖ **Malcom D.**, (1971) “*Potential carcinogenic effect of cadmium in animals*”. ANN. OCCUP. HYG., **15**: 33.
- ❖ **Mandal B.K. & Suzuki K.T.**, (2002) “*Arsenic round the world: a review*” in TALANTA 58: pp 201-235.
- ❖ **Manninen S. e Tansakanen N.**, (1993). “*Transfer of lead from shotgun pellets to humus and three plant species in a finish shooting range*”. ARCHIVES OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY, **24**, 410, 414.
- ❖ **Manton W.I. e Cook J.D.**, (1984) “*High accuracy (stable isotope dilution) measurements of lead in serum and cerebrospinal fluid*”. BRIT. J. IND. MED., **41**: 313.
- ❖ **Marcato P.S.** (2002): PATOLOGIA SISTEMATICA VETERINARIA, Edagricole Ed., pag.856, 1179-1180
- ❖ **Markovac J e Goldstein G.W.**, (1988) “*Lead activates protein kinase C in immature rat brain microvessel*”. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **96**: 14.
- ❖ **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., Connecticut, p. 383
- ❖ **Mateo R., Guitart R.**, (2000). “*The effects of grit supplementation and feed type on steel-shot ingestion in mallards*”. PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE. **44**:3-4, 221-229; 21 ref.
- ❖ **Mattson P., Albanus L. e Frank A.**, (1981). “*Cadmium and some other elements in liver and kidney from moose (Alces alces)*”. VÄR FÖDA, **33**:335-345
- ❖ **May T.W. e McKinney G.L.**, (1981) “*Cadmium, lead, mercury, arsenic, and selenium concentrations in freshwater fish, 1976-77- National Pesticide Monitoring Program*”. PESTIC. MONITOR. J., **15**: 14.
- ❖ **Mayer L. M., Schick L.L., Rossi P.M., Patterson H.H., Chang C.A., Bause D.E., Fink L.K. Jr.**, (1981) “*Analysis, distribution, and interactions of chromium in the aquatic environment*”. UNIV. MAINE AT ORONO, LAND AND WATER RES. CENT., COMPL. REP. PROJ. B-016-ME. 58 pp.
- ❖ **Mc Nabb FMA** (1993), “*Thyroid Hormones*”, Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.

- ❖ **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
- ❖ **Meek E.S., (1959)** “*Cellular changes induced by cadmium in mouse testis and liver*”. BR. J. EXP. PATHOL., **40**: 503
- ❖ **Merian E., (1991).** “*Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis and biological relevance*”. VHC, Weinheim 1991.
- ❖ **Mertz W. e Roginski E.E., (1971)** “*Chromium metabolism: the glucose tolerance factor*”. In: Mertz W., Cornatzer W.E. Eds. NEWER TRACE ELEMENTS IN NUTRITION. Dekker, New York, p. 123.
- ❖ **Mertz W., (1969)** “*Chromium occurrence and function in biological systems*”. PHYSIOL. REV., **49**: 163
- ❖ **Metz E.N. e Sagone A.L. Jr., (1972).** “*The effect of copper on erythrocyte exose monophosphate shunt pathway*”. J. LAB. CLIN. MED., 80:405-413.
- ❖ **Mewes K.R., Latz M., Golla H., Fischer A. (2002),** “*Vitellogenin from female and estradiol-stimulated male river lampreys (*Lampetra fluviatilis* L.)*”, J. EXPER. ZOOL., **292**: 52-72.
- ❖ **Mewes K.R., Latz M., Golla H., Fischer A. (2002),** “*Vitellogenin from female and estradiol-stimulated male river lampreys (*Lampetra fluviatilis* L.)*”, J. EXPER. ZOOL., **292**: 52-72.
- ❖ **Meyer H.H.D. (1999),** “*Comparative aspects of estrogen biosynthesis and metabolism and the endocrinological consequences in different animal species*”. In: Oettel M. & Schillinger E., (eds.), ESTROGENS AND ANTIESTROGENS II. Berlin: Springer-Verlag, 575-602.
- ❖ **Miller W.J., Blackmore D.M., Gentry R.P. e Pate F.M., (1969).** “*Effect of dietary cadmium on tissue distribution of cadmium following a single oral dose in young goats*”. J. DAIRY SCI., 52:2029-2035
- ❖ **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
- ❖ **Miller Publishing Company, (1975)** FEED ADDITIVE COMPENDIUM vol 13, Minneapolis
- ❖ **Miller W.J., Blackmore D.M., Gentry R.P. e Pate F.M., (1970).** “*Effects of high but non-toxic levels of zinc in practical diets on Zn<sup>65</sup> and Zn metabolism in Holstein calves*”. J. NUTR., 100:893-902.

- ❖ **Mills C.F. e Dalgarno A.C.**, (1972) “*Copper and zinc status of ewes and lambs increased dietary concentrations of cadmium*”. NATURE, **239**: 171
- ❖ **Mills J.S., Johnson J.D.**, (1985) “*Metal ions as allosteric regulators of calmodulin*”. J. BIOL. CHEM., **260**: 15100
- ❖ **Milton S. & Lutz P.** (2003). “*Oil and Sea Turtles. Biology, planning, and response*”. Florida Atlantic University, Shikenaka G., Hoff R.Z., Yender A. and Mearns J., NOAA’s National Ocean Service/Office of Response and Restoration/Hazardous Materials Response Division
- ❖ **Mital V.P., Wahal D.K.e Bansal O.P.**, (1966). “*A study of erythrocyte glutathione in acute copper sulfating poisoning*”. INDIAN. J. PATHOL. BACT., **9**:156-162.
- ❖ **Mitchell R.R., Fitzgerald S.D., Aulerich R.J., Balander R.J., Powell D.C., Tempelman R.J., Cray C., Stevens W., Bursian S.J.**,(2001). “*Hematological effects and metal residue concentrations following chronic dosing with tungsten-iron and tungsten-polymer shot in adult game-farm mallards*”. JOURNAL OF WILDLIFE DISEASES, **37**(3),pp.459-467.
- ❖ **Miyake M. Murata I., Osabe m., Ono T.**, (1979) “*Effect of metal cations on misincorporation by E.Coli DNA polymerises*”. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., **77**: 854.
- ❖ **Monteverdi G.H., Di Giulio R.T.** (1999), “*An enzyme-linked immunosorbent assay for estrogenicity using primary hepatocyte cultures from the channel catfish (Ictalurus punctatus)*”, ARCH. ENVIRON. TOXICOL., **37**: 62-69.
- ❖ **Moonsie-Shageer S. e Mowat D.N.**, (1993) “*Effect of level of supplemental chromium on performance, serum constituents and immune status of stressed feeder calves*”. J. ANIM. SCI., **71**: 232.
- ❖ **Morris, J. G., W. S. Cripe, H. L. Chapman, Jr. , D. F. Walker, J. B. Armstrong, J. D. Alexander, Jr., R. Miranda, A. Sanchez, Jr., B. Sanchez, J. R. Blair-West, and D. A. Denton.** (1984).”*Selenium deficiency in cattle associated with Heinz bodies and anemia*”. SCIENCE **223**:491-493.
- ❖ **Morrow P.E., Beiter H. Amato F., Gibb F.R.**, (1980) “*Pulmonary retention of lead: an experimental study in man*”. ENVIRON. RES., **21**: 373.
- ❖ **Mossop R.T.**, (1983) “*Effect of chromium (III) on fasting glucose, cholesterol and cholesterol HDL levels in diabetics*”. CENT. AFR. J. MED., **29**: 80.
- ❖ **Müller S., Gillert K.E., Krause C., Gross U., Age-Shehr J.L., Diamantstein T.**, (1977) “*Suppression of delayed type hypersensitivity of mice by lead*”. EXPERIENTIA, **33**: 667.

