

Alma Mater Studiorum Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA**

Morfofisiologia e Patologia Veterinaria con Applicazioni Biotecnologiche

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: **07/H4**

Settore Scientifico disciplinare: **VET 07**

**Il coniglio come modello sperimentale per lo studio  
degli effetti neurologici indotti da Cobalto**

**Andrea Mariotti**

Coordinatore Dottorato

Relatore

**Chiar.mo Prof. E. Seren**

**Chiar.ma Prof.ssa A. Zaghini**

**Esame finale anno 2012**

# **Dottorato di ricerca in Morfofisiologia e Patologia Veterinaria con Applicazioni Biotecnologiche XXIV Ciclo**

Il dottor Andrea Mariotti, iscritto al XXIV ciclo del corso di Dottorato di Ricerca in Morfofisiologia Veterinaria e Applicazioni Biotecnologiche, ha svolto la sua attività presso il Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, attuale Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, presso il servizio di prova di Farmacologia e Tossicologia Veterinaria, avendo come docente guida la prof.ssa Anna Zaghini.

Nel corso dei tre anni il dott. Mariotti ha affrontato diverse tematiche di ricerca a carattere tossicologico, tra cui lo studio di micotossine, con particolare riguardo alla ocratossina. È stata indotta una ocratossicosi sperimentale nel suino e nella gallina ovaioia. In entrambe le specie è stata valutata la deplezione tissutale. Le due prove sperimentali hanno confermato la maggiore persistenza dell'ocratossina nel suino; inoltre hanno evidenziato differenze specie-specifiche per quanto riguarda la via di escrezione della micotossina, che nella gallina ovaioia, oltre che renale, pare essere in larga misura anche biliare. Relativamente alla aflatoxina B<sub>1</sub>, nel corso del primo anno di dottorato, ha seguito, soprattutto per quanto riguarda la parte analitica (messa a punto e validazione del metodo analitico), una ricerca sul metabolismo della aflatoxina a livello delle cellule della ghiandola mammaria.

Il percorso a prevalente carattere tossicologico del Dott. Mariotti, si è completato con il periodo trascorso all'estero presso il Laboratoire de Toxicologie Vétérinaire presso VetAgro Sup - Campus Vétérinaire de Lyon (ENVL - École Nationale Vétérinaire de Lyon), presso il quale ha avuto modo di collaborare attivamente e con grande apprezzamento nelle attività di ricerca e di prova dello stesso Centro.

## **Pubblicazioni:**

M. CARUSO, A. MARIOTTI, C. ZIZZADORO, A. ZAGHINI, P. ORMAS, A. ALTAFINI, C. BELLOLI (2009). A clonal cell line (BME-UV1) as a possible model to study bovine mammary epithelial metabolism: metabolism and cytotoxicity of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Toxicon* 53, 400–408;

A. MARIOTTI, S. ROSSI, L. SARDI, L. RIZZI, A. ZAGHINI (2010). Experimental Ochratoxicosis in Swine. Poster session 2010 EFFoST ANNUAL MEETING Food and Health, 10-12 November 2010, Dublin, Ireland;

A. MARIOTTI, R. GALUPPI, A. ALTAFINI, A. SERRAINO, A. ZAGHINI (2011). Preliminary survey on the effects of ionizing radiations on *Aspergillus* spp. and on aflatoxin B<sub>1</sub> contaminating maize grains. Poster session 2011 INOPTeP Sustainable Postharvest and Food Technologies, 17 - 22 April 2011, Velika Plana, Serbia;

A. MARIOTTI, R. GALUPPI, A. ALTAFINI, A. SERRAINO, A. ZAGHINI (2011). Preliminary survey on the effects of ionizing radiations on *Aspergillus* spp. and on aflatoxin B<sub>1</sub> contaminating maize grains. *Journal on Processing and Energy in Agriculture*, 15(2), pp. 63-66;

A. MARIOTTI 2° posto al Premio Mordenti Alltech ACE 2009 con l'articolo: "Ochratoxin A Bile Levels as Suitable Model of Biomarker in Laying Hens".

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
<b>2. IL COBALTO.....</b>	<b>4</b>
2.1. STORIA E PROPRIETÀ .....	4
2.2. IL COBALTO NELL'AMBIENTE .....	5
2.3. UTILIZZI INDUSTRIALI.....	6
2.4. UTILIZZI IN MEDICINA.....	7
2.4.1. Radioterapia .....	7
2.4.2. Eritropoiesi .....	7
2.4.3. Applicazioni biomediche .....	8
2.4.4. Evoluzione tecnologica delle protesi d'anca.....	9
2.4.5. Leghe di cobalto .....	10
2.5. FUNZIONE BIOLOGICA DEL COBALTO NELL'ORGANISMO.....	12
2.6. ESPOSIZIONE PROFESSIONALE.....	13
2.6.1. Biomarkers di esposizione .....	15
<b>3. TOSSICITÀ DEL COBALTO E SUOI EFFETTI SULLA SALUTE.....</b>	<b>18</b>
3.1. CARENZA DI COBALTO.....	19
<b>4. TOSSICOCINETICA .....</b>	<b>20</b>
4.1. ASSORBIMENTO .....	20
4.1.1. Via inalatoria.....	20
4.1.2. Via digerente.....	20
4.1.3. Via percutanea .....	21
4.1.4. Altre vie di esposizione .....	21
4.2. LEGAME SIERO-PROTEICO.....	22
4.2.1. Albumina.....	22
4.2.2. Albumina modificata .....	22
4.3. DISTRIBUZIONE.....	24
4.3.1. Dopo inalazione.....	24
4.3.2. Dopo ingestione .....	24
4.3.3. Altre vie di esposizione .....	25
4.4. ELIMINAZIONE .....	25
4.4.1. Dopo inalazione.....	25
4.4.2. Dopo ingestione .....	26
<b>5. SCAMBI PROTESI-ORGANISMO .....</b>	<b>27</b>
<b>6. PRESENTAZIONE DEL CASO .....</b>	<b>30</b>

<b>PARTE SPERIMENTALE .....</b>	<b>34</b>
SCOPO DEL LAVORO.....	34
<b>7. MATERIALI E METODI.....</b>	<b>35</b>
7.1. FASE “IN VIVO” .....	35
7.1.1. <i>Prima prova preliminare</i> .....	38
7.1.2. <i>Seconda prova preliminare</i> .....	39
7.1.3. <i>Terza prova sperimentale</i> .....	39
7.2. ANALISI DI COBALTO E CROMO .....	40
7.3. METODICA ISTOLOGICA.....	41
7.4. MICROSCOPIA ELETTRONICA .....	42
<b>8. RISULTATI.....</b>	<b>43</b>
8.1. OSSERVAZIONI CLINICHE .....	43
8.2. DISTRIBUZIONE DEGLI IONI .....	44
8.2.1. <i>Prima prova preliminare</i> .....	44
8.2.2. <i>Seconda prova preliminare</i> .....	45
8.2.3. <i>Terza prova sperimentale</i> .....	46
8.3. VALUTAZIONE ISTOLOGICA.....	49
8.3.1. <i>Apparato visivo</i> .....	50
8.3.2. <i>Nervi sciatici</i> .....	52
8.3.3. <i>Apparato uditivo e vestibolare</i> .....	52
<b>9. DISCUSSIONE.....</b>	<b>54</b>
<b>10. CONCLUSIONI .....</b>	<b>60</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUZIONE

Il cobalto è un elemento essenziale per la vita, è infatti necessario per la formazione di vitamina B<sub>12</sub> (idrossicobalamina); tuttavia, una somministrazione eccessiva di questo elemento traccia produce gozzo e ridotta attività della tiroide. Infatti, nel 1966, la sindrome della “Cardiomiopatia del bevitore di birra” è apparsa in Canada in seguito all’aggiunta di solfato di cobalto come stabilizzatore della birra ed era caratterizzata da emopericardio, elevate concentrazioni di emoglobina ed arresto cardiaco (Smith e Carson, 1981).

Fino a tempi recenti, la tossicità del cobalto è stata un grosso problema, riguardante lavoratori esposti a polvere di cobalto proveniente da trapanazioni e levigature. Fibrosi interstiziale polmonare è stata associata ad esposizione industriale a polvere di metalli pesanti (tungsteno e cobalto), ma non al solo cobalto. L’esposizione al solo cobalto produce una dermatite allergica da contatto ed un’asma di origine occupazionale.

Infatti, tra i metalli, il cobalto è il secondo elemento più allergizzante nell’uomo, dopo il nichel e prima del cromo (Basketter et al., 1993; Gawkrödger, 1993). La polvere di cobalto può anche causare irritazione agli occhi ed il contatto prolungato è capace di indurre sensibilizzazione ed è la seconda più comune causa di dermatite dopo il nickel (Lison et al., 1995).

Dal momento che il cobalto è classificato come possibile cancerogeno (classe 2B) dall’Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC, 2006), potrebbe esservi anche la possibilità di comparsa di neoplasie locali, ad esempio sarcomi, e sistemiche, come linfomi e leucemie (Case et al., 1994; Doherty et al., 2001; Megaterio et al., 2001).

Il cobalto, inoltre, è un metallo utilizzato, in campo biomedico, sotto forma di lega cromo-cobalto o cromo-cobalto-molibdeno, nella costituzione di sistemi protesici. Il suo primo utilizzo per questo fine risale al 1938, quando si sperimentò l’impianto di protesi d’anca permanenti, in cui non era prevista la rimozione della cupola acetabolare. L’elevata biocompatibilità di questa lega permise l’ottenimento di risultati incoraggianti, fino alla sua affermazione negli anni cinquanta. Dunque, l’artoplastica totale metallo su metallo è stata usata per diverse decadi in chirurgia ortopedica (McKee e Watson-Farrar, 1966).

Tuttavia, anche se gli impianti all'anca sono considerati biologicamente inerti, da una revisione della letteratura sono emersi, oltre a possibili reazioni allergiche, problemi di tossicità locale e sistemica, dovuti a detriti metallici, liberati dai materiali protesici. Diversi studi hanno dimostrato che il rilascio di metalli avviene per usura, corrosione e fattori meccanici, come sfregamento, sollecitazione, urto di detriti e fatica. Concentrazioni di metallo significativamente elevate sono state, infatti, segnalate nei fluidi corporei di pazienti con impianti d'anca del tipo metallo su metallo realizzati con lega Cr-Co (Sunderman et al., 1989; Vendittoli et al., 2007; Gru'bl et al., 2007; Schaffer et al., 1999).

La maggior parte dei casi di ipersensibilità da lega Co-Cr-Mo riportati in letteratura avviene a livello di articolazione dell'anca (Merritt e Brown, 1996). Gli ioni metallo vengono rimossi dal sistema linfatico e possono depositarsi nei linfonodi, oppure essere immessi nel torrente ematico, come dimostrano gli elevati livelli sierici riscontrati in pazienti protesizzati, andando poi ad accumularsi in vari organi, soprattutto in fegato, milza e cuore.

Studi di tossicologia in medicina ambientale e occupazionale, inoltre riportano reazioni biologiche avverse durante esposizioni a lungo termine.

Infatti, in anni più recenti, alcuni rapporti hanno descritto effetti specifici in soggetti con elevati livelli di cromo e cobalto, rilasciati da protesi metalliche, in pazienti che hanno avuto impianti per un periodo di almeno tre mesi, fino ad un massimo di cinque anni (Megaterio et al., 2001; Steens et al., 2006; Oldenburg et al., 2009; Tower, 2010b; Ikeda et al., 2010; Mao et al., 2011).

Solo recentemente ci si è focalizzati su una tossicità di particolare rilievo, caratterizzata da effetti neurologici, con degenerazioni debilitanti a carico di vista e udito, convulsioni, cefalea e parestesia periferica (Megaterio et al., 2001; Steens et al., 2006; Oldenburg et al., 2009; Rizzetti et al., 2009; Ikeda et al., 2010; Tower, 2010c); questa sintomatologia è stata osservata soprattutto in soggetti esposti a cobalto, non solo per rotture di protesi ma anche per motivi professionali.

I sintomi neurologici in questi pazienti sono compatibili con precedenti rapporti isolati di "cobaltismo", legati ad ingestione di cloruro di cobalto per il trattamento dell'anemia (Gardner, 1953; Schirmacher, 1967; Licht et al., 1972) e l'esposizione industriale al cobalto (Jordan et al., 1990; Meecham e Humphrey, 1991), mentre nessuna analogia è

stata trovata con casi d'intossicazione da cromo. Come risultato di queste scoperte è stato coniato il termine "cobaltismo artroprotesico" (Tower, 2010a).

Infatti, la tossicità dei composti del cromo dipende dallo stato di ossidazione del metallo. Alcuni studi hanno dimostrato che il cromo trovato in pazienti con protesi era trivalente, forma generalmente meno tossica rispetto a quella esavalente (Merrit e Brown, 1995; Walter et al., 2008). Il cromo esavalente è largamente considerato più tossico rispetto alla forma trivalente. Ciò deriva in parte dal riconoscimento del cromo esavalente in qualità di carcinogeno umano per inalazione come via di esposizione (gruppo 1) (IARC, 1990), in parte, dalle proprietà caustiche di molti dei composti esavalenti, dal più elevato assorbimento di specie esavalenti in seguito ad esposizione per ingestione ed inalazione, e infine dall'abilità del cromo esavalente di attraversare le membrane cellulari (Langard e Costa, 2007). In letteratura sono disponibili relativamente pochi studi che dimostrano la tossicità del cromo trivalente.

Recentemente è stato descritto un caso di tossicità da cobalto e cromo, dovuta al rilascio da una protesi d'anca con ioni metallici misurati nel sangue intero, plasma e liquido cefalorachidiano (Rizzetti et al., 2009; Pazzaglia et al., 2011). I principali sintomi riscontrati sono stati cecità, ipoacusia, neuropatia periferica, tremori alle mani, incoordinazione, declino cognitivo, depressione, vertigini e tutti i soggetti avevano livelli sierici di cobalto e cromo notevolmente elevati, mostrando, alla revisione chirurgica dell'impianto, evidenti segni di metallosi dei tessuti periprotetici.

Infatti, la presenza di tessuto di interfaccia, contenente ioni metallo, è un reperto anatomico-patologico intra-operatorio costante in caso di scollamento asettico di protesi totale d'anca non cementata o di rottura di una delle componenti protesiche. Il tipo di ioni presenti in tale tessuto dipende dalla lega che costituisce il materiale protesico impiantato.

Queste evidenze e la mancanza di studi sperimentali esaurienti hanno indotto ad indagare su questo argomento. Da ciò è nato questo studio il cui scopo è stato, infatti, valutare gli effetti del cobalto e del cromo, specialmente sul sistema ottico e vestibolare del coniglio, utilizzato come modello animale per riprodurre e chiarire i meccanismi patogenetici dell'intossicazione da questi metalli.

## 2. IL COBALTO

### 2.1. Storia e proprietà

George Brandt (1694-1768) è considerato lo scopritore del cobalto: la data della scoperta varia a seconda della fonte, ma è datata tra il 1730 e il 1737. Egli fu in grado di dimostrare che il cobalto era la fonte del colore blu nel vetro, che invece era stato in precedenza attribuito al bismuto, presente insieme al cobalto.

Il nome Cobalto deriva probabilmente dal greco *kobalos*, traducibile con folletto, o dal nome tedesco “Kobold”, un tempo attribuito a spiriti maligni nell’antichità e che venne utilizzato dai minatori per nominare tale minerale perché velenoso e in grado di contaminare altri minerali. E’ possibile poi che le parole *kobold*, *goblin* e *cobalt* abbiano tutte lo stesso etimo.

Il Cobalto (Co) è un elemento chimico appartenente al gruppo IX, numero atomico 27, massa 59, è un metallo ferromagnetico, appartenente agli elementi di transizione; il suo simbolo è Co. Composto inorganico e quindi privo di carbonio organicato, di colore azzurro argenteo, con proprietà simili a nichel e ferro, può essere magnetizzato come quest’ultimo. A temperatura ambiente presenta scarsa duttilità, ma questa aumenta portandolo a temperature elevate. E’ caratterizzato da: densità 8,92 g/cm<sup>3</sup>, temperatura di fusione 1244°C, temperatura di ebollizione 2927°C.