- ❖ **Müller S., Gillert K.E., Krause C., Jautzke G., Gross U., Diamantstein T.,** (1979) “*Effects of cadmium on the immune system of mice*”. EXPERIENTIA, 35: 909.
- ❖ **Munk L., Faure G., Pride D.E., Bigham J.M.,** (2002). “*Sorption of trace metals to an aluminum precipitate in a stream receiving acid rock-drainage; Snake River, Summit County, Colorado*”. APPLIED GEOCHEMISTRY, 17, 4: 421-430.
- ❖ **Murthy L., Klevan L.M. e Petering H.G.,** (1974). “*Interrelationships of zinc and copper nutrition in the rat*”. J. NUTR., 104:1458-1465.
- ❖ **Nakashima K., Wakisaka T., Fujiki Y.,** (1988) “*Dose-response relationship of cadmium embryotoxicity in cultured mouse embryos*”. REPROD. TOXICOL., 1: 293.
- ❖ **NAS,** (1977) “*Arsenic*” in NATL. ACAD. SCI. Washington D.C. pp 332
- ❖ **NAS,** (1978) “*An assessment of mercury in the environment*”. NATL. ACAD. SCI., Washington, DC, 185
- ❖ **NAS,** (1979) “*Zinc*” UNITED STATES NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL SUBCOMMITTEE ON ZINC. University Park Press, Baltimore Md. 471 pp.
- ❖ **Nath I., Sood S.K. e Nayak N.C.,** (1972). “*Experimental siderosis and liver injury in the rhesus monkey*”. J. PATHOL., 106:103-111.
- ❖ **National Research Council** (1990) “*Decline of the Sea Turtles: causes and preventions*”. NATIONAL ACADEMY PRESS, Washington.
- ❖ **Neethling L.P., Brown J.J.M. e De Wet P.J.** (1968). *J.S. Afr. Med. Ass.* 30: 25.
- ❖ **Neiger R.D.** (2001) “*Arsenic*” in SMALL ANIMAL TOXICOLOGY Ed. W.B. Saunders Company cap. 24 pp. 420-430
- ❖ **Nieboer E., Yassi A., Haines A.T., Jusys A.A.,** (1984) “*Effects of chromium compounds on human health*”. OCCUPATIONAL HEALTH AND SAFETY DIVISION, Ontario Ministry of Labour, Toronto, Canada.
- ❖ **Niemi A., Venäläinen E.R., Hirvi T. e Valtonen M.,** (1993). “*Heavy metals in muscle, liver and kidney on Finnish elk in 1980-81 and 1990*”. BULL. OF ENVIRON. CONTAM. AND TOXIC., 50:834-841.
- ❖ **Nimrod A.C. e Benson W.H.** (1996), “*Estrogenic Responses to Xenobiotics in Channel Catfish (Ictalurus punctatus)*”, MARINE ENVIRONMENTAL RESEARCH, 42 (1-4): 155-160.
- ❖ **Nolan C.V. e Shaikh Z.A.,** (1992). “*Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms*”. TOXICOLOGY, 73:127-146.

- ❖ **Nomiyama K.**, (1982) “*Carcinogenicity of cadmium*”. JPN. J. IND. HEALTH, **24**: 13.
- ❖ **Nordberg G.F. & Anderson O.**, (1981) in ENVIRON. HEALTH PROSPECT **40**: 65
- ❖ **Nordberg G.F.**, (1971) “*Effects of acute and chronic cadmium exposure on the testicles of mice*”. ENVIRON. PHYSIOL., **1**: 171.
- ❖ **Nordberg G.F., Kjellström T., Nordberg M.**, (1985) „*Kinetics and metabolism*“. In: CADMIUM AND HEALTH, VOL. I, EXPOSURE, DOSE AND METABOLISM, Frieberg L., Elinder C.G., Kjellström T. e Nordber G.F. Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, p.103
- ❖ **Nordenson I & Backman L.**,(1991) in HUM.HERED. **41**: 71
- ❖ **Nordstrom S., Beckman L., Norderson I.**, (1978) HEREDITAS **88**: 43
- ❖ **Nordstrom S., Beckman L., Norderson I.**, (1979a) HEREDITAS **90**: 297
- ❖ **Norin H., Vahter M., Christakopoulos A. e Sandstrom M.** (1985). “*Concentration of inorganic and total arsenic in fish from industrially polluted water*”. CHEMOSPHERE **14**: 1125-334.
- ❖ **Norman S. & Litwak G.** (1998), “*Hormones*”, Second Edition, San Diego, CA: Academic Press.
- ❖ **Norris D.** (1997), “*Vertebrate Endocrinology*”, Third Edition. San Diego, CA: ACADEMIC PRESS.
- ❖ **Norris D.O.** (1999), “*Thyroid hormones in subavian vertebrates*”, In: ENCYCLOPEDIA OF REPRODUCTION, Vol. 4. San Diego, CA: Academic Press, 807-812.
- ❖ **Norseth T.** (1981). “*The carcinogenicity of chromium*”. ENVIRON. HEALTH PERSPECT., **40**:121.
- ❖ **Nowak F.**, (1995). „*Blei und Cadmium in Leber und Nieren von Wildtieren aus Wien*“. MASTER’S THESIS, Vienna University, Vienna, Austria.
- ❖ **NRC (National Research Council)**, (1999) “*Arsenic in drinking water*” NATIONAL ACCADEMY PRESS, Washington DC.
- ❖ **NRC**, (1980). “*Mineral tolerance of animals*”. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES-NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Washington DC.
- ❖ **NRCC** (1978) “*Effects of arsenic in the Canadian enviroment*” NATL.RES.COUN. Canada Publ. No.NRCC 15391,pp. 349
- ❖ **Nriagu J.O.**, (1979) “*The biogeochemistry of mercury in the environment*”. ELSEVIER/NORTH-HOLLAND BIOMEDICAL PRESS, New York, 696.
- ❖ **NTP** (2001) “*National Toxicology Program’s Report of the Endocrine Disruptors Low Dose Peer Review*”. NATIONAL TOXICOLOGY

PROGRAM, NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH  
SCIENCE, Research Triangle Park, NP.,

<http://ntpserver.niehs.nih.gov/htdocs/liason/LowDosePerFinalrpt.pdf>

- ❖ **O’Flaherty E.J.**, (1995) “*Chromium toxicokinetics*”. 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. 215
- ❖ **O’Hara T.M., Carroll G., Barboza P., Mueller K., Blake J., Woshner V. e Willetto C.**, (2001). “*Mineral and heavy metal status as related to a mortality event and poor recruitment in a moose population in Alaska*”. J. OF WILDL. DISEASE, 37, 3:509-522
- ❖ **Oberdörster G.**, (1986) “*Airborne cadmium and carcinogenesis of the respiratory tract*”. SCAND. J. WORK ENVIRON. HEALTH, 12: 523
- ❖ **Oberdörster G., Cox C.**, (1990) “*Carcinogenicity of cadmium in animals. What is the significance for man?*” CHEM. ENVIRON. TOXICOL., 27: 181
- ❖ **Ochi T., Ishiguro T., Ohsawa M.**, (1983) “*Participation of active oxygen species in the induction of DNA single-strand scissions by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells*”. MUTAT. RES., 122:169.
- ❖ **Ogden L., Edwards W.C., & Nail N.A.**, (1988). “*Zinc Intoxication in a dog from ingestion of copper clad zinc pennies*” VETERINARY AND HUMAN TOXICOLOGY 30, pp 577-578
- ❖ **Okui T. & Fujiwara Y.**, (1986) MUTAT.RES. 172: 69
- ❖ **Okumura H., Todo T., Adachi S., Yamauchi K.**, (2002), “*Changes in Hepatic Vitellogenin mRNA Levels during Oocyte Development in the Japanese Eel, Anguilla japonica*”, GEN. COMP. ENDOCRINOL. 125 (1): 9-16.
- ❖ **Okuno A., Katayama H., Nagaawa H.** “*Partial characterization of vitellin and localization of vitellogenin production in the terrestrial isopod, Armadillidium vulgare.*” da COMPARTIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY (B) 2000, 126: pag. 397-407
- ❖ **Olafsson PG, Bryan AM, Bush B. & Stone W** (1983) “*Snapping Turtles: A Biological Screen For Pcb’s*”. CHEMOSPHERE, 12:1525-1523.
- ❖ **Oldiges H., Hochrainer D., Glaser U.**, (1989) “*Preliminary results from a long-term inhalation study with four cadmium compounds*”. TOXICOL. ENVIRON. CHEM., 23: 35.
- ❖ **Onkelinx, C.** (1977). “*Compartment analysis of metabolism of chromium (III) in rats of various ages*”. AM. J. PHYSIOL. 232:E478-E484.