Il cobalto si ritrova naturalmente nelle rocce, acqua, piante e animali, tipicamente in piccole quantità ed è solitamente combinato con altri elementi, come ossigeno, zolfo ed arsenico. Il cobalto tuttavia è più comunemente legato a minerali di rame, ferro, piombo, nickel e argento in concentrazioni inferiori all’1% e dunque la maggiore emanazione di cobalto risulta come sottoprodotto della produzione di rame e nickel (Barceloux et al., 1994).

L'elemento è chimicamente attivo e forma molti composti, che vengono sfruttati in diversi campi dell’industria, dalle ceramiche all’agricoltura (ATSDR, 2004); grande interesse suscitano le leghe di cobalto, sfruttate grazie a: elevato punto di fusione, forza e resistenza all’ossidazione.

Il Chemical Abstract Service Registry (CAS) segnala approssimativamente 5000 leghe di cobalto con altri metalli, di cui il cobalto è il metallo base per circa 2000 di esse. I composti del cobalto sono tradizionalmente usati come agenti coloranti in vetro,

ceramica e colori, come catalizzatori e come essiccante dei colori, inoltre sono anche usati come additivi di elementi traccia in agricoltura ed in medicina (Lison et al., 1995). E' stabile in aria ed inalterato in acqua, ma è lentamente attaccato da acidi diluiti. Gli stati di ossidazione che il cobalto può assumere sono +2, +3 e (raramente) +1. Le principali forme di interesse tossicologico sono la forma metallica (alcune leghe: Stellite, Vitallium®), gli ossidi (ossido e tetraossido) e i sali (cloruro, solfuro e solfato).

## 2.2. Il cobalto nell'ambiente

Nella crosta terrestre, il cobalto è presente in quote pari a 20-25 mg/kg (Smith e Carson, 1981): costituendone lo 0,0023%, rappresenta il 32° elemento in ordine di abbondanza (Smith e Carson, 1981; Merian, 1985; Abbasi et al., 1989); la maggior parte del cobalto della terra si trova nel suo nucleo. E' scarsamente presente anche nelle acque naturali, da cui precipita come solfuro di cobalto, altamente insolubile.

Non lo si trova mai in forma di metallo libero, bensì sotto forma di minerali, come la smaltite  $\text{CoAs}_2$ , il cobalto grigio o cobaltite  $\text{CoAsS}$ , la carrolite  $(\text{Cu}(\text{Co},\text{Ni})_2\text{S}_4)$ , la linneite ( $\text{Co}_3\text{S}_4$  con atomi di Ni o Cu come sostituenti del Co), la sferocobaltite ( $\text{CoCO}_3$ ) e la eritrite o fior di cobalto ( $\text{Co}_3(\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ). Può anche trovarsi nell'aria e nell'acqua, o depositarsi sul terreno tramite polvere trasportata dal vento.

Anche gli esseri umani aggiungono cobalto all'ambiente scaricandone piccole quantità nell'atmosfera a seguito della combustione e dell'estrazione mineraria di carbone, rame, nichel (Barceloux et al., 1999), trattando minerali contenenti cobalto e tramite la produzione e l'uso di prodotti chimici a base del metallo.

Gli isotopi radioattivi del cobalto non sono naturalmente presenti nell'ambiente, tranne il  $^{59}\text{Co}$ , ma vengono rilasciati attraverso il funzionamento di impianti di energia nucleare. Dal momento che hanno periodi radioattivi relativamente brevi (tra le 40 ore e tempi inferiori ad un secondo), non sono particolarmente pericolosi.

Una volta entrato nell'ambiente, il cobalto non può essere distrutto ma può reagire con altri elementi o essere assorbito dalle particelle del terreno o dai sedimenti dell'acqua.

I terreni che contengono quantità molto basse di cobalto possono far crescere piante cobalto-deficienti, di conseguenza anche gli animali che pascolano su questi terreni soffrono la carenza di cobalto.

Il livello medio di cobalto nel terreno è pari a 8 ppm, ma ci sono terreni con solo 0,1 ppm ed altri contenenti fino a 70 ppm. Nell'ambiente marino il cobalto è necessario per le alghe blu-verdi (cianobatteri).

### 2.3. Utilizzi industriali

Il cobalto ed i suoi sali trovano impiego in numerosi settori ed applicazioni.

- Circa l'80% del cobalto, prodotto a livello mondiale, viene utilizzato allo stato metallico (Grimsley, 2001). Il Chemical Abstract Service Registry riconosce l'esistenza, approssimativamente, di 5000 leghe di cobalto, nelle quali rappresenta il metallo base per 2000). Alcuni esempi:
  - leghe impiegate nella realizzazione di turbine per motori d'aereo
  - leghe ad alta resistenza alla corrosione e all'usura
  - acciai per utensili ad alta velocità
  - utensili in metallo duro (detti anche "al diamante" o Widia)
- Magneti e supporti magnetici per registrazioni, in lega con Fe, con Al e Ni
- Catalizzatori per le industrie petrolchimica e chimica
- Materiale di rivestimento per elettrodeposizione (galvanostegia), per il suo aspetto, la sua resistenza e la sua durezza
- Composti disidratanti per vernici, lacche ed inchiostri
- Polveri per il rivestimento di porcellane e smalti
- Pigmenti: Leonardo da Vinci fu uno dei primi artisti ad usare i colori brillanti del cobalto nei suoi dipinti. Anche le porcellane della dinastia Ming e le vetrerie veneziane contenevano già pigmenti di cobalto dal XV secolo; sotto forma di carbonato, cloruro, fosfato, alluminio, silicato, arsenicato, stannato: blu cobalto e verde cobalto in lavori di porcellana, ceramica, vetro macchiato, mattonelle e smalti per gioielleria
- Elettrodi per batterie d'auto

- Per la costruzione dei catodi di particolari valvole termoioniche destinate ad usi HiFi di altissimo livello; queste particolari valvole, molto costose, hanno la particolarità unica di emettere una luce verdognola invece del solito arancione da incandescenza tipico degli altri tipi di valvole "normali".

Il cobalto<sup>60</sup>, radioattivo, trova impiego come sorgente di raggi  $\gamma$

- nella radioterapia
- per la sterilizzazione dei cibi tramite radiazione (pastorizzazione a freddo)
- nella radiografia industriale per il rilevamento di anomalie strutturali in manufatti in metallo.

Il suo uso come tracciante radioattivo è molto diffuso perché è facile da produrre; si ottiene infatti esponendo cobalto naturale ai neutroni prodotti da un reattore nucleare.

## 2.4. Utilizzi in Medicina

### 2.4.1. Radioterapia

Il cobalto-60 (Co-60 o <sup>60</sup>Co) è un isotopo radioattivo usato in passato nella radioterapia; produce raggi  $\gamma$  con energia di 1.17 MeV e 1.33 MeV. Le sorgenti <sup>60</sup>Co hanno un'emivita di circa cinque anni, poi non emettono più raggi  $\gamma$  in quantità sufficiente; restano comunque molto radioattive, ragione per cui in Occidente l'uso di queste apparecchiature è sempre più raro, e si preferiscono usare acceleratori lineari di particelle.

### 2.4.2. Eritropoiesi

Nel passato il cobalto cloruro veniva utilizzato, in aggiunta ai normali agenti emopoietici, per trattare le anemie. Il suo meccanismo d'azione, infatti, prevede la stimolazione della produzione di eritropoietina (Brown e Meineke, 1958), grazie alla sua capacità di mimare una condizione di ipossiemia che chiama in causa diversi geni, inclusi quelli che codificano per l'eritropoiesi e i fattori di angiogenesi (Steinbrech et al., 2000). Il cobalto inibisce la sintesi dell'eme *in vivo*, agendo su almeno due siti di sintesi, determinando così la produzione di cobalto-protoporfirina piuttosto che di eme.

L'effetto è quindi quello di una policitemia, con aumento della viscosità del sangue e di un'intensa angiogenesi (Taylor e Marks, 1978). Con questo principio il cobalto viene utilizzato anche come sostanza dopante dagli atleti: una somministrazione di 150 mg/die di cobalto cloruro per 22 giorni determina un aumento fino al 20% dei globuli rossi; anche l'emoglobina risulta aumentata in una quota pari al 6-11% (Davis e Fields, 1958). Inoltre, la sostanza è di largo impiego poiché facilmente reperibile sotto forma di sale, economica, nonché assente dalla lista delle sostanze dopanti della WDA (world anti-doping agency).

La tecnica terapeutica policitemizzante fu largamente utilizzata, anche se avvenne non senza conseguenze per i pazienti trattati: sono stati riportati casi di gotta (per ridotta capacità di concentrazione dello iodio), mixedema e cardiomiopatia congestizia (Domingo, 1989), i sintomi più importanti però furono quelli neurologici, riscontrati sia a breve che a lungo termine. Schirmacher (1967) ha riportato il caso di una donna trattata per 6 mesi con una dose di 25 mg/die di cobalto cloruro, i cui sintomi erano: calo dell'udito, passo incerto, nausea, vomito e perdita di peso; l'esame clinico ha verificato la presenza di sordità nervosa bilaterale e assenza del riflesso d'Achille; la sospensione della somministrazione ha determinato la remissione dei sintomi. In un altro paziente è stata riscontrata anomala perfusione della corioide e atrofia ottica dopo un trattamento per pancitopenia con 73 gr cobalto cloruro per un periodo di oltre 2 anni e mezzo (Licht et al., 1972). Gardner (1953) ha riportato uno studio su 17 pazienti sottoposti a terapia con cobalto cloruro (dosi non specificate) per curare stati anemici e uremia: quattro di questi lamentavano tinnito dopo un periodo di 4-16 settimane di trattamento, mentre uno di essi ha sviluppato sordità nervosa dopo 12 settimane. In tutti i soggetti la sospensione della terapia portava a remissione dei sintomi, che si ripresentavano qualora la terapia venisse nuovamente impostata.

### **2.4.3. Applicazioni biomediche**

Un recente impiego delle leghe di cobalto riguarda la realizzazione di protesi dentali o di protesi sottoposte a carichi elevati, come quelle del ginocchio e dell'anca.

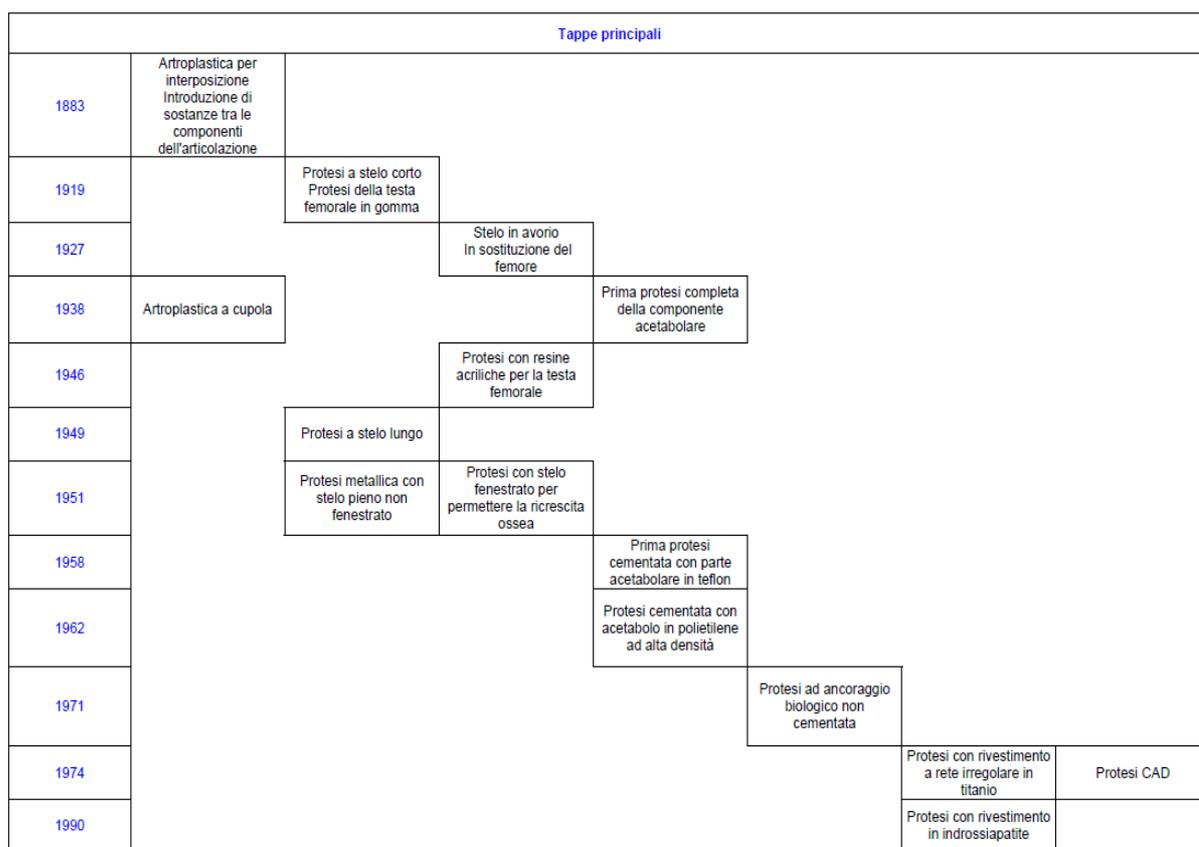
In generale i materiali metallici trovano applicazioni come biomateriali grazie a differenti caratteristiche:

- hanno un elevato modulo elastico ed un'elevata resistenza di snervamento, così da rendere possibile la costruzione di strutture in grado di sopportare carichi elevati senza grandi deformazioni elastiche né deformazioni plastiche permanenti;
- hanno una buona duttilità e quando lo sforzo supera la resistenza di snervamento, la struttura si deforma plasticamente invece di rompersi in maniera fragile. Ciò permette di solito di intervenire sostituendo il componente deformato prima che si rompa;
- hanno un'elevata resistenza alla fatica meccanica, quindi sono indicati per applicazioni per le quali si prevedono cicli di carico.

#### *2.4.4. Evoluzione tecnologica delle protesi d'anca*

I primi tentativi di artroplastica risalgono alla fine del 1800, con l'obiettivo di rimodellare la superficie ossea usurata attraverso l'interposizione, nel punto di contatto tra femore e acetabolo, di una struttura che poteva essere costituita da diversi materiali: legno, argento, cellulose, oro, magnesio, cute, vescica di maiale. Subito emersero le prime difficoltà relative principalmente all'usura del materiale di interposizione e al riacutizzarsi della rigidità articolare e del dolore.

Nella figura seguente (Tab. 1) è riassunta l'evoluzione delle protesi a partire dall'anno 1883, fino ai primi anni '90.



**Tabella 1:** L'evoluzione delle protesi a partire dall'anno 1883, fino ai primi anni '90.

### 2.4.5. Leghe di cobalto

Esistono svariate leghe (miscela di due o più elementi, di cui almeno uno metallico, detto metallo base, con proprietà diverse rispetto a quelle dei singoli costituenti) a base di cobalto, distinguibili in base alla composizione chimica e alle proprietà che le caratterizzano. Alcune leghe di cobalto risultano particolarmente resistenti alla corrosione, altre all'usura, altre ancora al calore. La caratteristica comune a tutte le leghe di cobalto è l'elevata resistenza meccanica, anche alle alte temperature. Le proprietà di tali leghe derivano dalla natura cristallografica del cobalto (in particolare dalla sua capacità di "rispondere" agli sforzi), dall'effetto di rinforzo esercitato dal cromo, dal tungsteno e dal molibdeno presenti in soluzione solida nella matrice di cobalto, dalla formazione di carburi metallici, dall'affinamento del grano cristallino e

dalla resistenza alla corrosione impartita dal cromo. Generalmente le tipologie di leghe meno dure e più tenaci vengono impiegate come leghe resistenti alle alte temperature, mentre quelle caratterizzate da elevata durezza vengono impiegate come leghe resistenti all'usura.

La lega Vitallium (60% cobalto, 20% cromo, 5% molibdeno, più altre sostanze), viene utilizzata principalmente per la realizzazione di protesi odontoiatriche, del ginocchio e d'anca grazie alla sua eccellente resistenza alla corrosione, indotta dai fluidi biologici e all'ottima resistenza alla fatica.

Nell'ultima decade, una tecnica molto utilizzata per le protesi d'anca è la MoMHA (*metal on metal hip arthroplasty*); questa prevede la sostituzione della testa del femore e della cavità acetabolare, con delle strutture di una lega particolarmente resistente di metallo, in cui è sempre compreso il cobalto. La tecnica trova largo impiego in soggetti giovani o molto attivi: rispetto alle protesi precedenti, in cui venivano utilizzati sostituenti in plastica, la cui durata era relativamente breve, quelle *metal on metal* subiscono molto meno l'usura, permettendo sostituzioni quasi nulle nel tempo. L'attuale rivestimento delle protesi *metal on metal* è costituito da una lega CoCrMo. In una recente *review* della "Nationwide Inpatient Sample", è risultato che il 35% dei 112.095 casi di riposizionamento totale di protesi d'anca, tra il 1° ottobre 2005 e il 31 dicembre 2006, fossero MoMHA.

Dato il loro utilizzo come protesi, le leghe devono sopperire a diversi tipi di usura:

**Usura abrasiva:** quando una superficie viene a contatto con particelle aventi durezza maggiore o uguale a quella della superficie stessa. Il metodo più efficace, per aumentare la resistenza di un materiale all'usura abrasiva, consiste nell'aumentarne la durezza, come nelle stellite, (leghe cobalto-cromo che contengono anche tungsteno ed una ridotta quantità di carbonio), che contengono una fase molto dura sotto forma di precipitati. Tale resistenza aumenta all'aumentare del tenore della fase più dura all'interno della lega. La resistenza all'abrasione è influenzata anche dalla dimensione e dalla forma dei precipitati, dalla dimensione e dalla forma delle particelle abrasive.

**Usura adesiva:** consiste nella rottura per taglio delle asperità microscopiche di due superfici metalliche in moto relativo di sfregamento tra di loro. Può essere ridotta per

mezzo di un lubrificante che impedisca alle superfici di saldarsi, oppure con l'accoppiamento di metalli che abbiano una bassa solubilità allo stato solido. Anche la presenza di ossido può ridurre l'usura adesiva.

**Usura erosiva:** ha origine quando le particelle in un fluido (o in un altro veicolo) scivolano e rotolano a velocità relativamente alta contro una superficie. Ogni particella provoca il distacco di un piccolo frammento dalla superficie interessata.

**Usura per fatica:** è prodotta da sollecitazioni periodiche di contatto hertziano tra superfici che si scambiano forze.

## 2.5. Funzione biologica del cobalto nell'organismo

Sono classificati come “elementi in traccia”, gli elementi che appartengono alla categoria dei micronutrienti, cioè necessari all'organismo in piccole quantità, come i metalli di transizione: vanadio, cromo, manganese, ferro, cobalto, rame, zinco, e molibdeno; e i non metalli: selenio, fluoro, e iodio. Tuttavia, pur essendo componenti essenziali di alcune strutture biologiche possono diventare tossici in concentrazioni che vanno al di là di quelle necessarie per tali funzioni.

I criteri utilizzati per definire l'essenzialità di un elemento possono essere così riassunti:

- a) la ridotta introduzione produce danni funzionali
- b) l'assenza inibisce la crescita o il compimento di un ciclo vitale dell'organismo
- c) l'influenza sul metabolismo di un dato organismo è diretta
- d) la reintroduzione nella dieta in quantità fisiologiche previene e cura i sintomi da deficienza
- e) gli effetti non possono essere completamente eliminati tramite sostituzioni con altri elementi (Alessio e Apostoli, 2010).

Il cobalto può essere introdotto mediante cibo, aria o acqua contaminati. Sono stati evidenziati incrementi dei valori in fumatori e in soggetti che fanno uso di complessi multivitaminici. Il tabacco contiene cobalto in una quota  $>0.3-2.3 \mu\text{g}$  di peso secco, lo 0.5% si trova nel fumo che viene aspirato (*mainstream smoke*) (Munita e Mazzilli, 1986; Ostapczuck et al., 1987; Stebbins et al., 1992; Barceloux, 1999).

È un elemento essenziale per l'uomo, in quanto componente della vitamina B12 (Lison, 2007), che è coenzima in molte reazioni enzimatiche, tra cui la conversione dell'omocisteina a metionina, ma anche nella trasformazione di L-metilmalonilcoenzima A (CoA) a succinilcolinCoA; la cianocobalamina è inoltre coinvolta nella costituzione di enzimi interessati nell'ematopoiesi, questo spiega la gravità della sua carenza e la sua implicazione nell'anemia, in particolare la perniziosa (Domingo, 1989). La razione giornaliera consigliata di vitamina B12 (*Recommended dietary allowance-RDA*) negli adulti è di 2.4 µg/die, in cui sono contenuti 0.1 µg di cobalto.

## 2.6. Esposizione professionale

L'esposizione occupazionale al cobalto si verifica frequentemente in soggetti che lavorano presso industrie che producono metalli e leghe (calamite, estremità di trapani), inoltre i sali di cobalto si usano nell'industria della ceramica, per la produzione di cemento e vetro; in questi luoghi le concentrazioni medie di cobalto variano tra 0.01 e 1.7 mg/m<sup>3</sup> (Meyer-Bisch et al., 1989; Swennen et al., 1993; Scansetti et al., 1998; Kraus et al., 2001). In questi ambienti la via di penetrazione principale è quella inalatoria, ma possono avvenire anche assorbimenti tramite la cute: in piccola misura attraverso la cute intatta, maggiormente attraverso quella abrasa (Scansetti et al., 1994; Larese Filon et al., 2004).

Il quadro clinico costantemente riscontrato è di fibrosi polmonare interstiziale, con insorgenza subacuta o cronica. La prima tende a manifestarsi dopo alcuni mesi dall'inizio dell'esposizione, può progredire rapidamente e migliora solo con la sospensione del contatto e con il trattamento con corticosteroidi per via orale. La ripresa dell'esposizione determina una recidiva del quadro. La forma cronica si sviluppa dopo numerosi anni dall'inizio dell'esposizione, progredisce più lentamente e manifesta un miglioramento più scarso sia alla sospensione dell'esposizione sia al trattamento con corticosteroidi *per os*. Altre forme respiratorie che seguono un'esposizione cronica professionale al cobalto sono: irritazione polmonare, diminuzione della funzionalità polmonare, fischio, asma e polmonite (Kusaka et al., 1986, 1992, 1996; Shirakawa et

al., 1990; Ruokonen et al., 1996; Hahtola et al., 2000; Sundaram et al., 2001). Il cuore, a seguito di inalazione cronica di polvere di cobalto, subisce una cardiomiopatia caratterizzata da effetti funzionali sui ventricoli e/o dilatazione (Horowitz et al., 1988; Jarvis et al., 1992).

Swennen et al. (1993) hanno anche dimostrato, raramente ma con risultati statisticamente significativi, un calo dei globuli rossi totali e dell'emoglobina (calo del 4-5%) in un gruppo di 82 lavoratori esposti a una concentrazione di 0.125 mg Co/m<sup>3</sup> in forma di polvere di cobalto metallico.

Un gruppo di donne esposte in ambiente lavorativo a uno smalto di silicato di zinco e cobalto, con concentrazione stimata intorno ai 0.05 mg Co/m<sup>3</sup> ha riportato un innalzamento significativo dei livelli di tiroxina (T4) e di tiroxina libera, ma non di T3 (Prescott et al., 1992). Al contrario, Swennen et al. (1993) hanno rilevato una riduzione significativa di T3 e nessuna alterazione del T4 sierico in lavoratori esposti a cobalto ossido, sale e metallico.

Le esposizioni occupazionali determinano anche effetti sul sistema nervoso centrale: due studi riguardanti intossicazione occupazionale per inalazione hanno riportato perdita della memoria, atrofia ottica e sordità (Jordan et al., 1990; Meecham e Humphrey, 1991). In 12 lavoratori di tungsteno e cobalto, confrontandoli con soggetti sani non esposti, sono state dimostrate anche: calo dell'attenzione e della memoria verbale.

Un lavoratore esposto a polvere di cobalto per 20 mesi ha riportato atrofia del nervo ottico e sordità nervosa bilaterale: i valori di cobalto ematici erano 234 µg/l. Dopo 14 mesi di sospensione dal contatto, la vista è andata migliorando, come anche l'udito (Meecham e Humphrey, 1991).

Molti studi hanno cercato anche una correlazione tra l'esposizione aerea occupazionale al cobalto e forme cancerose. In uno studio su 1.143 lavoratori di una fabbrica che lavora cobalto e sodio è stata valutata la mortalità (Mur et al., 1987), come valore di riferimento è stata presa la mortalità in Francia. Dallo studio è emersa una mortalità superiore alla media causata da cancro ai polmoni. L'Autore riporta però che i soggetti erano esposti contemporaneamente anche a nichel e arsenico. Altri studi (Lasfargues et al., 1994; Moulin et al., 1998, 2000; Wild et al., 2000) hanno riportato dati ascrivibili a quelli sopra citati.

Nei lavoratori di cobalto è stato dimostrato che la concentrazione urinaria di cobalto aumenta rapidamente nelle ore che seguono la fine dell'esposizione, con un picco di eliminazione tra le 2 e le 4 ore *post* esposizione e diminuisce nei giorni successivi (Apostoli et al., 1994).

### **2.6.1. Biomarkers di esposizione**

Nei luoghi di lavoro è riscontrato solitamente un livello di concentrazione di cobalto da  $1.0 \times 10^4$  a  $1.7 \times 10^6$  ng/m<sup>3</sup> (Barceloux, 1999).

L'analisi del cobalto nelle urine è uno degli esami di maggior rilievo per il monitoraggio dell'esposizione al metallo nei luoghi di lavoro. In uno studio svolto da Ichikawa et al., (1985) è stato infatti evidenziato un *gap* particolarmente rilevante tra i valori di cobalto urinario nei lavoratori del metallo (59-79 µg/l) e nei soggetti non esposti (2 µg/l).

La concentrazione del cobalto in un campione di urine raccolte l'ultimo giorno della settimana lavorativa indica l'esposizione della settimana appena conclusa, mentre quella raccolta il lunedì indica i livelli di esposizione cronica occupazionale (Templeton, 1996). Per consentire la valutazione dell'esposizione i risultati devono essere confrontati con appropriati riferimenti e principalmente con i valori di riferimento e i valori biologici limite (BEI, *biological exposure index*), ossia con quei livelli che siano considerati di entità tale da non causare alcuna alterazione dello stato di salute dei soggetti esposti.

E' necessario conoscere la quantità di sostanza alla quale un soggetto si trova effettivamente esposto ed il periodo di tempo di esposizione tenendo conto delle diverse vie di penetrazione nell'organismo.

Vengono perciò proposti degli indicatori biologici di esposizione (BEI), suggeriti da Agenzie Internazionali e da comitati scientifici comunitari in base alle informazioni su: assorbimento, escrezione e metabolismo delle sostanze chimiche e sulla correlazione tra intensità di esposizione ed effetti biologici.

L' ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) ha imposto un BEI pari a 15 µg/l di cobalto nelle urine e 1 µg/l nel sangue (Tab. 2) alla fine della settimana lavorativa e un limite massimo di 0.02 mg/m<sup>3</sup> nell'aria.

		BEI	BAT	EKA
Cobalto	U	15 µg/l	60 µg/l	300 µg/l
	S	1	/	25 µg/l

**Tabella 2:** Confronto tra i valori degli indici biologici di esposizione (BEI dell'ACGIH) ed i valori di tolleranza biologica (BAT e EKA della DFG) del cobalto (U urine, S siero).

I BAT (*Biologischer Arbeitsstoff-Toleranz-Wert*) (valori di tolleranza biologica per esposizioni occupazionali) sono definiti come la quantità massima permessa di una sostanza chimica, o dei suoi metaboliti, nei fluidi biologici di soggetti esposti; il valore è riferito a esposizioni di otto ore giornaliere per quaranta ore settimanali.

La IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ha classificato l'esposizione associata tra cobalto e tungsteno come probabilmente cancerogena per l'uomo (gruppo 2A) (Tab. 3), benché la sola esposizione a cobalto sia classificata 2B (possibilmente cancerogeno).

Elemento	Specie	ACGIH	DFG	IARC	UE
Cobalto	Co e composti	A3(inorganici)			
	Co metallico		2	2B	
	Co carbonato		2		
	Co ossido		2		
	Co solfato		2 e Sali	2B	R49
	Co solfuro		2		
	Co dicloruro				R49
	Sali solubili di			2B	

**Tabella 3:** Classificazione della cancerogenicità del cobalto secondo diverse agenzie (ACGIH, DFG, IARC e UE) da "Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia" (2008).

La Deutsche Forschungsgemeinschaft pone il cobalto tra i cancerogeni di categoria 2 (considerati cancerogeni per l'uomo) e la combinazione Co WC (carburo di tungsteno) in categoria 1 (cancerogeni). La CEE attribuisce al cobalto le frasi di rischio R 42-43

(rispettivamente: “può provocare sensibilizzazione per inalazione” e “può provocare sensibilizzazione per contatto con la pelle”); l’etichettatura suggerisce i consigli di prudenza S22 24 37 (vale a dire non respirare le polveri, evitare il contatto con la pelle, usare guanti idonei), il Recommended Exposure Limit (REL) proposto dal NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) è di 0.05 mg/m<sup>3</sup>. L'ACGIH ha collocato il cobalto ed i suoi composti inorganici nella categoria A3 (cancerogeno per gli animali da laboratorio): l'agente è cancerogeno per gli animali da laboratorio in concentrazioni relativamente elevate.

### 3. TOSSICITÀ DEL COBALTO E SUOI EFFETTI SULLA SALUTE

Il cobalto si può trovare naturalmente disperso nell'aria, nell'acqua o in alimenti contaminati. E' un elemento scarsamente disponibile se in forma libera nell'ambiente, ma se le particelle non sono legate al terreno o al sedimento, l'assorbimento da parte di piante ed animali è più alto e può verificarsi accumulo; questo si riscontra soprattutto nelle parti delle piante che mangiamo come la frutta e i semi. I terreni in prossimità di miniere ed impianti di fusione possono contenere quantità molto elevate di cobalto.

Per quello che riguarda l'alimentazione degli animali, i composti di cobalto sono autorizzati dalla normativa comunitaria come additivi per i mangimi (CE, 2003).

L'EFSA ha intrapreso una valutazione del rischio dell'uso di questi composti nell'alimentazione animale, prendendo in esame la necessità dell'integrazione del cobalto per le specie bersaglio, tenendo conto dei potenziali effetti negativi della riduzione/eliminazione dell'integrazione di cobalto sulla salute degli animali (EFSA, 2009).

Gli animali monogastrici, esclusi cavalli e conigli, non hanno bisogno di cobalto, ma di vitamina B12, pertanto la loro alimentazione non richiede di integrazione con cobalto.

La microflora dei ruminanti è in grado di sintetizzare la vitamina B12, a condizione che nell'alimentazione sia presente una quantità di cobalto sufficiente. Il fabbisogno di vitamina B12 di questi animali può quindi essere soddisfatto dal contenuto di cobalto normalmente presente negli alimenti. Anche l'organismo dei ruminanti richiede solo la vitamina B12. Non sono tuttavia disponibili dati sufficienti per valutare le conseguenze sulla salute e sul rendimento di queste specie dell'eventuale sostituzione del cobalto con la vitamina B12 in condizioni di allevamento. L'eliminazione del cobalto comprometterebbe inoltre la microflora ruminale, la sua composizione e le sue funzioni. Taluni effetti benefici minori, osservati nei ruminanti, a seguito della somministrazione di cobalto potrebbero essere collegati a un generico effetto del cobalto sulla microflora piuttosto che alla vitamina B12. Il gruppo di esperti scientifici dell'EFSA su additivi, prodotti e sostanze usati nei mangimi ha concluso che la potenziale integrazione del cobalto nell'alimentazione di ruminanti, cavalli e conigli dovrebbe essere mantenuta. Un'integrazione di cobalto nella misura di 0.3 mg/kg peso secco e un contenuto massimo di 1 mg Co/g di mangime completo è considerato appropriato.