- ❖ **Orós J., Torrent A., Ruiz A., Calabuig P. e Déniz S.** (2000). “*Patologías y causas de mortalidad en tortugas marinas varadas en las Islas Canarias durante 1998-1999* ». MEDIO AMBIENTE CANARIAS, 16 : 23-27.
- ❖ **Overby L.R. and Frederickson R.L.** (1963) “*Metabolic stability of arsanilic acid in chickens*” J.Agric.Food Chem. 11: 378
- ❖ **Overby L.R. and Frost D.V.,** (1960) “*Excretion studies in swine fed arsenilic acid*” in J.ANIM.SCI. 19:140
- ❖ **Pain D.J.,** (1992). “*Lead poisoning of waterfowl: a review*”. In: LEAD POISONING IN WATERFOWL, PROCEEDING OF THE JWRB WORKSHOP, Bruxelles, Belgium, 1991. di Pain D.J.. IWRB Special Publication No 16. Slimbridge, United Kingdom
- ❖ **Palmer BD & Guillette LJ Jr** (1988) “*Histology and functional morphology of the female reproductive tract of the tortoise Gopherus polyphemus*”. AM J ANAT, 183(3):200-211.
- ❖ **Palmer BD & Guillette LJ Jr** (1990) “*Morphological changes in the oviductal endometrium during the reproductive cycle of the tortoise, Gopherus polyphemus*”. J MORPHOL, 204:323-333.
- ❖ **Palmer BD & Guillette LJ Jr** (1992) “*Alligators provide evidence for the evolution of an archosaurian mode of oviparity*”. Biol Reprod, 46(1):39-47.
- ❖ **Palmer BD, Perkins MJ, Massie K, Simon MS & Uribe UCA** (1997) “*Reproductive anatomy and physiology of reptiles: evolutionary and ecological perspectives*”. In: Ackerman L, ed. THE BIOLOGY, HUSBANDRY AND HEALTH CARE OF REPTILES AND AMPHIBIANS, Vol. III. T.F.H. Publications. pp.54-87. Neptune City, N.J.
- ❖ **Parizek J. e Zahox Z.,** (1956) “*effect of cadmium salt on testicular tissue*”. NATURE, 177: 1036
- ❖ **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
- ❖ **Parizek, J,** (1957) “*The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc*”. J. ENDOCRINOL., 15: 56.
- ❖ **Parker K.L., Gillingham M.P., Hanley T.A. e Robbins C.T.,** (1996).” *Foraging efficiency: energy expenditure versus energy gain in free-ranging black-tailed deer*”. CANADIAN JOURNAL OF ZOOLOGY, 74:442-450.
- ❖ **Parnham M.J., Winkelmann J. e Leyck S.,** (1983) “*Macrophage, lymphocyte, and chronic inflammatory response in selenium deficient rodents:*

*association with decreased glutathione peroxidase activity*”  
INT.J.IMMUNOPHARMACOL 5, pp 455-461

- ❖ **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.
- ❖ **Pershagen G. & Vahter M.**, (1979) “*Arsenic-a toxicological and epidemiological appraisal*” in NATURVARDSVERKET RAPP. SNV PM 1128, Liber Tryck, Stockholm pp 265
- ❖ **Peterson M.L., Hernes P.J., Thoreson D.S., Hedges J.I., Lee C., Wakeham S.G.**, (1993). “*Field evaluation of a valved sediment trap*”. LIMNOL. OCEANOGR., 38 (8): 1741-1761.
- ❖ **Peterson P.J. & Butler G.W.** (1962). “*Aust. Journal Biol. Sci*”. 15: 126.
- ❖ **Peterson P.J. e Alloway B.J.** (1979). “*Cadmium in soils and vegetation. In: The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*”, WEBB M. (ED.), VOL.2. ELSEVIER/NORTH-HOLLAND BIOMEDICAL PRESS, AMSTERDAM, NEW YORK, OXFORD, pp. 45-92.
- ❖ **Petrilli F.L. e DeFlora S.**, (1988) “*Metabolic reduction of chromium ad a threshold mechanism limiting its in vivo activity*”. SCI. TOTAL ENVIRON., **71**: 357
- ❖ **Pettersen A.J., Andersen R.A. e Zachariassen K.E.**, (2002). „*Effects of dietary intake of trace metals on tissue contents of sodium and calcium in mice (Mus musculus)*”. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY. C-TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY, 132, 1:53-60.
- ❖ **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.
- ❖ **Pilch S.M., Begearmi M.M. La Vorgna M.W. e Combs G.F.** (1980). *Fed. Proc.* 39: 339.
- ❖ **Pinter J & Thomas P** (1997) “*The ovarian pregestogen receptor in the spotted seatrout, Cynoscion nebulosus, demonstrates steroid specificity intermediate between progesterone and glucocorticoid*”
- ❖ **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.
- ❖ **Pokorny B. e Ribarič-Lasnik C.**, (2000). “*Lead, Cadmium and Zinc in tissues of Roe Deer (Capreolus capreolus) near the lead smelter in the Koroska*

- Region (Northern Slovenia)*". BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., 64:20-26.
- ❖ **Pokorny B.**, (2000). «*Roe deer *Capreolus capreolus* as an accumulative bioindicator for heavy metals in Slovenia*». WEB ECOLOGY 1:42-54
  - ❖ **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
  - ❖ **Popper H., Thomas L.B., Telles N.C., Falk H. & Selikoff I.J.** (1978) "*Development of hematic angiosarcoma in man induced by vinyl chloride thorotrast and arsenic*" AMERICAN JOURNAL OF
  - ❖ **Porterfield SP** (1994) "*Vulnerability of the developing brain to thyroid abnormalities: environmental insults to the thyroid system*". ENVIRON HEALTH PERSPECT, 102:125-130.
  - ❖ **Post M. A. e P. G. Campbell.**, (1980) "*Lead chromate pigments—a literature survey on environmental and toxic effects*". U.S. DEP. COMM. NAT. BUR. STAND. REP. NBSIR 80-1974. 38 pp.
  - ❖ **Powell G.W., 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
  - ❖ **Preston A.M., Dowdy R.P., Preston M.A., Freeman J.N.**, (1976) "*Effect of dietary chromium on glucose tolerance and serum cholesterol in guinea pigs*". J. NUTR., **106**: 1391
  - ❖ **Prisco M., Vallente S., Romano M., Ricchiari L., Liguoro A., Laforgia V., Limatolo E. e Andreccetti P.** "*Ovarian Follicle cells in *Torpedo marmorata* synthesize Vitellogenin*" da MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT 2004, 67: pag. 424-429
  - ❖ **Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumper J.P.** (1994), "*Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works*", Chem. Ecol., **8**: 275-285.
  - ❖ **Raghavan S.R.V., Culver B.D., Gonick H.C.**, (1980) "*Erythrocyte lead-binding protein after occupational exposure. I. Relationship to lead toxicity*". ENVIRON. RES., **22**: 264.
  - ❖ **Raikhel A.S.** "*The cell biology of mosquito vitellogenesis*" da MEM.INST. OSWALDO CRUZ, RIO DE JANEIRO, 1987, vol.82, suppl. III: pag. 93-101 Inter.Symp. on Insect

- ❖ **Ramamoorthy S., Blumhagen K.,** (1984) “*Uptake of Zn, Cd, and Hg by fish in the presence of competing compartments*”. CANAD. J. FISH. AQUAT. SCI., 41:750-756.
- ❖ **Raskin I., Kumar P.B.A.N., Dushenkov S. e Salt D.E.,** (1994). „*Bioconcentrations of heavy metals by plants*”. CURRENT OPINIONS IN BIOTECHNOLOGY, 5:285-290.
- ❖ **Ray N.R. & Ray A.K.** (1975). *Indian Veterinary Journal*, 2:1455.
- ❖ *receptors in other vertebrates*”. JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 60(1-2):113-119.
- ❖ **Reed L. e Pangaro L.N.** (1995), “*Physiology of the thyroid gland. I: Synthesis and release, iodine metabolism and binding and transport*”, ed. PRINCIPLES AND PRACTICE OF ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM, Second Edition, Philadelphia, PA: Lippincott, pp. 285-291.
- ❖ **Rehm E., Schulz-Baldes M., Rehm B.,** (1984) “*Geochemical factors controlling the distribution of Fe, Mn, Pb, Cd, Cu and Cr in Wadden areas of the Weser estuary (German Bight)*”. VEROFF. INST. MEERESFORSCH. BREMERH., 20: 75.
- ❖ **Rehm S., Waalkes M.P.,** (1988) “*Cadmium-induced ovarian toxicity in hamsters, mice and rats*”. FUND. APPL. TOXICOL., 10: 635
- ❖ **Reilly C.** (2002) “*the toxic metalloids: arsenic, antimony and selenium, tellurium and boron*” in METAL CONTAMINATION OF FOOD. Elsevier Applied Science London and New York cap.10 pp 195-228
- ❖ **Reissman K.R. e Coleman T.J.,** (1955). “*Acute intestinal intoxication of iron*”. II, BLOOD, 10:46.
- ❖ **Rhen T & Lang JW** (1994) “*Temperature-dependent sex determination in the snapping turtle: manipulation of the embryonic sex steroid environment*”. GEN COMP ENDOCRINOL, 96(2):243-254.
- ❖ **Rhian M. e Moxon A.L.** (1943) “*Interaction of arsenic and selenium*” in JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY 78: pp 249-264
- ❖ **Rhyne B.C. e Goyer R.A.,** (1971) “*Cytochrome content of kidney mitochondria in experimental lead poisoning.*” EXP. MOL. PATHOL., 14: 386.
- ❖ **Riales R. e Albrink M.J.,** (1981) “*Effect of chromium chloride supplementation on glucose tolerance and serum lipids including high density lipoprotein of adult men*”. AM. J. CLIN. NUTR., 34: 2670.