In uno studio effettuato da Diaz et al., (1994), pulcini di un giorno a cui sono stati somministrati 125-250-500 mg di cobalto/kg di alimento per 14 giorni, hanno diminuito l'ingestione di cibo e di conseguenza il peso; la mortalità riscontrata è stata dose-dipendente. La crescita di pulcini di 2 settimane cui venivano somministrate dosi di 100 mg cobalto/kg cibo è stata fortemente compromessa, mentre a dosi di 50 mg/kg non sono stati riscontrati effetti. Dopo 5 settimane, a un dosaggio di 200 mg/kg la mortalità è cresciuta in maniera significativa (Hill, 1974). In anatre bianche di 2 settimane esposte a 100 mg/kg di cobalto per 15-28 giorni, la crescita ha subito dei ritardi, mentre livelli di 50 mg/kg non hanno determinato effetti avversi (Van Vleet et al., 1981). La somministrazione ad anatre di 200 mg/kg di Co per 15-28 giorni ha determinato lo sviluppo di lesioni simili a quelle da carenza di vitamina E-selenio, come necrosi dei muscoli cardiaci, scheletrici e dei muscoli lisci del gozzo e dell'intestino, ma non è stata riportata mortalità significativa.

### **3.1. Carenza di cobalto**

Sono rari i casi nell'uomo di segni clinici da carenza di cobalamina per deficit alimentari. La mancanza di vitamina B12 porta allo sviluppo di anemia megaloblastica (caratterizzata dalla presenza di grossi eritrociti immaturi), alterazioni della sintesi cellulare del DNA e neuropatia con comparsa progressiva di sintomi. Tra questi elenchiamo debolezza, soprattutto in braccia e gambe, stanchezza, dispnea da sforzo, formicolii, perdita di appetito e di peso, perdita del senso del gusto, dell'olfatto, impotenza, disturbi psichiatrici (irritabilità, disturbi della memoria, lieve depressione, allucinazioni) e grave anemia. I sintomi da deficit di vitamina B12 sono simili a quelli da deficit di acido folico; la differenza principale è data dal fatto che solo il deficit di vitamina B12 è associato a degenerazione midollare. Se si utilizza acido folico per il trattamento della carenza da vitamina B12 è possibile osservare un miglioramento dell'anemia, ma il rischio di danno a livello del sistema nervoso resta invariato.

## 4. TOSSICOCINETICA

### 4.1. Assorbimento

#### 4.1.1. *Via inalatoria*

Le particelle di cobalto inalato si depositano nel tratto superiore ed inferiore dell'apparato respiratorio e vengono poi assorbite attraverso diversi meccanismi (Casarett e Doull, 1986). Il modo con cui si depositano è correlato alle dimensioni delle stesse: le particelle con diametro  $\geq 2 \mu\text{m}$  tendono a depositarsi nel tratto respiratorio superiore, dove il flusso d'aria ha caratteristiche tali da favorirne l'impaccamento per inerzia. Le particelle più piccole raggiungono il tratto respiratorio inferiore, dove il flusso d'aria è più debole, qui si depositano grazie a sedimentazione e precipitazione elettrostatica e vi rimangono finché non vengono assorbite o fagocitate dai macrofagi. Studi sui criceti hanno permesso di riscontrare un assorbimento pari circa il 30% della dose di cobalto ossido somministrata (Wehner et al., 1977).

Le particelle deposte nel tratto respiratorio possono arrivare al sangue dopo assorbimento o possono venire trasportate meccanicamente al tratto gastrointestinale (azione mucociliare o deglutizione). La quota è influenzata dalle dimensioni delle particelle inalate e dalla loro solubilità. Ci sono differenze nella clearance a seconda delle diverse specie: nell'uomo circa la metà del deposito polmonare persiste per 6 mesi dopo l'esposizione, al contrario nel ratto la clearance del cobalto dai polmoni risulta quasi completa dopo 6 mesi.

#### 4.1.2. *Via digerente*

L'assorbimento gastroenterico varia dal 18 al 97% della dose somministrata in base a tipo e dose di cobalto, nonché in base allo stato nutrizionale del soggetto (Smith et al., 1972). Nell'uomo deficitario di Fe ne viene assorbita una quota maggiore (31-71% nei carenti, 18-44% nei controlli) (Sorbie et al., 1971). Inoltre in soggetti di sesso femminile l'escrezione di cobalto, dopo somministrazioni di cobalto cloruro, è superiore rispetto ai soggetti di sesso maschile (Christensen et al., 1993).

Nei modelli animali, molti fattori sono risultati determinanti nel condizionare l'assorbimento gastroenterico del cobalto: nel ratto (Ayla-Fierro et al., 1999) il cobalto cloruro è assorbito in un range tra il 13 ed il 34%, mentre particelle di cobalto ossido, fisiologicamente insolubile, viene assorbito nel range 1-3% (Patrick et al., 1989). Non risultano influenti le dimensioni delle particelle di cobalto somministrate sul loro assorbimento gastroenterico.

La somministrazione di cobalto cloruro, marcato con  $^{58}\text{Co}$  radioattivo e complessato con istidina, lisina, glicilglicina, EDTA, caseina o glicina, ha determinato una diminuzione nella quota di Co assorbito; somministrazioni di cobalto cloruro (tracciato con  $^{58}\text{Co}$ ) in latte vaccino hanno, invece, determinato un incremento di circa il 40% dell'assorbimento a livello gastroenterico (Taylor, 1962). I composti idrosolubili hanno generalmente un assorbimento maggiore rispetto ai non idrosolubili, dimostrando che la forma chimica dei composti di cobalto influenza il suo assorbimento (Firriolo et al., 1999). La simultanea somministrazione di cobalto e ferro diminuisce la quota di cobalto assorbita (Reuber et al., 1994). L'assorbimento negli animali giovani (ratto e cavia esaminati dal 1° al 60° giorno di vita) è dalle 3 alle 15 volte superiore rispetto agli adulti (200 giorni di età) (Naylor e Harrison, 1995).

#### **4.1.3. Via percutanea**

Il cobalto contenuto nelle polveri di metalli può essere assorbito a livello cutaneo. L'assorbimento di cobalto attraverso la pelle intatta è risultato inferiore al 1%, mentre l'assorbimento attraverso la pelle abrasa è pari a circa 80% dopo 3 ore dall'esposizione.

#### **4.1.4. Altre vie di esposizione**

Dopo somministrazione intravenosa di cobalto cloruro nella specie umana, circa il 30% della dose viene eliminata tramite le urine entro le 24 ore, il 56-73% entro 48 h, e il 57% è escreto in 2 settimane (Paley et al., 1958; Smith et al., 1972). Dopo somministrazione intraperitoneale si nota un andamento simile a quello appena descritto: l'eliminazione tramite le urine è sempre quella principale (Hollins e McCullough, 1971).

## 4.2. Legame siero-proteico

### 4.2.1. Albumina

L'albumina sierica umana (HSA) è composta da una singola catena di 585 residui, ha un'emivita di circa 20 giorni ed è la più abbondante tra le proteine sieriche (Carter e Ho, 1994; Peters, 1995). E' responsabile del trasporto di lipidi, metaboliti, farmaci, ormoni e xenobiotici, inoltre trasporta gli ioni metallici ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Ni}^{2+}$ ). Il sito di legame ad elevata affinità per  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  è localizzato nella regione N-terminale costituita dalla sequenza aminoacidica Asp Ala His Lys, (Bar Or et al., 2001) e questo prevede la coordinazione del metallo ai primi tre aminoacidi (Wojciech et al., 1998). In soggetti portatori di protesi la determinazione dell'associazione di Co e proteine, rivela un forte legame tra Co e albumina (Nuevo Ordonez et al., 2009).

### 4.2.2. Albumina modificata

L'albumina con il frammento N-terminale modificato viene definita Albumina Modificata; poiché uno degli eventi principali che provoca questa alterazione è rappresentato da eventi ischemici, viene comunemente definita Albumina Modificata dall'Ischemia (Ischemia Modified Albumin, IMA). Il danneggiamento del sito di legame è determinato dalla liberazione di radicali liberi e di altre specie reattive, prodotte durante la riperfusione tissutale post ischemica, che determinano alterazioni della struttura, del metabolismo e delle funzioni delle proteine. Il sito di legame ai metalli di transizione nella regione N-terminale della molecola subisce un'alterazione di natura ossidativa che favorisce la liberazione nel sangue di una considerevole quantità di cobalto ed altri metalli (Bar Or et al., 2000, 2001, 2008).

La ischemia-modified albumin (IMA) è un biomarker molto sensibile di ischemia miocardica che viene utilizzato in Medicina Umana tramite il test ACB ("albumin cobalt binding" test) (metodo validato ed automatizzato Bar-Or 2000; Albumina Cobalt binding test Roche Cobas Mira® Plus e Cobas Fara®) approvato da FDA (Food and Drug Administration); detto test si basa sulla possibilità di diagnosticare ischemia miocardica prima della comparsa della necrosi cellulare, attraverso la misurazione del cobalto non legato. Ciononostante, non sembra che elevati valori di IMA dipendano

solamente da danni a livello del miocardio, ma anche da condizioni di riperfusione post ischemica di qualunque altro organo che non sia il cuore (Borderie et al., 2004). Aumenti significativi di IMA sono stati osservati in molte patologie nelle quali sono presenti eventi ischemici correlati ad un aumento dello stress ossidativo: sclerodermia, ischemie placentari, attività fisica intensa, neoplasie, ipossia, diabete, acidosi, alterazioni energetiche dipendenti della pompa sodio-calcio (Lippi, 2005, 2006; Montagnana, 2006).

Una condizione non-patologica che provoca un aumento dell'IMA è la massiccia presenza di rame, poiché la sua costante di legame ( $K_a$ ) con l'albumina è  $1.5 \times 10^{16}$  l/mol contro  $6.5 \times 10^3$  del cobalto (Nandedkar, 1974; Masuoka, 1993; Berenshtein, 1997).

Durante l'ischemia un meccanismo sussidiario che entra in gioco è quello del gene  $\alpha$  del fattore inducibile dall'ipossia (HIF), stabilizzato con forza dal cobalto durante la generazione di specie reattive dell'ossigeno tramite un meccanismo non enzimatico e non mitocondriale (Lippi et al., 2005). HIF-1 è il principale regolatore dell'omeostasi dell'ossigeno (Cai et al., 2003); questo fattore si accumula nel nucleo, determinando la trascrizione di geni essenziali per l'adattamento cellulare a basse concentrazioni di ossigeno, aumentando la resistenza nei confronti dei danni ischemici. Questi geni includono il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), l'eritropoietina e il trasportatore 1 del glucosio, che viene attivato come sistema per compensare la beta ossidazione degli acidi grassi nel cuore compromesso (Jelkmann, 2004; Dery et al., 2005).

Anche il cobalto può indurre uno stato di ipossia stabilizzando la subunità  $\alpha$  di HIF-1 e aumentando di conseguenza l'espressione di geni regolatori dell'ipossia come eritropoietina, fattori di crescita endoteliali (VEGF) e altri processi che consentono la sopravvivenza della cellula soprattutto a bassa presenza di ossigeno (Semenza et al., 1994). Il cobalto solubile aumenta gli indici di stress ossidativo, includendo tra questi la diminuzione del glutathione ridotto, incrementando i livelli di glutathione ossidato, attivando la via degli esosi monofosfato, nonché inducendo danni al DNA tramite radicali (Lewis et al., 1991; Kasprzak et al., 1994; Zhang et al., 1998; Hoet et al., 2002) perossido (Ivancsits et al., 2002).

### 4.3. Distribuzione

Benché le particelle di cobalto metallico siano praticamente insolubili in acqua, la loro solubilizzazione è aumentata nei fluidi biologici, questo perché gli ioni Co(II) si legano in larghissima parte alle proteine (0.003 mg/l in soluzione salina fisiologica, 152.5 mg/l in plasma umano a 37°C) (Lison et al., 1995).

Come componente della vitamina B12, il cobalto si trova nella maggior parte dei tessuti dell'organismo. E' stato riscontrato in muscolo, polmone, linfonodi, cuore, pelle, ossa, capelli, cervello, succo pancreatico, reni, plasma e vescica urinaria di soggetti non esposti, i livelli più elevati si riscontrano nel fegato (Forbes et al., 1954; Yamagata et al., 1962; Yukawa et al., 1980; Teraoka, 1981; Collecchi et al., 1986; Ishihara et al., 1987; Muramatsu e Parr, 1988). Il contenuto totale di cobalto nell'organismo umano è stimato essere circa tra 1.1-1.5 mg (ICRP 1979; Yamagata et al., 1962), di cui circa 0.11 mg nel fegato (ICRP 1979).

#### 4.3.1. Dopo inalazione

Sia nell'uomo che negli animali la quota maggiore di cobalto si riscontra nei polmone (Patrick et al., 1989; Talbot e Morgan, 1989), ed in particolare nei macrofagi, all'interno della parete bronchiale o nell'interstizio, vicino al bronchiolo terminale (Brune et al., 1980).

#### 4.3.2. Dopo ingestione

Non sono presenti studi nell'uomo che indichino la distribuzione del cobalto dopo ingestione; negli animali viene riscontrato principalmente nel fegato (Simesen, 1939; Greenberg et al., 1943; Ayala-Fierro et al., 1999), ma anche in rene, cuore, e intestino (Firriolo et al., 1999). Dopo esposizione orale del ratto in gravidanza, sono stati osservati incrementi dei livelli di Co sia nel sangue fetale, sia nel liquido amniotico (Szakmary et al., 2001).

### **4.3.3. Altre vie di esposizione**

Dopo somministrazioni intravenose di cobalto cloruro (in forma di cobalto radioattivo  $^{55}\text{CoCl}_2$  e  $^{56}\text{CoCl}_2$ ) nell'uomo, i livelli più elevati di cobalto sono stati riscontrati in fegato e vescica (Jansen et al., 1996), mentre nel ratto fegato (22,8%), rene (10,2%) ed intestino (3,16%) (Gregus e Klassen, 1986). Sempre nel ratto, risultati simili (29% fegato, 10% reni, 4.6% intestino) sono stati osservati dopo un'iniezione intracardiaca di cobalto nitrato (Patrick et al., 1989). Un centinaio di giorni dopo una somministrazione endovena e intraperitoneale di  $^{60}\text{CoCl}_2$  nel ratto, le sedi maggiormente interessate dall'elemento erano milza>cuore>osso, mentre fegato e reni, che presentavano i livelli più elevati subito dopo la somministrazione, risultavano caratterizzati da livelli più bassi (Thomas et al., 1976). Risultati simili sono stati riscontrati 132 giorni dopo un'iniezione intraperitoneale di  $^{60}\text{CoCl}_2$  in ratti (Barnaby et al., 1968).

## **4.4. Eliminazione**

### **4.4.1. Dopo inalazione**

Dopo l'esposizione a composti insolubili di cobalto (cobalto ossido, cobalto metallico), la clearance nell'uomo sembra seguire una cinetica a tre fasi. La prima principalmente ad opera dell'apparato mucociliare della regione tracheobronchiale (Apostoli et al., 1994); la seconda dell'azione macrofagica nei polmoni (Belezny e Osvay 1994); la terza è quella polmonare a lungo termine che comporta un'emivita di anni (Bailey et al., 1989; Belezny e Osvay 1994). La dimensione delle particelle influenza l'eliminazione, perché le particelle di dimensioni maggiori vengono trasportate all'apparato gastroenterico (Bailey et al., 1989; Foster et al., 1989). Dopo un'esposizione controllata ad ossalato di Co, il 17% del sedimento polmonare iniziale viene eliminato tramite le feci, il 40% viene trattenuto per un periodo di circa 6 mesi dall'esposizione, trascorsi i quali circa il 33% viene eliminato con le urine ed il 28% con le feci (Foster et al., 1989).

Nei fumatori non esposti a cobalto per motivi di lavoro, i livelli urinari risultano ad ogni modo più elevati (0.6  $\mu\text{g/l}$ ) rispetto ai non fumatori (0.3  $\mu\text{g/l}$ ). Non sono state invece riscontrate differenze nei valori ematici (Alexandersson, 1988).

#### 4.4.2. Dopo ingestione

Dopo ingestione, nell'uomo la via fecale rappresenta la principale via di eliminazione, varia considerevolmente (dal 3 al 99%) in base alla quota e al tipo di cobalto assunto, nonché allo stato nutrizionale del soggetto (Valberg et al., 1969; Sorbie et al., 1971; Smith et al., 1972). Inoltre, stati di carenza di ferro, comporterebbero una ridotta eliminazione fecale di Co, che sarebbe quindi assorbito in maggiore quantità (Sorbie et al., 1971; Valberg et al., 1969).

Anche negli animali l'eliminazione avviene principalmente tramite le feci, con variazioni a seconda della solubilità dei composti di cobalto (all'aumentare della solubilità decresce la clearance fecale). In diverse specie la somministrazione orale di  $\text{Co}_3\text{O}_4$  (tracciante  $^{57}\text{Co}$ ), comporta l'assorbimento di una piccola quota, mentre la maggior parte (96%) viene velocemente eliminata con le feci. Per il  $\text{CoCl}_2$ , l'eliminazione fecale varia tra 70 e 83% della dose somministrata, mentre l'eliminazione urinaria copre la parte restante (Barnaby et al., 1968; Hollins e McCullough, 1971; Ayala-Fierro et al., 1999). Anche nel ratto, ugualmente a quello che succede nell'uomo, i livelli di Fe risultano determinanti nel maggior o minor assorbimento di Co, quindi nella prevalente, o meno, escrezione fecale (Reuber et al., 1994; Schade et al., 1970).

## 5. SCAMBI PROTESI-ORGANISMO

Il rilascio di cobalto metallico nella circolazione sistemica è ben documentato in soggetti con protesi totale d'anca (Sunderman et al., 1989; Gröbl et al., 2007; Vendittoli et al., 2007).

Il rilascio delle particelle dalla protesi si può verificare per disfacimento, corrosione da contatto, corrosione da abrasione ed usura.

La corrosione avviene quando atomi metallici si ionizzano e vanno in soluzione, oppure si combinano con l'ossigeno o altri elementi in soluzione, formando composti che si distaccano dal pezzo metallico o che si dissolvono. Questi detriti metallici possono essere presenti in forma colloidale o ionica (specificamente o non specificamente legati a proteine), sotto forma di sali o ossidi inorganici, oppure immagazzinati in depositi biologici, come ad esempio l'emosiderina.

In molti studi è stata misurata la concentrazione di cobalto dopo posizionamento di protesi d'anca (Tab. 4), paragonando i valori rilevati con quelli di un gruppo di controllo.

In alcuni di questi studi la concentrazione di cobalto nei soggetti con protesi era statisticamente più alta, ma una differenza sostanziale è stata riscontrata solo in 4 dei casi riportati (Megaterio et al., 2001; Steens et al., 2006; Oldenburg et al., 2009; Rizzetti et al., 2009).

Tutti i soggetti sopra riportati avevano subito una revisione chirurgica, e la testa del femore che prima era in ceramica, dopo la rottura è stata sostituita con componenti *metal-on-polyethylene*. Molti Autori hanno potuto constatare metallosi periprotetiche imponenti dopo queste revisioni, portandoli a concludere che una sostituzione di componenti in ceramica con componenti in metallo sia controindicata (Lhotka et al., 2003; Matzolis et al., 2003); infatti, piccole particelle di ceramica possono restare *in situ*, e agire sulla nuova protesi metallica come una mola (Gallinaro e Piolatto, 2009).

Inoltre le protesi *metal-on-metal* determinano un rilascio di metallo 4.5-8.5 volte più alto rispetto ad altre protesi (Black, 1996; Jacobs et al., 1996).

Uno studio "follow up" ha dimostrato che nei primi 2 anni dopo l'impianto di una protesi le concentrazioni ioniche aumentano rapidamente (Isaac et al., 2009).

Study		Time	N°	Serum	Whole Blood	Control Group	Data	Note
Sunderman et al., 1989	Follow-up	7-8 (d) 6-120 (w)	28	0.08±0.04 0.15±0.04		No sign	mean ± std dev	#
Schaffer et al., 1999	Follow-up	1 (y) 2 (y)	76		1 (0.1-4) 1.8 (0.3-6.5)	P=0.007 P=0.002	median (range)	M/M THR
Harding et al., 2002	Case-control	27.5 (m)	20	0.65 (0.29-3.01)		P=0.01	Media (range)	
Skipor et al., 2002	Follow-up	3(m) 6 (m) 12 (m)	25	1.26±0.37 1.20±0.77 1.07±0.26			mean ±95%CI	M/M hip resurfacing arthroplasty
Clarke et al., 2003	Follow-up	16 (m) (7-56)		2.24 (0.83-2.59)			median (range)	M/M hip resurfacing arthroplasty
Keel., 2004	Case report	7 (m)	1	1.5				
Back et al. 2005	Follow-up	3 (m) 6 (m) 12 (m) 24 (m)	20	0.84 (0.29-2.13) 0.96 (0.25-1.91) 0.68 (0.30-1.93) 0.54 (0.25-0.95)			mean (range)	M/M THR
Rasquinha et al., 2006			10	2.35±2.39 (0.58-7.93)			mean std dev (range)	M/M primary THA
Milosev et al., 2005	Case-control	18-58 (m) 62-107 (m)	43	0.29±0.17 0.40±0.20		P<0.001	mean ± std dev	M/M THR
Iavicoli et al., 2006		15.3 (m)		14.0±10.9		P<0.0001	mean ± std dev	Metal hybrid surface arthroplasty
Steens et al., 2006	Case-report	2 (y) After revision	1	398				
Sauvè et al., 2007	Case-control		5	2.01 (1- 3.4)		P=0.003	mean (range)	M/M THR
Vendittoli et al., 2007	Follow-up	3 (m) 6 (m) 12 (m) 24 (m)	64		0.90±0.42 0.80±0.32 0.67±0.35 0.59±0.26		mean ± std dev	M/M hip resurfacing arthroplasty
Grubl et al., 2007	Follow-up	10 (y)	22	0.75 (0.3- 50)			median (range)	M/M THR
Luetzner et al., 2007		75 (m)	41	4.28		P<0.001	median	bilateral total knee arthroplasty
De Haan et al., 2007	Case report	4 (y)	1	1.45			mean	M/M hip resurfacing arthroplasty
Antoniou et al., 2008		6(m) 12(m)	70		2.3 2.4	P<0.001 P<0.001	mean	M/M hip resurfacing arthroplasty
Sarmiento-Gonzalez et al., 2008	Follow-up	8 <5 (y) >5 (y)	11		0.224 ±0.013 0.497±0.145116	No sign	mean ±std dev	

Heisel et al., 2008		6 (m)	15	2.45		median	M/M hip resurfacing arthoplasty
Walter et al., 2008		5-59 (m)	29	1.37	1.16	mean	M/M hip resurfacing arthoplasty
Oldenburg et al., 2009	Case report	3 (m) after revision	1		625		THA
Rizzetti et al., 2009	Case report		1	260	549		M/M THR
Isaac et al., 2009	Follow-up	24 (m)	77		1.49	median	Unilateral resurfacing prosthesis
Tower 2010	Case report	36(m)   2(m)	2	122	23		M/M hip resurfacing arthoplasty
Ikeda et al., 2010	Case report		1		>400		M/M THR
von Schewelov et al., 2010	Case report	4 (y)	1		92 (74-110)	(95% CI)	M/M hip resurfacing arthoplasty

**Tabella 4:** Concentrazione di cobalto ( $\mu\text{g/l}$ ) in siero e/o sangue di pazienti con impianti protesici. D: giorni; M: mesi; W: settimane; Y: anni; SD: deviazione standard; No sign: non rilevante; Control group: soggetti non esposti a cobalto. M/M THR: riposizione totale di protesi d'anca.

Dopo questo periodo si verifica una condizione di equilibrio, in cui la concentrazioni ionica è costante fino a che la protesi non inizia a perdere la sua integrità e quindi i valori degli ioni si innalzano nuovamente (Maezawa et al., 2002, Lhotka et al., 2003).

I detriti da usura si accumulano nei tessuti periprotetici causando reazioni infiammatorie croniche, alterazioni della risposta immunitaria, tumori e linfadenopatia regionale (Basle et al., 1996).

Le differenze nella grandezza dei detriti giocano un ruolo importante nella localizzazione della stessa reazione. La maggior parte delle particelle è abbastanza piccola (1-4  $\mu\text{m}$ ) da poter essere inglobata dai singoli istiociti, quindi senza stimolare una reazione granulomatosa da corpo estraneo (Archibeck et al., 2000). L'elevato accumulo di detriti può portare a fibrosi, granulomatosi, riassorbimento osseo, necrosi ossea e per ultimo ad un distacco asettico della protesi.

L'ipersensibilità ai metalli si riscontra nel 10-15% della popolazione, ma nei soggetti con protesi d'anca l'incidenza raddoppia (Hallab et al., 2000).

## 6. PRESENTAZIONE DEL CASO

Nel settembre 2007, una donna di 58 anni venne ricoverata presso la Clinica di Neurologia dell'Università di Brescia, per la valutazione di *ipovisus* e ipoacusia; la paziente lamentava i sintomi dal luglio dello stesso anno; in anamnesi erano presenti: diabete mellito e ipertensione arteriosa con retinopatia. La paziente era stata sottoposta nel 2001 ad un intervento di posizionamento di artroprotesi di anca sinistra, revisionata poi nell'Ottobre 2006 a causa della rottura della testa protesica di ceramica; tre settimane prima dell'ammissione si era verificata una condizione di lieve ipotiroidismo, curata con L-tiroxina.

Al momento del ricovero nel 2007, si erano rilevati deficit bilaterale dei nervi cranici II e VIII e lievi disturbi sensitivo-motori agli arti. Alle indagini laboratoristiche, per l'identificazione di eventuali patologie infettive, neoplastiche, metaboliche e immunologiche, non erano stati riscontrati risultati rilevanti; si era quindi posta in diagnosi differenziale una multineuropatia assonale periferica.

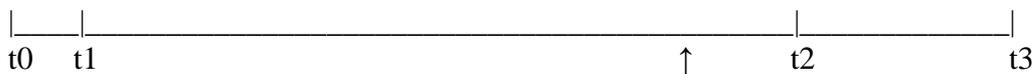
Dopo 3 mesi, la paziente viene nuovamente ricoverata perché completamente cieca, gravemente ipoacusica e confinata su sedia a rotelle a causa di ipostenia degli arti inferiori. Di nuovo fu sottoposta a esami di laboratorio, da cui emersero valori 100 volte superiori a quelli di riferimento (Co ematico 549 µg/l –plasmatico 260 µg/l - Cr ematico 54 µg/l- plasmatici 210 µg/l) di cobalto e cromo in plasma, urine e liquor.

Analizzando i dati sulla metallemia, e prendendo in considerazione la storia ortopedica della paziente, venne ipotizzata un'intossicazione da cobalto-cromo causata dai detriti derivati dalla corrosione della protesi. Furono quindi eseguiti diversi trattamenti chelanti con EDTA, che tuttavia non portarono a miglioramenti clinici benché le concentrazioni dei due elementi fossero molto diminuite (Graf. 1 e 3).

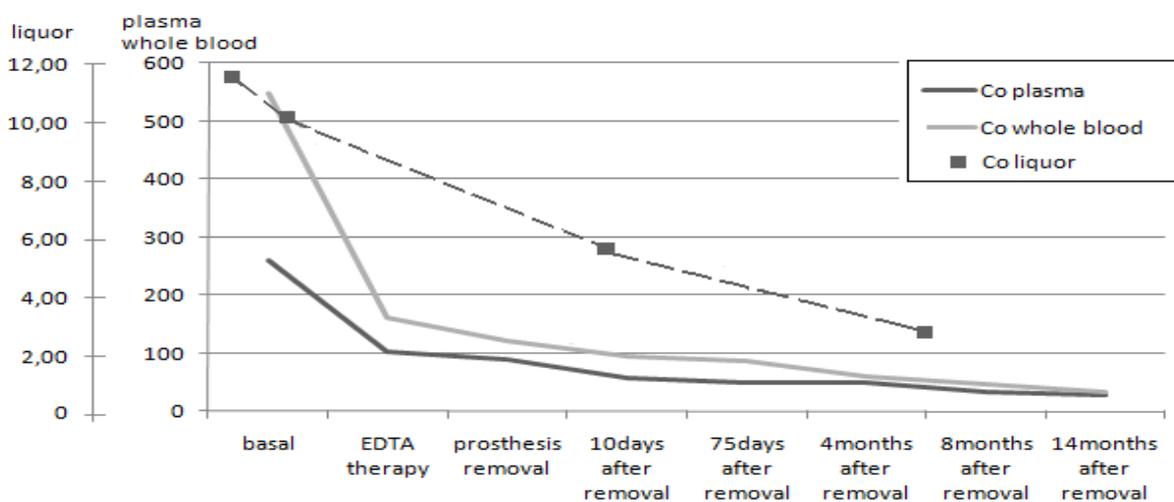
Nell'Aprile 2008 è stata rimossa la protesi e durante l'intervento è stata evidenziata una severa metallosi periprotetica (Fig. 1), dato confermato anche dall'esame istologico.



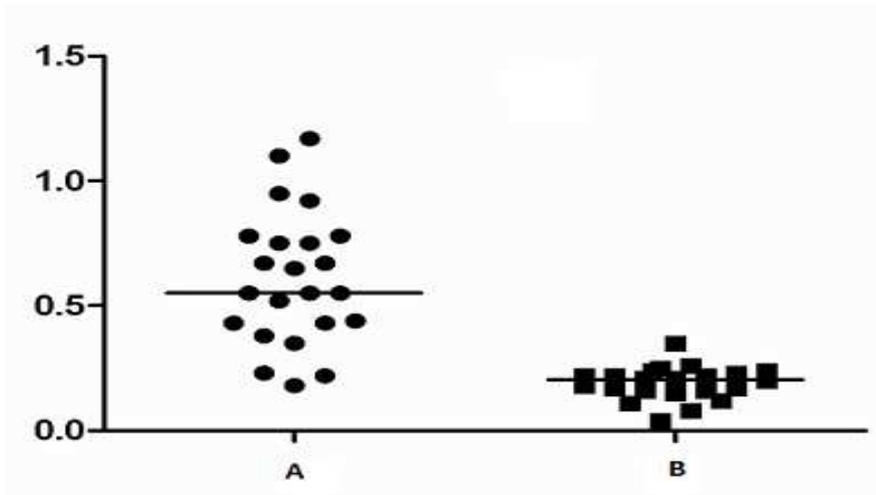
**Figura 1:** *Reperito intraoperatorio di severa metallosi periprotetica rinvenuto durante la seconda revisione chirurgica, eseguita per rimuovere la protesi.*



- t0** = rottura della testa in ceramica settembre 2006
- t1** = prima revisione chirurgica ottobre 2006 e sostituzione
- ↑ = diagnosi di neuropatia da intossicazione da metalli dicembre 2007
- t2** = seconda revisione e rimozione completa dell'impianto aprile 2008
- t3** = ultimo controllo giugno 2008



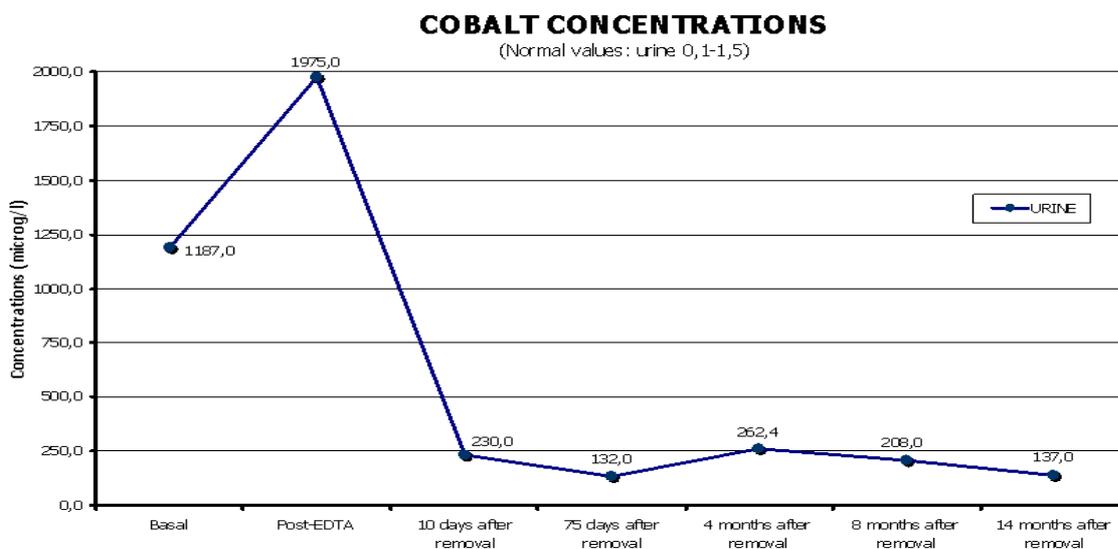
**Grafico 1:** *Concentrazioni di cobalto in sangue intero, plasma e liquor della paziente.*



**Grafico 2:** IMA della paziente(A) e dei controlli (B). —:media

Nel periodo successivo alla rimozione, i valori del cobalto sono rimasti elevati per lungo tempo, ma la paziente ha mostrato un progressivo miglioramento delle sue condizioni cliniche.