- ❖ **Richard G., Federolf G., Habermann E.**, (1985) “*The interaction of aluminum and other metal ions with calcium-calmodulin-dependent phosphodiesterase*”. ARCH. TOXICOL., **57**: 257
- ❖ **Richmond H.G.**, (1959). “*Induction of sarcoma in the rat by iron-dextran complex*”. BR. MED. J., 1959, 1:947.
- ❖ **Ridgeway L. P. e Karnofsky D. A.**, (1952) “*The effects of metals on the chick embryo: toxicity and production of abnormalities in development*”. ANN. N.Y. ACAD. SCI., **55**: 203.
- ❖ **Riley L.G., Hirano T., Grau E.G.**, (2002), “*Disparate effects of gonadal steroid hormones on plasma and liver mRNA levels of insulin-like growth factor-I and vitellogenin in the tilapia, Oreochromis*”, FISH PHYSIOL. BIOCHEM., **26 (3)**: 223-230.
- ❖ **Rimkus G. e Wolf H.**, (1987). „*Schadstoffbelastung von Wild aus Schleswig-Holstein. 4. Blei-, Cadmium- und Quecksilbergehalte in Fleisch von Haar und Federwild*“. FLEISCHWIRTSCHAFT, 67:1150-1154
- ❖ **Ritchie W., Harrison G.J., Harrison L.**, (1994). “*Ingested Toxins*”. In: AVIAN MEDICINE: PRINCIPLES AND APPLICATION, Wingers Publishing, inc., Lake Worth, Florida, p.1034-1038.
- ❖ **Robertson J.L.**, (1986). „*Spontaneous renal disease in dogs*”. TOXICOL. PATHOL., 14:101-108..
- ❖ **Robinson C.D., Brown E., Craft J.A., Davies I.M., Moffat C.F.** (2004), “*Effects of prolonged exposure to 4-tert-octylphenol on toxicity and indices of oestrogenic exposure in the sand goby (Pomatoschistus minutus, Pallas)*”, MAR. ENVIRON. RES., **58 (1)**: 19-38.
- ❖ **Robinson J.B., Touvinen O.H.**, (1984) “*Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analysis*”. MICROBIOL. REV., 48:95-124.
- ❖ **Roels H.A., Djugang 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
- ❖ **Rom W.N.**, (1976) “*Effects of lead on the female and reproduction: a review*”. MONT SINAI J. MED., **43**: 542.
- ❖ **Ronneau C. e Cara J.**, (1984). “*Correlations of element deposition on pastures with analysis of cow’s hair*”. SCI. TOTAL ENVIRON., 39 :135-142.
- ❖ **Rosanova P., Romano M., Marciano M., Anteo C., Limatola E.** “*Vitellogenin precursors in the liver of oviparous lizard, Podarcis sicula*” da

MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT 2002, 63: pag. 349-354

- ❖ **Rosenfeld I & Beath O.A.**, (1946) WYOMING AGRC.EXP.STM.BULL. n. 275
- ❖ **Rosenfeld, I., & O. A. Beath.** (1964). “*Selenium*”. GEOBOTANY, BIOCHEMISTRY, TOXICITY, AND NUTRITION. Academic Press, New York. 411 pp.
- ❖ **Rossi S.C. e Wetterhahn K.E.**, (1989) “*Chromium (V) is produced upon reduction of chromate by mitochondrial electron transport chain complexes*”. CARCINOGENESIS, **10**: 913.
- ❖ **Rossouw J., Offermeier J., van Rooyen J.M.**, (1987) “*Apparent central neurotransmitter receptor changes induced by low-level lead exposure during different developmental phases in the rat*”. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **91**: 132.
- ❖ **Rüdiger Mewes K., Latz M., Golla H., Fischer A.** “*Vitellogenin From Female and Estradiol-Stimulated Male River Lampreys (*Lampetra fluviatilis* L.)*” da JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY 2002,292: pag. 52-72
- ❖ **Saffiotti U., Cefis F. e Kolb L.H.**, (1968). “*A new method for experimental induction of bronchogenic carcinoma*”, CANCER RES., 28:104.
- ❖ **Sakai H., Ichihashi H., Suganuma H. & Tatsukawa R.** (1995) “*Heavy metal monitoring in sea turtles using eggs*” in MARINE POLLUTION BULLETIN 30, pp 347-353
- ❖ **Sakai H., Saeki K., Ichiashi H., Kamezki N., Tanabe S. & Tatsukawa R.** (2000) “*Growth-related changes in heavy metal accumulation in green turtle (*Chelonia mydas*) from Yaeyama Islands, Okinawa, Japan*” in ARCHIVE OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY 39, pp 378-385
- ❖ **Samarawickrama G.P.**, (1979) “*Biological effects of cadmium in mammals*”. In: Webb M. Ed. THE CHEMISTRY, BIOCHEMISTRY AND BIOLOGY OF CADMIUM. Elsevier/North-Holland, New York, p. 341
- ❖ **Sampson J., Graham R. & Hester H.R.** (1942) 32 pp 225
- ❖ **Sanderson G.C. e Irwin J.C.**, (1976). “*Effects of various combinations and numbers of lead: iron pellets dosed in wild tayp captive mallards*”. FINAL REPOT. CONTRACT NO. 14 16 008914. U.S.Fish and Wildlife Service and Illinois Nat. Hist. Surv., pp.67, tables 62, Figs 7
- ❖ **Santiago D., Motas-Guzmán M., Reja A., María-Mojica P., Rodero B. e García-Fernández A.J.**, (1998). “*Lead and cadmium in Red Deer and Wild*

- Boar from Sierra Morena Mountains (Andalusia, Spain)*). BULL. ENVIRON CONTAM. TOXICOL., 61:730-737
- ❖ **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
  - ❖ **Scheuhammer A. M., e Norris S.L.**, (1995). “*A review of the environmental impacts of lead shot shell ammunition and lead fishing weights in Canada*”. CANADIAN WILDLIFE SERVICE OCCASIONAL PAPER No 88, Canadian Wildlife Service, Ottawa, Ontario, Canada, pp.54.
  - ❖ **Scheuhammer A.M.**, (1987). “*The chronic toxicity of aluminum, cadmium, mercury and lead in birds: a review*”. ENVIRON. POLLUT., 46:263-295.
  - ❖ **Scheuhammer A.M.**, (1991). “*Effects of acidification on the availability of toxic metals and calcium to wild birds and mammals*”. ENVIRONMENTAL POLLUTION, 71: 329-375
  - ❖ **Schlick E. e Friedberg K.D.**, (1981) “*The influence of low lead doses on the reticulo-endothelial system and leukocytes of mice*”. ARCH. TOXICOL., **47**: 197.
  - ❖ **Schlinger B.A. & Saldanha C.J.** (1998), “*Estrogen effects in birds*”. In: Knobil E. & Neil J.D., (eds.), ENCYCLOPEDIA OF REPRODUCTION, **2**: 93-100.
  - ❖ **Schmitt C.J., Dwyer F.J., Finger S.E.**, (1984) “*Bioavailability of Pb and Zn from mine tailings as indicated by erythrocyte d-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in suckers (Pisces: Catostomidae)*”. CAN. J. FISH. AQUAT. SCI., **41**: 1030.
  - ❖ **Scholz S., Kordes C., Hamann J., Gutzeit H.O.**, (2004), “*Induction of vitellogenin in vivo and in vitro in the model teleost medaka (Oryzias latipes): comparison of gene expression and protein levels*”, MAR. ENVIRON. RES., **57** (3): 235-244.
  - ❖ **Schreck CB** (1996) “*Immunomodulation: Endogenous factors*”. In: Iwama G & Nakanishi T, eds. In: THE FISH IMMUNE SYSTEM: ORGANISM, PATHOGEN, AND ENVIRONMENT. San Diego, CA: Academic Press, Inc. pp. 118-146.
  - ❖ **Schroeder H.A. & Mitchner M.**, (1972) “*Selenium and tellurium in mice*” in ARCH. ENVIRON. HEALTH 24, pp 66-71
  - ❖ **Schroeder H.A. e Mitchner M.**, (1971) “*Scandium chromium, gallium yttrium, rhodium, palladium and indium in mice: effects on growth and life span*”. J. NUTR., **101**: 1431.