Nella paziente la misurazione dell'IMA (Graf. 2) ha riportato un valore medio di 1,73 ABSU (Absorbance Units) (1,02-2,52); la letteratura stabilisce che valori superiori a 0,4 sono da attribuirsi ad un'alterazione dell'albumina (Turedi et al., 2009), quindi si può affermare che la paziente presentava valori di IMA elevati, che indicano una frazione di Co legata alle proteine plasmatiche inferiore a quella presente nel sangue intero.



**Grafico 3:** Concentrazione urinaria di cobalto nella paziente.

A differenza dei casi di intossicazione esogena da cobalto, il caso esaminato riportava soprattutto un coinvolgimento del sistema nervoso, in particolare dei nervi periferici, ottici ed acustici e risultava dunque ideale come modello per riprodurre sperimentalmente i sintomi tipici di intossicazione da Co e chiarirne il meccanismo patogenetico.

## **PARTE SPERIMENTALE**

### **SCOPO DEL LAVORO**

Scopo di questa ricerca è stato quello di riprodurre nel coniglio gli effetti neurologici causati da un'intossicazione cronica da cobalto. Tali effetti sono già stati osservati nell'uomo, in soggetti con impianto di artroprotesi d'anca in lega Co-Cr-Mo, in seguito all'azione di detriti derivanti dalla corrosione della stessa artroprotesi. Lo studio si è reso necessario in quanto, nonostante fosse noto da tempo come l'esposizione al cobalto possa determinare effetti biologici avversi, la rilevanza clinica è risultata piuttosto controversa, dato che il ruolo del cobalto o delle leghe cromo-cobalto, su tessuti ed organi umani, non è ancora stata completamente chiarita.

La scelta del coniglio come modello animale per la sperimentazione trova le sue basi nelle osservazioni di Berry e Easty (1993), che lo considerano come specie d'elezione per studi di tossicità oculare. Su questa scelta ha influito anche la necessità di effettuare prelievi ematici frequenti, manualità che si presenta più complessa in altre specie animali da sperimentazione, quali topo e ratto, sia per le loro dimensioni che per il loro esiguo volume ematico. L'utilizzo della via endovenosa come via di somministrazione ha permesso di avere una completa biodisponibilità del metallo, riproducendo così il più possibile la metallemia osservata nei pazienti con artroprotesi.

La sperimentazione è stata effettuata in collaborazione con l'Università degli Studi di Brescia-Laboratorio di Tossicologia e Igiene e Prevenzione Occupazionale e con il Servizio di Medicina Interna del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie.

## 7. MATERIALI E METODI

### 7.1. Fase “in vivo”

La sperimentazione “in vivo” è stata condotta su conigli New Zealand White di entrambi i sessi di circa 4 kg di peso corporeo (Martini S.P.A., Budrio di Longiano-FC), che sono stati trattati con elevate dosi di cobalto e cromo per un tempo utile a mimare un rilascio cronico da una sorgente interna, quale una protesi usurata.

Gli esperimenti sono stati condotti secondo un protocollo sperimentale approvato dal Comitato Etico dell’*Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna e dal Ministero della Salute, in accordo con la normativa sulla sperimentazione animale (Decreto legislativo 116/92 che recepisce la Direttiva EC 609/86). I conigli sono stati alimentati con fieno polifito e mangime pellet “Nutri Rabbit adulti” i cui ingredienti erano: miscela di foraggi selezionati ed essiccati, prodotti e sottoprodotti di cereali in grani, prodotti e sottoprodotti di semi oleosi (da semi di soia geneticamente modificati), cereali in grani, prodotti e sottoprodotti della fabbricazione dello zucchero, minerali, DL-metionina, L-lisina. L’integrazione per kg di mangime era: Vit A, Vit D3, Vit E, Vit B1, Vit B2, Vit B6, Vit B12, Vit PP, acido D-pantotenico, acido folico, DL-metionina, ferro 40 mg, iodio 0,45 mg, selenio 0,24 mg, manganese 72 mg, rame 14,50 mg, zinco 72 mg, cobalto 0,88 mg, lisina 600 mg.

L’acqua è stata fornita *ad libitum*. Il mangime è stato testato dal fornitore per assicurare che non vi fossero contaminazioni chimiche e microbiche, la purezza dell’acqua è stata assicurata dalle autorità municipali locali.

Gli animali sono stati posti in gabbie individuali con la possibilità di mutuo contatto visivo, con un fotoperiodo di 12/12 ore di luce-buio e temperatura costante impostata a  $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ .

Per riprodurre fedelmente il rapporto volume ematico/Co osservato nella paziente, descritta da Rizzetti et al. (2009), la forma chimica migliore di cobalto da somministrare agli animali sarebbe stata il Co ossido (CoO), la specie reattiva che si forma sulle superfici delle protesi e che passa in circolo in seguito a deterioramento. Il CoO è tuttavia insolubile in acqua, e solubile solo in ambiente fortemente acido. Ne risultava quindi impossibile la somministrazione parenterale, anche quella endovenosa. La scelta

è dunque ricaduta su cobalto cloruro ( $\text{CoCl}_2$ ) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), la cui soluzione iniettabile è stata preparata solubilizzando la polvere in soluzione fisiologica.

I sali di cobalto(II) cloruro e cromo(III) cloruro (Sigma Aldrich, Milano) corrispondenti alle quantità prescelte per il trattamento degli animali, sono stati disciolti in 1 mL di soluzione fisiologica e sono stati somministrati quotidianamente, singolarmente ed in associazione, mediante infusione intravenosa lenta, nella vena marginale dell'orecchio (Fig. 2).

Le dosi sono state calcolate in base al peso corporeo dell'animale, riproducendo il livello ematico dei due metalli riscontrato nella paziente descritta da Rizzetti et al. (2009) (vedi i paragrafi 7.1.1.-7.1.3 delle prove sperimentali). Nella definizione dei dosaggi si è comunque tenuto conto della DL100 del cobalto cloruro nel coniglio, che per via endovenosa è pari a 20 mg/kg (Venugopal e Luckey, 1978). La concentrazione effettiva di entrambi gli ioni metallici nelle soluzioni iniettate, è stata controllata mediante spettroscopia di massa (ICP-MS).



**Figura 2:** Somministrazione intravenosa di Cobalto e/o Cromo cloruro nella vena marginale dell'orecchio. Particolare dell'anatomia topografica di arteria centrale e vena marginale dell'orecchio.

Lo stato generale di salute degli animali è stato osservato giornalmente in base a: insorgenza di eventuali stereotipie, vitalità degli animali, consumo di cibo ed acqua e consistenza e volume degli *escreta*. Anche la tollerabilità locale al prodotto nel punto d'inoculo è stata valutata considerando l'eventuale insorgenza di dolorabilità, comparsa di indurimenti o essudati.

All'ammissione degli animali alle prove ed il giorno precedente al sacrificio, tutti gli animali sono stati sottoposti a visita neurologica, condotta in collaborazione con la Sezione di Medicina Interna dell'ex Dipartimento Clinico, per verificare deficit neurologici precedenti alla sperimentazione o indotti dalla stessa.

La visita neurologica comprendeva test per verificare:

*Osservazioni generali:*

-Stato mentale: permettere al coniglio di muoversi nell'ambiente liberamente dove verrà esaminato, prendendo nota dei suoi atteggiamenti.

-Postura: osservare il coniglio mentre cammina.

-Andatura: un pavimento non scivoloso è l'ideale per permettere un'adeguata valutazione dell'andatura.

-Reazioni posturali: ogni arto del soggetto viene girato, con il dorso verso il pavimento, mentre viene sorretto dal torace: si valuta il ritorno alla posizione fisiologica. Pochi animali risultano recettivi a questa prova, se non in condizioni di perfetto relax, perciò occorre valutare attentamente i risultati.

-Passo della carriola: il coniglio è tenuto dall'addome, e cammina solo utilizzando gli arti posteriori. La stessa prova viene effettuata anche chiudendo gli occhi al coniglio.

-Saltellamento: la posizione è la stessa della prova precedente, ma con un arto anteriore alzato, permettendo all'animale di appoggiarsi solo sul controlaterale. --Movimento in laterale: si costringe l'animale a muoversi in laterale, prima sugli arti anteriori, poi su entrambi gli arti posteriori.

*Riflessi spinali:*

-Riflesso patellare: con l'animale su un fianco viene sostenuto l'arto più in alto, stimolando con un martelletto il riflesso patellare.

-Riflesso tricipite: nella stessa posizione su un fianco viene stimolato il tendine di inserzione del tricipite.

-Riflesso flessorio: stimolando i nocicettori a livello interfalangeo, l'animale ritira l'arto.

*Nervi cranici:*

-Nervo ottico: risposta alla minaccia. Contrariamente a quanto ci si aspetterebbe, molti conigli per la loro natura, non rispondono a questa prova.

-Nervi III-VI: osservando gli occhi con la testa ferma, si muove successivamente la testa dell'animale da lato a lato, e poi dall'alto in basso, per valutare il nistagmo fisiologico.

-Nervo V: inserendo una siringa di piccole dimensioni dietro agli incisivi si valuta il tono della mandibola (Vernau et al., 2007).

### **7.1.1. Prima prova preliminare**

Questa prova è stata condotta con il solo Cobalto, su due conigli e per un tempo breve, ritenendola del tutto preliminare. Si è resa comunque necessaria poiché in letteratura non ci sono prove sperimentali analoghe.

Lo scopo è stato quello di verificare che la dose considerata (1354 µg/animale) e somministrata agli animali fosse relativamente tollerabile, e, nello stesso tempo, utile a determinare l'insorgenza dei sintomi neurologici.

Pertanto, la dose è stata somministrata quotidianamente per quattro giorni e sono stati eseguiti 2 prelievi di sangue ai giorni 1 e 4.

Al termine della prova, durata 7 giorni, agli animali trattati è stata indotta anestesia profonda (Pentothal Sodium 15% 12-24 mg/kg p.v.) ed eutanasia mediante somministrazione intracardiaca di una dose letale di Tanax® (0,5-3 ml/animale).

Per eseguire i prelievi di sangue, gli animali sono stati contenuti mediante blanda sedazione con acetilpromazina maleato somministrata per via intramuscolare (Prequilan® 0.05-0.1 ml/kg, equivalente a 0.5-1 mg of acetilpromazina per kg p.v.); l'acetilpromazina si è dimostrata utile anche come blando vasodilatatore. Dall'arteria centrale dell'orecchio sono stati prelevati 4 mL di sangue, stoccati in due provette (Sarstedt Monovette®) con granuli di anticoagulante (Li-eparina), 2 mL per la ricerca dei metalli nel sangue intero e 2 mL per ottenere il plasma mediante centrifugazione a 3000 RPM per 10 minuti.

Trascorso il periodo sperimentale considerato, gli animali sono stati sacrificati e da ciascun animale sono stati prelevati encefalo, polmone, cuore, nervi ottici, fegato, tessuto adiposo, pancreas, muscolo, rene e, da uno dei due occhi, i fluidi oculari. Sugli organi prelevati, analogamente al sangue ed al plasma, è stata valutata la concentrazione di cobalto. Porzioni degli stessi organi, così come del nervo sciatico e l'altro occhio,

sono stati fissati in formalina per l'analisi istologica. Infine aliquote di muscolo, nervi sciatico ed ottico sono stati congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$  e destinati alla microscopia elettronica.

### *7.1.2. Seconda prova preliminare*

Tre conigli sono stati sottoposti alla somministrazione endovenosa di cobalto cloruro, alla medesima dose e per lo stesso tempo (quattro giorni) della prima prova sperimentale (1354  $\mu\text{g}/\text{animale}$ ). Sono stati effettuati 5 prelievi di sangue, i primi 4 contemporaneamente ai quattro giorni di somministrazione e l'ultimo 3 giorni dopo l'ultima somministrazione. Gli animali sono stati tenuti sotto osservazione per 1 mese per verificare se il cobalto, depositato nei tessuti, potesse venire rilasciato nel tempo, determinando l'esacerbazione di effetti neurologici tardivi. Data l'assenza di qualunque sintomo, non si è ritenuto necessario il sacrificio dei due conigli.

### *7.1.3. Terza prova sperimentale*

Ventuno conigli sono stati casualmente assegnati a 5 gruppi sperimentali (Tab. 5).

Il gruppo A è stato trattato con cloruro di cobalto per 18 giorni consecutivi; al gruppo B è stata somministrata la miscela cobalto cloruro e cromo cloruro sempre per 18 giorni; infine, al gruppo C è stato somministrato solo cromo cloruro per lo stesso periodo di tempo. Il gruppo D ha ricevuto dosi crescenti di cobalto cloruro, con una dose iniziale mantenuta per 42 giorni, quindi raddoppiata e mantenuta per altri 53 giorni. Il gruppo E, non esposto ad alcun trattamento, è stato utilizzato come gruppo di controllo.

	<b>Animali</b>	<b>CoCl<sub>2</sub></b>	<b>CrCl<sub>3</sub></b>	<b>Durata</b>
<b>A</b>	4	1354	-	18
<b>B</b>	4	1354	820	18
<b>C</b>	4	-	820	18
<b>D</b>	7	1354	-	42
		2708	-	53
<b>E</b>	2	controllo		

**Tabella 5:** *Dosi di Co e Cr ( $\mu\text{g}$ ) somministrati e durata del trattamento.*

Campioni di sangue sono stati raccolti regolarmente a giorni alterni per le prime due settimane, poi settimanalmente sino alla fine della prova sperimentale.

Aliquote di sangue sono state utilizzate per preparare il plasma; entrambe le matrici sono state conservate a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento delle analisi.

Dopo il sacrificio degli animali, avvenuto con le stesse modalità delle due prove preliminari, sono stati prelevati campioni di tessuto (encefalo, cuore, fegato, polmone, pancreas, muscolo, e rene) destinati alle analisi per la quantificazione dei due metalli, così come umor acqueo ed umor vitreo sono stati raccolti con ago 27G da un occhio di ciascun animale e conservati a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Porzioni degli stessi campioni, l'altro occhio, aliquote di nervo ottico e sciatico e bolla timpanica sono stati fissati in formalina per l'analisi istologica. Altre aliquote del nervo ottico e nervo sciatico sono state destinate alla microscopia elettronica e conservate a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

## 7.2. Analisi di Cobalto e Cromo

Cobalto e cromo sono stati misurati in sangue intero, plasma, fluidi oculari e in tutti i tessuti, con l'ausilio della spettrometria di massa accoppiata induttivamente al plasma (ICP-MS) utilizzando lo strumento ELAN DRCII Perkin Elmer ICP-MS (ELAN DRC II, Perkin Elmer, Waltham, USA) equipaggiato con cella di reazione dinamica (DRC). Il sangue ed il plasma sono stati diluiti con Triton X-100 in soluzione acquosa allo 0.05 %. I campioni di tessuto, dopo stoccaggio a  $-40^{\circ}\text{C}$ , sono stati essiccati in forno a  $70^{\circ}\text{C}$

per un'ora, lasciati raffreddare a temperatura ambiente in essiccatoio ed infine pesati. I campioni sono stati poi digeriti in HNO<sub>3</sub> (ACS reagent, Sigma) 70% (v/v) per 12 ore a temperatura ambiente.

Gli standard di calibrazione sono stati preparati mediante diluizioni di soluzioni standard di entrambi gli elementi, in un intervallo compreso tra 0.5 µg/l e 1000 µg/l (cobalto in HNO<sub>3</sub> 2% soluzione standard mono elementare; Carlo Erba Reagenti, Milano, Italy; cromo in HCl soluzione standard per assorbimento atomico; Sigma-Aldrich, Milwaukee, USA).

I limiti di detenzione (LOD), calcolati come tre deviazioni standard del rumore di fondo del segnale ottenuto su dieci campioni "ciechi" sono stati: Cr: 0.05 µg/l in plasma e sangue, 0.002 µg/g nei tessuti; Co: 0.05 µg/l nel plasma, 0.1 µg/l nel sangue e 0.003 µg/g nei tessuti.

L'accuratezza del metodo è stata determinata in acqua naturale e fegato bovino come materiali di riferimento standard (NIST 1640 e MS1577b rispettivamente, National Institute of Standard and Technology, Gaithersburg, MD) e materiali di riferimento certificati per differenti matrici 1A/B (campioni di sangue) e 11A/B (plasma) tutti provenienti da German Society of Occupational and Environmental Medicine (Erlangen, Germany).

### **7.3. Indagine istologica**

Gli esami istologici sono stati condotti solo nella prima e nella terza prova sperimentale sulle matrici precedentemente elencate. Nella terza prova, inoltre, l'insorgenza di sintomi neurologici, ci ha indotti ad indagare eventuali effetti dannosi del Co, prelevando oltre agli organi già elencati, anche occhio e bolla timpanica. Campioni di tessuto (occhio, cuore, fegato, pancreas, midollo spinale, polmone, encefalo, muscolo, rene) sono stati fissati in una soluzione tamponata di formalina 10 %, prima di essere inclusi in paraffina e poi tagliati al microtomo in sezioni dello spessore di 2 µm. Le bolle timpaniche sono state decalcificate in una soluzione di acido nitrico 10 %; i tessuti sono stati poi deparaffinizzati mediante xylene, reidratati e colorati con EE o sottoposti ad immunocolorazione.

Le perossidasi endogene sono state bloccate con una soluzione allo 0.03 % di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in metanolo per 20 minuti prima del recupero, microonde-indotto, degli antigeni con incubazione, quando necessario, in 1 mM EDTA pH 8.0.

Le sezioni sono state poi incubate per un'ora con i seguenti anticorpi primari diluiti in Tris 1% BSA (Bovin Serum Albumin, Sigma Aldrich): topo anti-Neu-N (Millipore, Billerica, MA, USA), ratto anti-MBP (myelin basic protein) (Chemicon International, CA, USA), topo anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein) (Chemicon), topo anti-NF (Dako, Glostrup, Denmark). I segnali sono stati identificati con ChemMATE Envision Mouse (DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark) o con anticorpi secondari topo pre-assorbiti biotinilati anti ratto (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) seguiti da streptavidina HRP-coniugata (DAKO). Diaminobenzidina (Leica, Milano) è stata utilizzata come cromogeno ed ematossilina di Mayer come colorante di contrasto. Le immagini sono state acquisite con un microscopio Olympus Bx60 con una fotocamera Olympus DP70 ed elaborate con Cell<sup>F</sup> imaging software (Soft Imaging System GmbH). L'analisi semi-quantitativa della deplezione delle cellule gangliari nella retina è stata eseguita attribuendo i seguenti punteggi: 0=nessuna deplezione; 1=blanda deplezione; 2= moderata deplezione; 3=forte deplezione.

#### **7.4. Microscopia elettronica**

I nervi ottici e sciatici sono stati fissati in gluteraldeide tamponata con tampone fosfato al 2.5%, post fissati in tetrossido di osmio (OSO<sub>4</sub>) 1 % in tampone fosfato 0.1 M, disidratati in alcool ed inclusi in resina epossidica. Sezioni semi sottili (0.5 µm) sono state tagliate con un microtomo LKB SuperNova (Reichert-Jung, Vienna, Austria) e colorate con blu di toluidina 1%. Le immagini sono state acquisite con l'utilizzo di un microscopio Leica DMR. Sezioni ultrasottili (60 nm) sono state tagliate e raccolte su griglie 300 mesh, sono state colorate con uranile acetato 2% e con piombo di Sato. I campioni così trattati sono stati osservati al microscopio elettronico Hitachi H-300.

## 8. RISULTATI

### 8.1. Osservazioni cliniche

Durante tutte le procedure sperimentali i conigli hanno presentato un buono stato di salute generale. Data la natura di preda del coniglio, la tecnica difensiva dell'animale è quella del "freeze" (stare fermi immobili), soprattutto quando non siano abituati ad essere maneggiati (Harcourt-Brown, 2002). La manipolazione dei conigli è stata dunque molto delicata, non solo per evitare stress inutili, ma anche per minimizzare il rischio di danni alla colonna vertebrale, che è la struttura più vulnerabile, in questa specie, in caso di movimenti bruschi. Per effettuare l'esame neurologico, l'ideale è un luogo privo di distrazioni, senza alcuna somministrazione di tranquillanti o sedativi agli animali.

Nelle due prove preliminari (Prova 1 e 2) nessun coniglio ha mostrato sintomi clinici. L'assenza di sintomi specifici legati alla sola somministrazione di cobalto ci ha indotto a pensare che gli effetti neurologici potessero scaturire dall'azione sinergica di più metalli, costituenti della lega delle protesi. Si è quindi proceduto con la terza prova somministrando anche il Cromo.

Inoltre, poiché i 3 conigli della seconda prova preliminare non hanno presentato sintomi neurologici, non si è ritenuto utile sacrificarli.

Solo due soggetti della terza prova sperimentale hanno mostrato evidenza di chiari sintomi di tossicità. Dopo 13 giorni di esposizione al cobalto, un animale del gruppo A ha manifestato atteggiamenti particolari quali, rotazione della testa, comunemente denominato "Head Tilt", perdita di equilibrio risultante in un movimento in circolo (circling) ed il rotolamento (rolling) se posto su un fianco.



**Figura 3:** Rotazione della testa (*Head tilt*).

La stimolazione con una sorgente di luce diretta ha indotto una miosi fisiologica, in accordo con una probabile integrità delle vie nervose, proprie di vista e riflesso pupillare. Un secondo animale (gruppo D) ha mostrato gli stessi sintomi sopra descritti dopo soli 4 giorni di esposizione a cobalto.

## 8.2. Distribuzione degli ioni

### 8.2.1. Prima prova preliminare

I valori ematici e plasmatici di cobalto nei conigli A e B sono riportati in Tabella 6.

Giorni	Coniglio A		Coniglio B	
	Sangue	Plasma	Sangue	Plasma
1°	185.60	490.00	257.00	316.00
4°	490.00	872.00	573.00	885.00
<b>Sacrificio</b>	100.50	190.40	122.50	153.60

**Tabella 6:** Concentrazioni ematiche e plasmatiche di cobalto ( $\mu\text{g/l}$ ) nei conigli A e B della prima prova preliminare.

I risultati sulla distribuzione di Co in sangue e plasma si sono rivelati in accordo con quanto riportato in letteratura sul forte legame siero-proteico che s'instaura tra il Co e le albumine. Nondimeno i dati, seppure su due soli animali, mostra l'elevata variabilità interindividuale. Stessa cosa si è notata a livello tissutale, infatti come si può osservare in Tabella 7, in tutte le matrici il cobalto è risultato in concentrazioni diverse nei due animali trattati. L'umor acqueo ha presentato le maggiori concentrazioni in entrambi i conigli; tuttavia, valutando gli incrementi nei tessuti dei trattati rispetto al controllo, si può notare che è a livello encefalico che la concentrazione di cobalto mostra il maggiore aumento (22 volte in A e 8 volte in B, rispetto al bianco).

	<b>Coniglio A</b>	<b>Coniglio B</b>	<b>Bk</b>
Encefalo	0.11	0.04	0.005
Polmone	0.57	0.32	0.066
Cuore	0.13	0.28	0.14
Fegato	0.76	0.56	0.17
T. adiposo	0.008	0.006	n.d.*
Pancreas	0.22	0.33	0.079
Muscolo	0.041	0.06	0.024
Rene	1.01	0.74	0.41
Umor A	2.06	3.00	0.60
Umor V	1.10	0.76	0.20

\*non rilevabile

**Tabella 7:** Concentrazioni tessutali ( $\mu\text{g/g}$ ) e negli umor acqueo e vitreo ( $\mu\text{g/l}$ ) di cobalto nei conigli A, B e nel coniglio di controllo (BK).

### 8.2.2. Seconda prova preliminare

Le concentrazioni di cobalto nel sangue e nel plasma hanno confermato la differente distribuzione dell'elemento (Tab. 8) osservata, nella prima prova preliminare. E' sempre maggiormente presente nel plasma, confermando la sua maggiore affinità per i componenti plasmatici. Il cobalto infatti si lega all'albumina e, in minima parte, anche a transferrina (Sun et al., 1999; Qian et al., 2002) e ferritina (Torti e Torti 1994).

E' interessante notare come, nonostante gli elevati livelli di cobalto, nessuno dei soggetti ha mostrato sintomatologia. Dopo 3 giorni dalla sospensione del trattamento (ultimo prelievo, 7° giorno) i valori ematici sono diminuiti drasticamente in tutti i conigli. Questi dati avvalorano quelli presenti in letteratura, che descrivono una eliminazione urinaria del cobalto nel giro di pochi giorni (Apostoli et al., 1994).

	Coniglio 1		Coniglio 2		Coniglio 3	
	Sangue	Plasma	Sangue	Plasma	Sangue	Plasma
1°	219.3	349	262	456	169.6	265.6
2°	470	700	603.7	*	455.5	703.1
3°	568.4	951.8	591.7	1073.1	553.5	1022.9
4°	915.02	1679.2	747.2	1532.4	670.2	1406.9
7°	51.9	104.5	57	119.2	44.1	81.9

\* valore mancante per prelievo insufficiente.

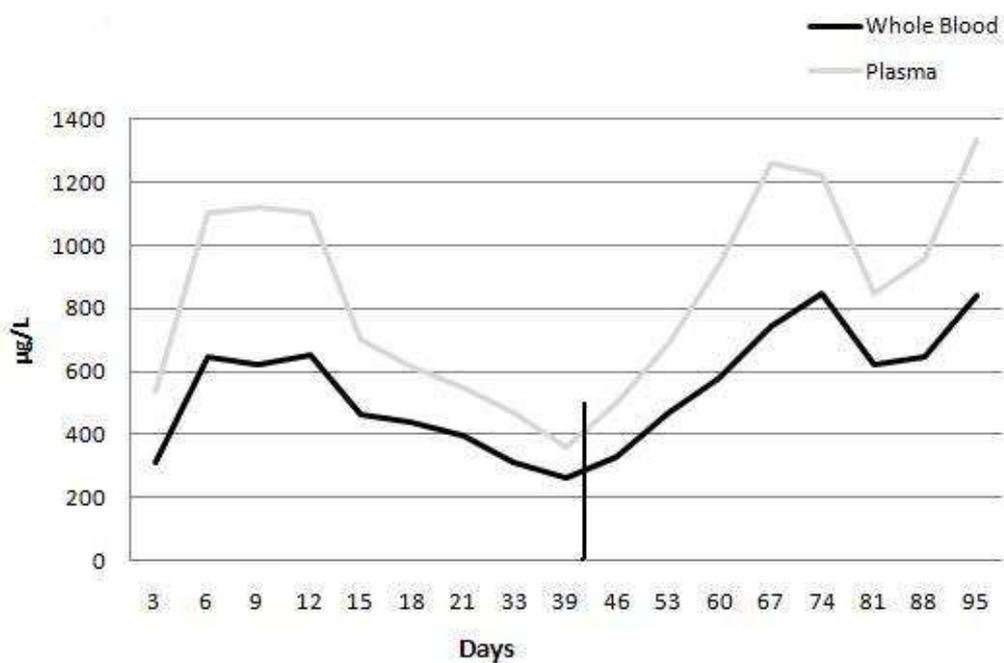
**Tabella 8:** Concentrazioni ematiche e plasmatiche ( $\mu\text{g/l}$ ) nei conigli 1, 2 e 3.

Sempre al 7° giorno va sottolineato come, in tutti gli animali, le concentrazioni ematiche siano sovrapponibili, benchè molto differenti nei prelievi precedenti; minore uniformità è stata riscontrata nel plasma.

### 8.2.3. Terza prova sperimentale

Come mostrato nel Grafico 4, dopo un incremento iniziale ed una breve fase stazionaria, i livelli di cobalto, sia nel sangue intero che nel plasma, sono decresciuti repentinamente, nonostante la somministrazione continuata. Lo stesso andamento è stato osservato dopo avere raddoppiato la dose (gruppo D).

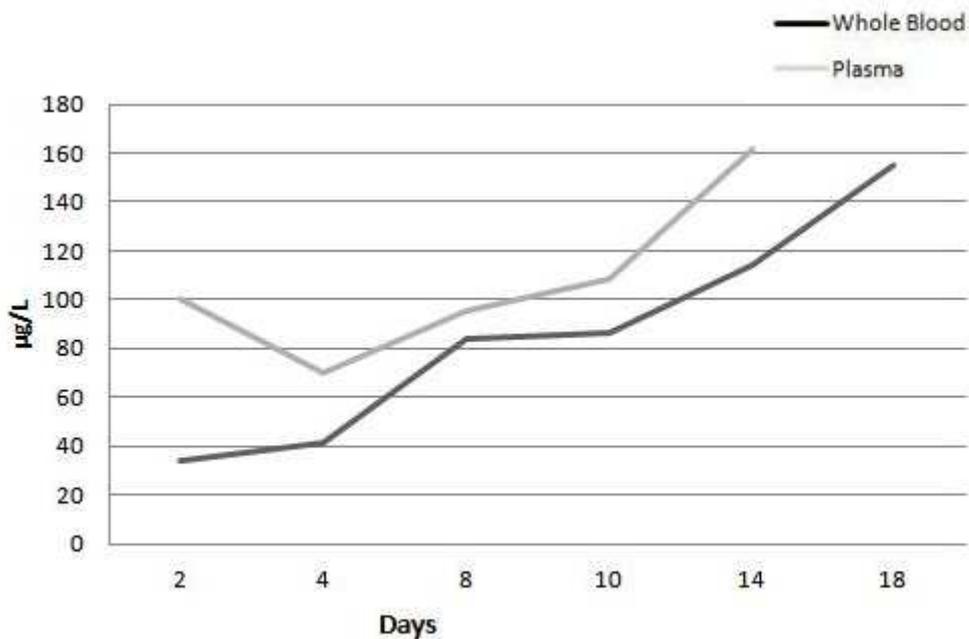
Per quanto riguarda il Cr, invece, limitatamente al periodo di somministrazione di 18 giorni, l'andamento ematico si è mostrato in continua ascesa da come si può notare nel Grafico 5, ciò significa una sempre maggiore concentrazione sia nel sangue che nel plasma.