- ❖ **Schroeder H.A.**, (1965) “*Cadmium as a factor in hypertension*”. J. CHRON. DIS., **18**: 647.
- ❖ **Schroeder H.A.**, (1966) “*Municipal drinking water and cardiovascular death rates*”. J.A.M.A., **195**: 81
- ❖ **Schroeder H.A., Balassa J.J., Tipton I.H.**, (1962) “*Abnormal trace metals in man—chromium*”. J. CHRON. DIS., **15**: 941.
- ❖ **Schroeder H.A., Balassa J.J., Vinton W.H.**, (1965) “*Chromium, cadmium and lead in rats. Effects on life span, tumors and tissue levels*”. J. NUTR., **86**: 51.
- ❖ **Schutz A. e Skerfving S.**, (1976) “*Effect of a short, heavy exposure to lead dust upon blood level, erythrocyte delta-aminolevulinic acid and coproporphyrin*”. SCAND. J. WORK ENVIRON. HEALTH, **3**: 176.
- ❖ **Schwaiger J., Mallow U., Feeling H., Knoerr S., Braunbeck Th., Kalbfus W., Negele R.D.** (2002), “*How estrogenic in nonylphenol? A transgenerational study using rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a test organism*”, AQUAT. TOXICOL., **59**: 177-189
- ❖ **Scott A.P. e Sumpter J.P.** (1989), “*Seasonal variations in testicular germ cell stages and in plasma concentrations of sex steroids in male rainbow trout (*Salmo gairdneri*)*”, GEN. COMP. ENDOCRINOL., **73**: 46-58.
- ❖ **Selcer K.W. & palmer A.D.**, (1995) “*Estrogen downregulation of Albumin and a 170-kDa serum protein in the turtle, *Trachemys scripta**” GENERAL AND COMPARATIVE ENDOCRINOLOGY **97**, pp 340-352
- ❖ **Serfass R.E. e Ganther H.E.**, (1975) “*Dfective microbicidal activity in glutathione peroxidase deficient neutrophils of Se deficient rats*” NATURE **225**, pp 640-641
- ❖ **Settlemyre C.T e Matrone G.**, (1967a). “*In vivo interference of zinc with ferritin iron in the rat*”. J. NUTR., **92**:153-158.
- ❖ **Settlemyre C.T e Matrone G.**, (1967b). “*In vivo effect of zinc on iron turnover in rats and life span of the erythrocyte*”. J. NUTR., **92**:159-164
- ❖ **Shackelford J. e Martin J.**, (1980) “*Antibody response of mature male mice after drinking water supplemented with selenium*” FED.PROC. **39**, pp 339-342.
- ❖ **Shaikh Z.A. e Lucis O.J.**, (1971). “*Isolations of cadmium binding proteins*”. EXPERIENTIA, **27**:1024-1025.
- ❖ **Shamberger R.J.**, (1983) “*Biochemistry of Selenium*” PLENUM PRESS, New York, p 243
- ❖ **Shannon R.L. & Stayer D.S.**, HUM.TOXICOL **8**: 198

- ❖ **Sheffy B.E. e Schultz R.D.**, (1979) “*Influence of vitamin E and selenium on immune response mechanism*” FED.PROC. 38, pp 2139-2143.
- ❖ **Shelby J.A. e Mendonça M.T.**, (2001) “*Comparison of reproductive parameters in male yellow-blotched map turtles (Gaptemys flavimaculata) from a hidtorically contaminated site and a reference site*”. COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY Part C 129, pp 233-242
- ❖ **Sherwood NM, Parker DB, McRory JE & Lescheid, D** (1994) “*Molecular evolution of growth hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone*”. In: Sherwood NM & Hew CL, eds. FISH PHYSIOLOGY, Vol. XIII: MOLECULAR ENDOCRINOLOGY OF FISH. San Diego, CA: Academic Press, Inc.
- ❖ **Shi YB** (1994) “*Molecular biology of amphibian metamorphosis: A new approach to an old problem*”. TRENDS ENDOCRINOL METAB, 5:14-20.
- ❖ **Shortridge E.H., O’Hara P.J. & Marshall P.M.**, (1971) “*Acute selenium poisoning in cattle*” N.Z.VET.J. 19: 47.
- ❖ **Shuster C.N. Jr. e Pringle B.H.**, (1969) “*Trace metal accumulation by the American Oyster, Crassostrea virginica*”. 1968 PROC. NAT. SHELLFISH. ASSOC., 59: 91.
- ❖ **Sifuentes-Romero I., Vázquez-Boucard C., Sierra-Beltrán A.P. & Gardner S.C.**, (2006) “*Vitellogenin in black turtle (Chelonia mydas agasizii): purification, partial characterization and validation of an ELISA for its detection*” ENVIROMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY (accepted) IN PRESS
- ❖ **Silbergeld E.K., Waalkes M. and Rice J.M.** (2000): “*Lead as a carcinogen:Experimental evidence and mechanisms of action*”. AM. J. INDUST. MED. 38:316-323.
- ❖ **Skerfving S.**, (1988)- “*Biological monitoring of exposure to inorganic lead*”. In: BIOLOGICAL MONITORING OF TOXIC METALS. Clarkson T.W., Friberg L., Nordberg G.F., Sager P.R. Eds., Plenum Press, New York, London, p. 169.
- ❖ **Skerfving S., Ahlgren L., Christoffersson J.O., Haeger-Arosen B., Mattson S., Schutz A., Lindberg G.**, (1985) “*Metabolism of inorganic lead in man*”. NUTR. RES. SUPPL., 1: 601.
- ❖ **Skipper J.K., Hamilton T H.** “*Regulation by estrogen of the vitellogenin gene*” da PROCEDURE NATIONAL ACCADEMY OF SCIENCE, 1977 (74) 6: pag. 2384-2388

- ❖ **Smedly P.L., Edmunds W.M. & Pelig-Ba K.B.**, (1996) in Appleton J.D., Fuge R. & McCall G.J.H. (Ed.) ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTRY AND HEALTH Geological Society special publication, London, 113: pp 153
- ❖ **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
- ❖ **Sobocinski P.Z., Canterbury W.J., Mapes C.A., Dinterman R.E.**, (1978). “*Involvement of hepatic metallothioneins in hipozincemia associated with bacterial infection*”. AM. J. PHYSIOL., 234:E399-E406.
- ❖ **Solè M., Barcelò D., Porte C.** (2002), “*Seasonal variation of plasmatic and hepatic vitellogenin and EROD activity in carp, *Cyprinus caprio*, in relation to sewage treatment plants*”, AQUAT. TOXICOL., **60**: 233-248.
- ❖ **Soli N.E.**,1980. “*Chronic copper poisoning in sheep*”. NORD. VET. MED., 32:75-89.
- ❖ **Somlyay I., Varnagy L. e Fancsi T.**, (1983). “*Monitoring of pesticide and heavy metals residues in tissue of roe, red deer and wild boar in western and southern parts of Hungary*”. In: ERKRANKUNGEN DER ZOOTIERE (Ippen R. and Schröder H.D. Eds.), Verhandlungsbericht des 25. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zootiere, Akademie, Berlin, pp. 423-428.
- ❖ **Sower SA** (1998) “*Brain and pituitary hormones of lampreys, recent findings and their evolutionary significance*”. AM ZOOL, 38:15-38
- ❖ **Spallhoz J.E., Martin J.L., Gerlach M.L. e Heinzerling R.H.**, (1973) “*Immunologic respose of mice fed diets supplemented with selenium*” PROC.SOC.EXP.BIOL.MED. 143, pp 685-689.
- ❖ **Spehar R.L., Anderson R.L., Fiandt J.T.**, (1978) “*Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates*”. ENVIRON. POLLUT., **15**: 195.
- ❖ **Sporn A., Dinu I., Stoenescu L., Cirstea A.**, (1969) „*Beitrage zur Ermittlung der Wechselwirkungen zwischen Cadmium und Zink*“. NAHRUNG, **13**: 461.
- ❖ **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
- ❖ **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

- ❖ **Stahlschmidt – Allner P. & Reinboth R.** (1991), “*Gonadal development and social control of sex inversion in Amphiprion frenatus*”. In: Scott A.P., Sumpter J.P., Kime D.E., Rolfe N.S., (eds.), PROC. 4<sup>TH</sup> INT. SYMP. ON REPRODUCTIVE PHYSIOLOGY OF FISH. Norwich, U.K.: University of East Anglia, 7-12 July, 1991, p. 208.
- ❖ **Starcher B.C., Glauber J.G., Madaras J.G.,** (1980). „*Zinc absorption and its relationship to intestinal metallothioneins*”. J. NUTR., 110:1391-1397
- ❖ **Stern R.,** (1982) “*Chromium compounds: production and occupational exposure. In: Biococial and Environmental aspects of chromium*”. S. Langård Ed., Elsevier, Amsterdam, p.5.
- ❖ **Steven J.D., Davies L.J., Stanley E.K., Abbott R.A., Ihnat M., Bidstrup L., Jaworski J.F.,** (1976) „*Effects of chromium in the Canadian environment*“. NAT. RES. COUN. Canada, NRCC No. 15017. 168 pp. Avail. from Publications, NRCC/CNRC, Ottawa, Canada, K1A OR6.
- ❖ **Stevens D. G. e Chapman G.A.,** (1984) “*Toxicity of trivalent chromium to early life stages of steelhead trout*”. ENVIRON. TOXICOL. CHEM., **3**: 125.
- ❖ **Stoecker B.,** (1999) “*Essentials of chromium bioavailability*”. OFFICE OF DIETARY SUPPLEMENTS, CHROMIUM AND DIABETES WORKSHOP SUMMARY, 4 nov. 1999, Natcher Conference Center, National Institute of Health.
- ❖ **Stoeppler M.,** (1991) “*Cadmium*”. In: Merian E. Ed., METALS AND THEIR COMPOUNDS IN THE ENVIRONMENT. VCH, New York, p.803.
- ❖ **Stokinger H.E. e Coffin D.L.,** (1968). “*Biological effects of air pollutants*”. In: AIR POLLUTION.. Academic Press, New York
- ❖ **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
- ❖ **Stonard M.D. e Webb M.,** (1976). “*Influence of dietary cadmium on the distributions of the essential metals copper, zinc and iron in tissues of the rat*”. CHEM.-BIOL. INTERACT., 15:349-363.
- ❖ **Stoneburner D.L., Nicora M.N. & Blood E.R.** (1980) “*Heavy metals in loggerhead sea turtle eggs (Caretta caretta):evidence to support the hypothesis that demes exist in the Western Atlantic population*”in JOURNAL OF HERPETOLOGY 14, pp 171-175
- ❖ **Storelli M.M. & Marcotrigiano G.O.** (2000). “*Total organic and inorganic arsenic from marine turtles (Caretta caretta) beached along the Italian coast*”

- (*South Adriatic Sea*)". BULLETIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY, 65: 732-739.
- ❖ **Storelli M.M. & Marcotrigiano G.O.** (2003). "*Heavy metal residues in tissues of marine turtles*". MARINE POLLUTION BULLETIN, 46: 397-400.
  - ❖ **Storelli M.M., Marcotrigiano G.O. & Ceci E.** (1998) "*Distribution of heavy metal residues in some tissues of *Caretta caretta* (Linneus) specimen beached along the Adriatic Sea (Italy)*" in BULLETIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY 60, pp 546-552
  - ❖ **Strand O, Espelien IS e Skogland T.**, (1995). "*Metaller og radioaktivitet i villrein fra Rondane*". NINA Fragapport 05, NINA-NIKU, Trondheim.
  - ❖ **Strmisková G. e Strmiska F.**, (1992). „*Contents of mineral substance in venison*". DIE NAHRUNG, 36:307-308.
  - ❖ **Sunderman F.W. Jr**, (1978) "*Carcinogenic effects of metals*". FED. PROC., 37: 40.
  - ❖ **Swiergosz R., Zakrzewska M., Sawicka-Kapusta K., Bacia K. e Janowska I.**, (1998). "*Accumulation of cadmium and its effect on bank vole tissues after chronic exposure*". ECOTOXICOL. ENVIRON. SAFETY, 41:130-136.
  - ❖ **Tada N, Saka M., Ueda Y., Hoshi H., Uemura T. & Kamata Y.** (2004) "*Comparative analysis of serum vitellogenin levels in male and female Reeves' pond turtles (*Chinemys reevesii*) by an immunological assay*" J.COMP.PHYS. B, 174 (1): pp. 13-20)
  - ❖ **Takenaka S., Oldiges H., König H., Hochrainer D., Oberdörster G.**, (1983) "*Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in Wistar rats*". J. NATL. CANCER INST., 70: 367
  - ❖ **Tam P.E. e Hinsdill R.D.**, (1984) "*Evaluation of immunomodulatory chemicals: alteration of macrophage function in vitro*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., 76: 183.
  - ❖ **Tandon S.K., Saxena D.K., Gaur J.S., Chandra S.V.**, (1978) "*Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium. Alterations in blood and liver*". ENVIRON. RES., 15: 90.
  - ❖ **Tang N. e Enger D.**, (1992) "*Cadmium's action on NRK-49F cells to produce responses induced also by TGF $\beta$  production or activation*". TOXICOLOGY, 71: 161
  - ❖ **Tang S.**, (1985) in HUANJING KEXUE 6: pp 2
  - ❖ **Tang S.**, (1987) in ACTA SCI. CIRCUMSTANTIAE 7: pp 245

- ❖ **Tataruch F.**, (1989). “*Vegleichende Untersuchungen zur Schwermetallbelastung von Wildschwielen aus drei Gehegen*“. WIENER TIERÄRZTLICHE MONATSSCHRIFT, 76:377-382.
- ❖ **Tataruch F.**, (1993). „*Vergleichende Untersuchungen zur Schwellmetallbelastung von Rot-, Reh- und Gamswild*“. ZEITSCHRIFT FUER JAGDWISSENSCHAFT, 39, 3:190-200.
- ❖ **Taylor D.M., Bligh P.H., Duggan M.H.**, (1962) “*The absorption of calcium, strontium, barium and radium from the gastrointestinal tract of rat.*” BIOCHEM. J., **83**: 25.
- ❖ **Thienes C.H. & Haley T.J.** (1972) “*Poisons with symptoms referable to the digestive Tract- Arsenic*” in CLINICAL TOXICOLOGY cp 20, pag 171-175.
- ❖ **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.
- ❖ **Thompson E.D., McDermott J.A., Zerkle T.B., Skare J.A., Evans B.L.B. & Cody D.B.**, (1989) “*Genotoxicity of zinc in 4 short-term mutagenicity says*” MUTATION RESEARCH 223, pp 267-272.
- ❖ **Tilton F., Benson W.II, Schlenk D.** (2001), “*Elevation of serum 17- $\beta$ -estradiol in channel catfish following injection of 17- $\beta$ -estradiol, ethynyl estradiol, estrone, estriol and estradiol-17- $\beta$ -glucuronide*”, ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND PHARMACOLOGY, **9**: 169-172.
- ❖ **Tinarelli R., Tirelli E.**, 1999 - *La contaminazione da piombo negli uccelli acquatici*. In: Bricchetti P. e Gariboldi A. - Manuale pratico di ornitologia Vol. 2: 213-225. Edagricole Bologna
- ❖ **Todd J.R. e Thompson R.H.**, (1963). “*Studies on chronic poisoning.II. Biochemical studies on blood of sheep during hemolytic crisis*”. BR. VET. J., 119:161-173.
- ❖ **Tohyama C., Sugihira N. e Saito H.**, (1987). “*Critical concentrations of cadmium for renal toxicity in rats*”. J. ENVIRON. HEALTH, 22:255-259.
- ❖ **Tola S., Hernberg S., Asp S., Nikkanen J.**, (1973) “*Parameters indicative of absorption and biological effect in new lead exposure: a prospective study*”. BRIT. J. IND. MED., **30**: 134.
- ❖ **Tomás J., Guitard R., Mateo R. e Raga J.A.** (2002). “*Marine debris ingestion in loggerhead sea turtle, Caretta caretta, from the Western Mediterranean*”. MARINE POLLUTION BULLETIN, 44: 211-216.

- ❖ **Towill L.E., Shriner C.R., Drury J.S., Hammons A.S., Holleman J.W.,** (1978) “*Reviews of the environmental effects of pollutants: III chromium*”. U.S. ENVIRON. PROTECTION AGENCY REP. 600/1-78-023. 287 pp.
- ❖ **Toyama I. & Kolmer J.A.,** (1918) “*The influence of arsphenamine and mercuric chloride upon complement and antibody production*” in J. IMMUNOL. 3: pp 301.
- ❖ **Trelease S.F., Di Somma A.A. e Jacobs A.L.** (1960). *Science*, 132. 618.
- ❖ **Tsuchiya K.,** (1986). “*Lead*”. In: HANDBOOK ON THE TOXICOLOGY OF METALS (Frieberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B. Eds.), Vol.2, 2<sup>nd</sup> Ed., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 298-353.
- ❖ **Tsuchiya K.,** (1986). “*Lead*”. In: HANDBOOK ON THE TOXICOLOGY OF METALS (Frieberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B. Eds.), Vol.2, 2<sup>nd</sup> Ed., Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, pp. 298-353.
- ❖ **Tyler C.R., Routledge E.J.** (1998), “*Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation*”, PURE APPL. CHEM., **70**: 1795-1804.
- ❖ **U.S.EPA,** (1975) “*Interim Primary Drinking water standards*” FED.REG. 40 (11): 990
- ❖ **Uriu-Hare J.Y., Stem J.S. e Keen C.L.,** (1989) “*Influence of maternal dietary Zn intake on expression of diabetes-induced teratogenicity in rats*”. DIABETES 38, pp 1282-1290.
- ❖ **Uyeki E.M. e Nishio A.,** (1983) “*Antiproliferative and genotoxic effects of chromium on cultured mammalian cells*”. J. TOXICOL. ENVIRON. HEALTH, **11**: 227
- ❖ **Valle B.L. e Glades A.,** (1974) “*The metallobiochemistry of zinc enzymes*”. ADV. ENZYMOL., **56**: 283
- ❖ **Vallee B.L. e Falchuck K.H.,** (1993). “*The biochemical basis of zinc physiology*”. PHYSIOL. REV., 73:79-118.
- ❖ **Vallee B.L. e Ulmer D.D.,** (1972) “*Biochemical effects of mercury, cadmium and lead*”. ANNU. REV. BIOCHEM., **41**: 91.
- ❖ **Van Campen D.R.,** (1971). “*Absorption of copper from the gastrointestinal tract*”. In: INTESTINAL ABSORPTION OF METAL IONS, TRACE ELEMENTS AND RADIONUCLIDES (S.C. Skoryna and D. Waldron-Edward Eds.), Pergamon Press, Oxford, p. 211.
- ❖ **Van Camper D.R e Scafe P.V.,** (1967). “*Zinc interference with copper absorption in rats*”. J. NUTR., 91:473-476.

- ❖ **Van Der Kraak G.J., Hewitt M., Lister A., McMaster M- & Munkkitrick K.** (2001), “*Endocrine toxicants and reproductive success in fish*”, Hum. Ecol. Risk Assess., **7**: 1017-1025.
- ❖ **Van Tienhoven A** (1983) “*Reproductive Physiology of Vertebrates*”. Ithaca, NY: Cornell University Press.
- ❖ **Vander A.J., Taylor D.L., Kalitis K., Monev D.R., Victory W.,** (1977) “*renal handling of lead in dogs: clearance studies*”. AM. J. PHYSIOL., **233**: F532.
- ❖ **Vazquez G.F., Reyes M.C., Fernandez G., Aguayo J.E.C. & Sharma V.K.** (1997) *Contamination in marine turtle (Dermochelys coriacea) eggs shells of Playon de Mexiullo, Michoacan, Mexico*” in BULLETIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY, **58**, pp 326-333
- ❖ **Venizelos L. & Smith M.** (1997). “*The impact of small garbage on the marine environment with emphasis on the Mediterranean marine turtle population*”. B. C. TESTUDO **4**(4): 41-48.
- ❖ **Venugopal B. e Luckey T.D.,** (1978). “*Chemical toxicity of metals and metalloids*”. METAL TOXICITY IN MAMMALS 2 Plenum Press, New York and London, pp. 24-32, 69-86, 185-195, 248-253, 275-283
- ❖ **Villeneuve D.L., Villalobos S.A., Keith T.L., Snyder E.M., Fitzgerald S.D., Giesy J.P.** (2002), “*Effect of waterborne exposure to 4-nonylphenol on plasma sex steroid and vitellogenin concentrations in sexually mature carp (Cyprinus carpio)*”, CHEMOSPHERE, **47**: 15-28.
- ❖ **Vinson GP, Whitehouse B & Hinson J** (1993) “*The Adrenal Cortex*”. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall.
- ❖ **Virupaksha T.K. & Shrift A.** (1965). “*Biochim. Biophys*”. Acta. **107**: 69.
- ❖ **Visek W.J., Whitney I.B., Kuhn U.S.G. III, Comar C.L.,** (1953) “*Metabolism of Cr<sup>51</sup> by animals as influenced by chemical state*”. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., **84**: 610
- ❖ **Von P.Launer, Kasten E., Graeser K. e Hahnewald Th.,** (1991). „*Schwermetalluntersuchungen bei Schwarzwild aus dem immissionsbelasteten Gebiet <Tharandter Wald>, Kreis Freital*“. MH. VET.-MED., **46**:683-687.
- ❖ **Von P.Launer, Richter O. e Walther M.,** (1996). „*Zur Schwermetallbelastung von Schwarzwild aus dem Regierungsbezirk Dresden*“. TIERÄRZTL. UMSCHAU, **51**:375-381

- ❖ **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
- ❖ **Waalkes M.P., Oberdörster 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.
- ❖ **Waalkes M.P., Poirier L.A.,** (1984) “*In vitro cadmium-DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium and zinc*”. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **75**: 539
- ❖ **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
- ❖ **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.
- ❖ **Wahba 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.
- ❖ **Waldron H.A.,** (1966) “*Anaemia of lead poisoning: a review*”. BR. J. IND. MED., **23**: 83
- ❖ **Walker T.I.** (1976) “*Effects of species, sex, length and locality on the mercury content of School shark Galeorhinus australis (Maclealy) and Gummy Shark Mustelus antarctus (guenther) from South-eastern Australian Waters*” in AUSTRALIAN JOURNAL OF MARINE AND FRESHWATER RESEARCH 27, pp 603-616
- ❖ **Wang M.M., Fox E.A., Stoecker B.J., Menendez C.E., Chan S.B.,** (1989) “*Serum cholesterol of adults supplemented with brewer’s yeast or chromium chloride*”. NUTR. RES., **9**: 989.
- ❖ **Wayland M.** (2000): *Metals as threats to wildlife*” in Short course on wildlife toxicology. Canadian Cooperative Wildlife Centre. Saskatoon, 1-3 March 2000.
- ❖ **Webb M.,** (1979) “*The chemistry, biochemistry and biology of cadmium*”. ELSEVIER/NORTH HOLLAND BIOCHEMICAL, New York

- ❖ **Weber H.**, (1983) “*Long-term study of the distribution of soluble chromate-51 in the rat after single intratracheal administration*”. J. TOXICOL. ENVIRON. HEALTH, **11**: 749.
- ❖ **Weiser M.G., O’Grady M.**, (1983). „*Erithrocyte volume distribution analysis and hematologic changes in dogs with iron deficiency anemia*”. VET PATHOL., 20:230-241.
- ❖ **Wetterhahn K.E. e Hamilton J.W.**, (1989) “*Molecular basis of hexavalent chromium carcinogenicity : effect on gene expression*”. SCI. TOTAL ENVIRON., **86**: 113.
- ❖ **Whanger P.D.**, (1973) “*Effect of dietary cadmium on intracellular distribution of hepatic iron in rats*”. RES. COMMUN. CHEM. PATHOL. PHARMACOL., **5**: 733
- ❖ **Whitaere R.W. & Pearson C.S.**, (1972) “*Arsenic and the Environment*” in MINERAL INDUSTRIES BULLETIN Colorado,School of Mines
- ❖ **White D.H. e Finley M.T.**, (1978) “*Uptake and retention of dietary cadmium in mallard ducks*”. Environ. Res., **17**: 53.
- ❖ **White J.R. e Driscoll C.T.**, (1985) “*Lead cycling in an acidic Adirondack lake*”. ENVIRON. SCI. TECHNOL., **19**: 1182.
- ❖ **Whitten K.W., Gailey K.D., Davis R.E.**, (1987). “*Quimica General Superior*”. McGraw-Hill.
- ❖ **WHO** (1981) “*Arsenic*”in ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 12 World Health Organisation
- ❖ **WHO**, (1992). “*IPCS Environmental Health Criteria 135; Cadmium, environmental aspects*”. Geneva, WORLD HEALTH ORGANIZATION
- ❖ **WHO**, (1996) “*Guidelines for drinking water qualità, recomandations*” , 2°ed, 2° vol, World Health Organisation, Genere.
- ❖ **WHO**, (2001) “*Arsenic Compounds*” in ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 2nd ed. World Health Organization 224
- ❖ **Wibbels T, Cowan J, LeBoeuf R** (1998) “*Temperature-dependent sex determination in the red-eared slider turtle, Trachemys scripta*”. J EXP. ZOOL, 281(5):409-416.
- ❖ **Wibbels T, Crews D** (1995) “*Steroid-induced sex determination at incubation temperatures producing mixed sex ratios in a turtle with TSD*”. GEN COMP ENDOCRINOL, 100(1):53-60.
- ❖ **Willingham E, Baldwin R, Skipper JK, Crews D** (2000) “*Aromatase activity during embryogenesis in the brain and adrenal-kidneygonad of the*

- red-eared slider turtle, a species with temperaturedependent sex determination*". GEN COMP ENDOCRINOL, 119(2):202-207.
- ❖ **Windholz M., budavari S., Stroumstos L.Y. e Fertig M.N. Eds.**, (1976) THE MERCK INDEX, ninth edition. Merck and Co., Rahway, New Jersey
  - ❖ **Witmer C.M. e Harris R.**, (1991) "*Chromium content of bone after oral and intraperitoneal (ip) administration of chromium(VI) to rats*" (ABSTR.). TOXICOLOGIST, 11: 41
  - ❖ **Witzleben C.L. e Chaffey N.J.**, (1966). „*Acute ferrous sulfate poisoning*". ARCH. PATHOL., 82:454.
  - ❖ **Wolkers H., Wensing T., Groot Bruinderink G.W.T.A.**, (1994). "*Heavy metal contaminations in organs of red deer (Cervus elaphus) and wild boar (Sus scrofa) and the effect on some trace elements*". THE SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT, 144:191-199.
  - ❖ **Wong K.L. e Klaassen C.D.**, (1980) "*Age differenca in the susceptibility to cadmium induced testicular damage in rats*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **55**: 456.
  - ❖ **Woolson E.A.**, (1975) in ACS SER. 7:pp 1
  - ❖ **Woolson EA.** (1975) "*Arsenical pesticides*" da AMERICAN CHEM. SOC. SYMP., Ser.7 pag 176
  - ❖ **Worker N.A. e Migicovsky B.B.**, (1961) "*Effects of vitamin D on the utilization of zinc*". J. NUTR., 75: 222
  - ❖ **Wren C.D.**(1986) "*A review of metal accumulation and toxicity in wild mammals. 1 Mercury*" ENVIROMENTAL RESEARCH 40(1) PP 210-240
  - ❖ **Wyneken J.** (2001). The Anatomy of Sea Turtles. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-470.
  - ❖ **Xie X. e Smart T.G.**, (1991). "*A physiological role for endogenous zinc in rat hippocampal synaptic neurotransmission*". NATURE, 349:521-524.
  - ❖ **Xu C., Johnson J.E., Singh P.K., Jones J.J., Yan H. e Carter C.E.**, (1996). "*In vivo studies of cadmium-induced apoptosis in testicular tissue of the rat and its modulation by a chelating agent*". TOXICOLOGY, 107:1-8.
  - ❖ **Yadatie F., Male R.**, (2002), "*Effects of 4-nonylphenol on gene expression of pituitary hormones in juvenile Atlantic salmon (Salmo salar)*", AQUAT. TOXICOL., 58 (1-2): 113-129.
  - ❖ **Zaccaroni A., Gamberoni M., Stracciari G.L., Parisini P.** (2003), "*Inquinamento ambientale ed "endocrine disruptor" nella fauna ittica. Valori di vitellogenina in carpe delle valli di Campotto (FE) e il ruolo del veterinario*", ODV, 7/8: 41-46.

- ❖ **Zaroogian G.E. e Cheer S.,** (1976) “*Cadmium accumulation by the American oyster, Crassostrea virginica*”. NATURE, 261: 408.
- ❖ **Zaroogian G.E.,** (1979). “*Studies on the depuration of cadmium and copper by the American oyster Crassostrea virginica*”. BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., 23: 117.
- ❖ **Zeya H.I e Spitznagel J.K,** (1968). „*Arginine-rich proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes: Antimicrobial specificity and biochemical heterogeneity*”. J. EXP. MED., 127:927.
- ❖ **Zollinger H.W.,** (1953) “*Kidney adenomas and carcinomas in rats caused by chronic lead poisoning and their relationship to corresponding human neoplasm*”a. VIRCHOWS ARCH. PATH. ANAT., 323, 694.
- ❖ **Zomborszky Z., Szentmihályi G., Sarudi I., Horn P. e Szabó C.,** (1996). “*Nutrient composition of muscles in deer and boar*”. JOURNAL OF FOOD SCIENCE, 61 (3):625-635.

## **FONTI TELEMATICHE**

- ❖ <http://digilander.libero.it/catcarpfishing/siluro/chi.htm>
- ❖ [http://odp.od.nih.gov/ods/news/conferences/chromium\\_diabetes.html](http://odp.od.nih.gov/ods/news/conferences/chromium_diabetes.html).
- ❖ [www.acqueinterne.it/schede\\_pesci/pesce\\_siluro.htm](http://www.acqueinterne.it/schede_pesci/pesce_siluro.htm)
- ❖ [www.agraria.org/selvaggina/cinghiale.htm](http://www.agraria.org/selvaggina/cinghiale.htm)
- ❖ [www.anatidi.it/speci/germano.asp](http://www.anatidi.it/speci/germano.asp)
- ❖ [www.chromiuminfo.org/overview\\_p.html](http://www.chromiuminfo.org/overview_p.html)
- ❖ [www.deliziatartufi.com/cinghiale.htm](http://www.deliziatartufi.com/cinghiale.htm)
- ❖ [www.geocities.com/Eureka/Park/9546/pages/4.htm](http://www.geocities.com/Eureka/Park/9546/pages/4.htm)
- ❖ [www.ildeltadelpo.it/parco\\_del\\_delta\\_del\\_po\\_germano.htm](http://www.ildeltadelpo.it/parco_del_delta_del_po_germano.htm)
- ❖ [www.inseparabile.com/.../germano\\_reale.htm](http://www.inseparabile.com/.../germano_reale.htm)
- ❖ [www.islepark.it/natura/fauna/cinghiale.htm](http://www.islepark.it/natura/fauna/cinghiale.htm)
- ❖ [www.oasivallibrusa.it/germano\\_reale.htm](http://www.oasivallibrusa.it/germano_reale.htm)
- ❖ [www.onfc.org/territorio/specieanimalivegetali/specieanimali/ungulati.htm](http://www.onfc.org/territorio/specieanimalivegetali/specieanimali/ungulati.htm)
- ❖ [www.provincia.rovigo.it](http://www.provincia.rovigo.it)
- ❖ [www.regione.emilia-romagna.it/laguna/articolo\\_germano.htm](http://www.regione.emilia-romagna.it/laguna/articolo_germano.htm)
- ❖ [www.romanatura.roma.it/flora\\_fauna/cinghiale.htm](http://www.romanatura.roma.it/flora_fauna/cinghiale.htm)
- ❖ [www.scalve.it/faunistico/GERMANOREALE.htm](http://www.scalve.it/faunistico/GERMANOREALE.htm)
- ❖ [www.seaworld.org](http://www.seaworld.org)
- ❖ [www.valnerinaonline.it/natura/cinghiale.asp](http://www.valnerinaonline.it/natura/cinghiale.asp)
- ❖ [www.zoomedia.it](http://www.zoomedia.it)