**Grafico 4:** Andamento del profilo ematico di Co in sangue intero e plasma di coniglio (gruppo D).

	Cobalto			
	Controllo	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo D
Encefalo	0.002	0.24±0.23	0.15±0.63	0.57±0.21
Cuore	0.12	0.75±0.46	0.57±0.21	4.00±1.83
Fegato	0.14	1.15±0.61	0.81±0.52	5.16±1.69
Polmone	0.03	0.91±0.46	0.29±0.12	1.2±0.9
Pancreas	0.08	0.61±0.76	0.14±0.20	1.4±0.8
Muscolo	0.02	0.10±0.05	0.12±0.11	1.5±0,6
Rene	0.53	2.49±1.43	1.66±1.22	9.77±3.60
Umor A	0.61	1.81±2.42	1.11±0.92	7.01±1.82
Umor V	0.22	2.67±1.18	0.86±0.50	3.64±0.72
Sangue	13.21	420.94±154.49	449.21±87.13	781.14±146.89
Plasma	20.20	441.43±198.77	444.60±87.13	1233.86±306.42

**Tabella 9:** Concentrazioni finali ( $\pm DS$ ) di Co nei tessuti ( $\mu\text{g/g}$ ) e nei fluidi biologici ( $\mu\text{g/l}$ ).



**Grafico 5:** Andamento del profilo ematico di Cr (gruppo C).

#### Cromo

	Controllo	Gruppo B	Gruppo C
Encefalo	<0.002	<0.002	<0.002
Cuore	<0.002	0.42±0.01	0.43±0.01
Fegato	<0.002	14.96±2.40	11.65±1.94
Polmone	<0.002	2.06±1.90	0.25±0.50
Pancreas	<0.002	0.10±0.24	0.41±0.20
Muscolo	0.01	0.11±0,04	0.82±0.43
Rene	0.13	3.99±1.14	5.64±1.56
Umor A	0.28	1.25±0.72	2.3±0.6
Umor V	0.25	1.20±0.70	1.1±0.8
Sangue	2.6	77.43±27.04	187.60±76.23
Plasma	7.1	131.55±16.80	191.58±42.56

**Tabella 10:** Concentrazioni finali ( $\pm$ DS) di Co e Cr nei tessuti ( $\mu$ g/g) e nei fluidi biologici ( $\mu$ g/l).

Le concentrazioni finali di cobalto nel sangue intero e nel plasma erano analoghe nei gruppi A e B, mentre i livelli di cromo erano più elevati nei conigli trattati con solo cromo, rispetto a quelli trattati con cromo e cobalto (Tab. 10).

È stato ipotizzato che la co-esposizione ai due elementi metallici abbia influenzato la distribuzione del cromo e non del cobalto. Infatti questo differente andamento non è stato osservato nei tessuti, dove invece il cromo ha mostrato una grande variabilità. Una concentrazione relativamente bassa di ioni Co è stata rilevata anche negli animali di controllo, determinata, probabilmente, dall'integrazione di cobalto nel mangime.

Al termine del trattamento, il cobalto è stato rinvenuto in tutti i tessuti campionati; gli organi con i residui più elevati, specialmente nel gruppo D, sono stati rene, fegato e cuore.

La concentrazione di cromo è risultata inferiore al limite di rivelazione (LOD) nell'encefalo in tutti gli animali (Tab. 10); al contrario, il cobalto si è accumulato nell'encefalo in maniera dose-dipendente. Sia il cromo che il cobalto sono stati riscontrati nell'umor vitreo e nell'umor acqueo dei soggetti trattati dopo 18 giorni, sia cromo che cobalto (gruppi A, B, C) erano equamente distribuiti in entrambi i liquidi, mentre dopo 95 giorni (gruppo D) c'è stato un maggiore accumulo di cobalto nell'umor acqueo rispetto al vitreo.

I livelli di Co nel sangue intero dei due animali con evidenti sintomi neurologici, alla fine della sperimentazione sono risultati più alti rispetto a quelli degli altri animali dello stesso gruppo (A<sub>2</sub> 640 µg/l; D<sub>3</sub> 1025 µg/l), anche nei tessuti il quantitativo di Co è più elevato rispetto agli altri animali (encefalo A<sub>2</sub> 0.4, D<sub>3</sub> 0.8; fegato A<sub>2</sub> 0.4, D<sub>3</sub> 27.2; cuore A<sub>2</sub> 1.07, D<sub>3</sub> 6.9 µg/g; umore acqueo A<sub>2</sub> 3.5, D<sub>3</sub> 8.0, umore vitreo A<sub>2</sub> 3.2, D<sub>3</sub> 4.3 µg/l).

### **8.3. Valutazione istologica**

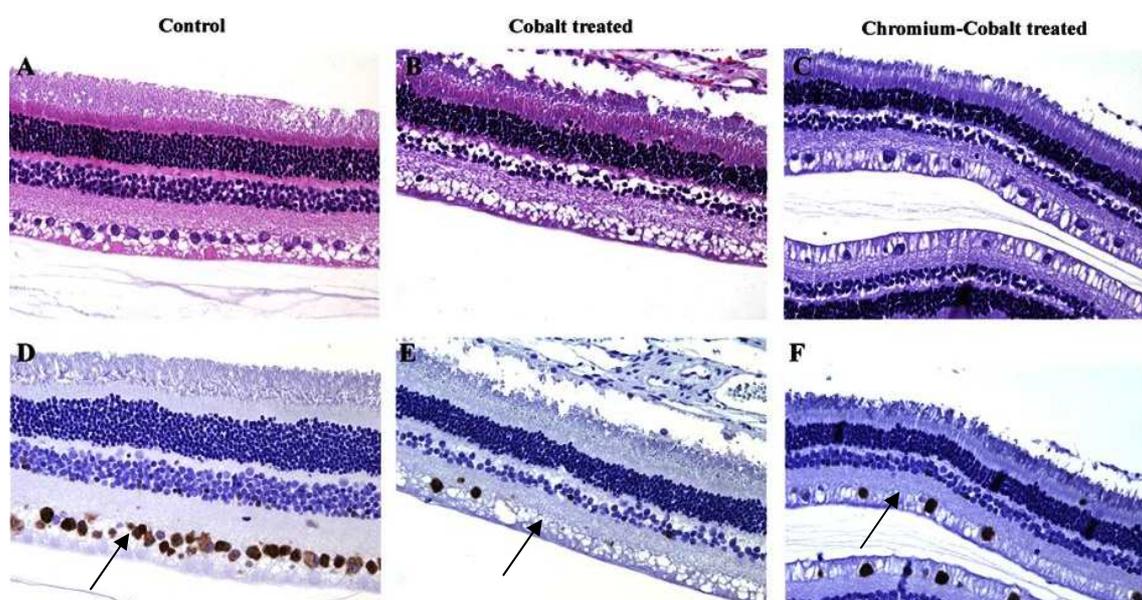
Nonostante l'elevata concentrazione di ioni Co nei tessuti degli animali trattati, nessuno dei campioni soggetti a valutazione istologica, sia della prima che della terza prova, ha mostrato alterazioni significative rispetto ai controlli, con l'eccezione di occhi e bolle timpaniche degli animali della terza prova, come descritto nei paragrafi seguenti.

### 8.3.1. Apparato visivo

All'analisi istologica, gli occhi dei conigli che hanno ricevuto solo cobalto (gruppi A e D) hanno manifestato una severa deplezione delle cellule gangliari della retina (punteggio medio  $2.4 \pm 0.6$ ), come sottolineato dall'immunocolorante NeuN, marcatore neuronale selettivo. Invece, nessuna alterazione è stata rinvenuta nei gruppi che hanno ricevuto solo cromo (gruppo C) e nei controlli (gruppo E).

Straordinariamente, nei due conigli che hanno presentato distinti sintomi clinici, le cellule gangliari erano essenzialmente assenti (Fig. 4). Interessante notare che negli animali trattati con cromo-cobalto (gruppo B) il numero di cellule mancanti era meno severo, con la conservazione del 60-70 % di cellule gangliari (Fig. 4C e F).

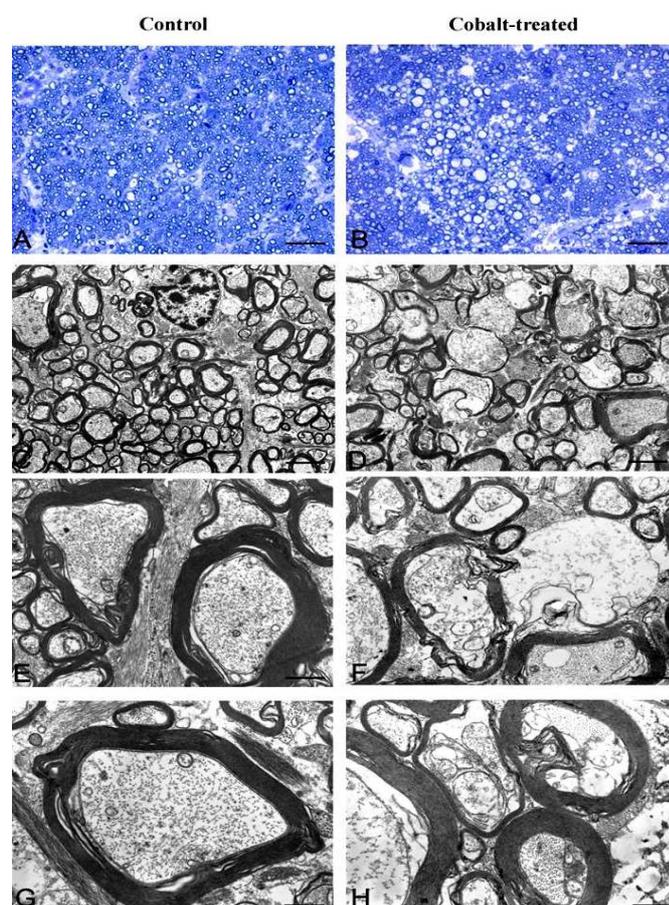
Dato che lo strato di cellule gangliari diviene più sottile durante lo sviluppo (Reichenbach et al., 1993), l'analisi istologica è stata condotta, per tutti i gruppi, nella stessa striscia visiva dove lo strato di cellule gangliari è considerata sicura.



**Figura 4:** Istologia della retina dei conigli. Confronto tra i controlli ( riquadri A, D), i trattati con Co (B, E) e quelli con Cr-Co (C, F). Colorazione EE (A, B, C) e NeuN (D, E, F).

La deplezione delle cellule gangliari è stata più importante nei conigli con elevati livelli di cobalto nel sangue e nei fluidi oculari e trattati per un tempo più lungo (gruppo D). Nessuna gliosi reattiva o danni mielinici maggiori sono stati riscontrati (GFAP and MBP immunostains). Tuttavia, sezioni semi-sottili, provenienti dalla porzione distale

del nervo ottico, di tutti i conigli esposti al cobalto, hanno mostrato diffuse aree di danno nervoso, con rigonfiamento assonale ed assottigliamento mielinico, con degenerazione degli assoni e distruzione del citoscheletro, come rinvenuto nelle analisi di microscopia elettronica (Fig. 5A e B). Negli assoni danneggiati erano inoltre presenti, caratteristiche di demielinizzazione con forte assottigliamento delle guaine mieliniche (Fig. 5G e H). È ancora importante notare che nessuna alterazione è stata rilevata nei conigli esposti solo al cromo (gruppo C) o nei controlli (gruppo E). L'insieme di questi dati suggerisce una tossicità selettiva per le cellule gangliari mediata solo da cobalto.



**Figura 5:** *Porzione distale del nervo ottico. Confronto tra controlli e trattati con Co. Si noti degenerazione con rigonfiamento degli assoni e assottigliamento della guaina mielinica. Microscopia elettronica colorazione con Blu di toluidina (A,B) e uranile acetato 2% - piombo di Sato (C,D,E,F,G,H).*

### *8.3.2. Nervi sciatici*

I campioni di muscolo e di nervi prelevati e conservati a -80° C nella prima prova preliminare sono risultati inutilizzabili a causa di artefatti da congelamento.

I campioni di nervi sciatici della prima prova, fissati in formalina, non hanno fornito alcun rilievo.

Anche nella terza prova sperimentale, non è stato riscontrato alcun cambiamento ultrastrutturale significativo nei nervi sciatici. Infatti sezioni trasversali semi-sottili e la microscopia elettronica eseguita su sezioni trasverse ultrasottili non hanno mostrato alcun cambiamento significativo tra i conigli esposti a Co rispetto a quelli di controllo.

### *8.3.3. Apparato uditivo e vestibolare*

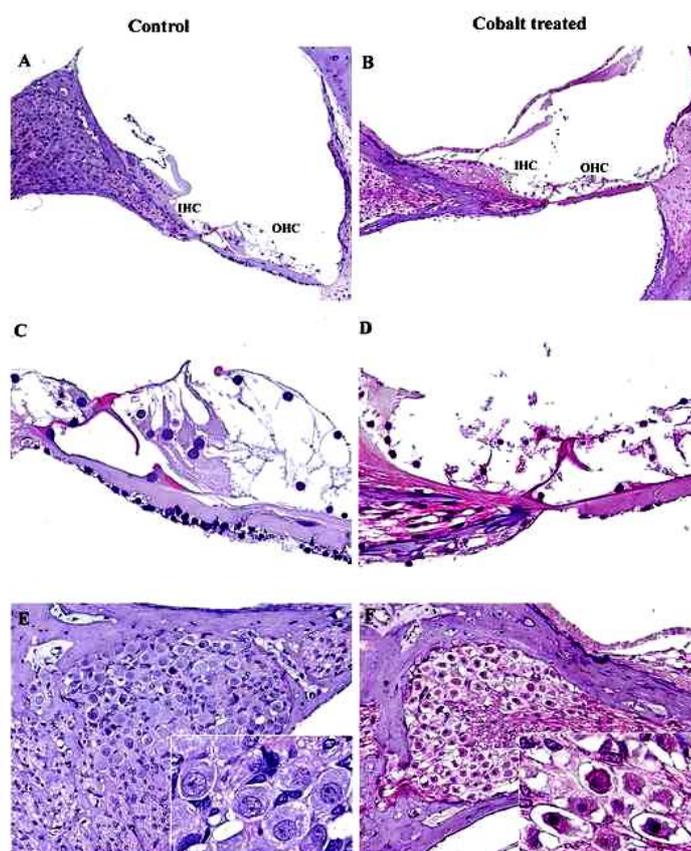
La perdita di udito e le vertigini sono due dei principali sintomi della tossicità del cobalto nell'uomo, dovuti probabilmente a neuropatia uditiva e vestibolare. Nel nostro modello sperimentale, nella terza prova, due animali trattati con Co hanno mostrato perdita di equilibrio, probabilmente dovuta alla tossicità del Co sull'apparato vestibolare. Test eseguiti per valutare la risposta a stimoli uditivi esterni non hanno dato alcuna informazione significativa, poiché gli animali erano in un continuo stato di difesa ed allerta che può falsare i risultati. Il controllo strumentale dell'udito non è stato condotto.

Si è dunque verificato se la somministrazione di cobalto possa accompagnare anche alterazioni morfologiche delle strutture vestibolo-cocleari. L'organo del Corti comprende tipicamente due tipi principali di cellule funzionalmente importanti, le cellule capellute interne (IHCs) e le cellule capellute esterne (OHCs), insieme a differenti tipi di cellule di supporto non sensitive e morfologicamente diverse (Fig. 6A, C).

L'analisi delle bolle timpaniche di tutti i conigli, inclusi i controlli, ha mostrato una evidente forma di otite esterna.

Analisi dettagliate della camera cocleare dei conigli che avevano ricevuto solo cobalto (gruppo D) hanno rivelato segni di degenerazione dell'organo di Corti, con perdita di entrambi i tipi di cellule sensitive capellute, anche se con una maggiore deplezione delle OHCs, come si può notare dalla comparazione con gli animali di controllo (Fig. 6A-D).

Nessun'altra alterazione è stata osservata in altri tipi di cellule della coclea, ad eccezione dei gangli spirali che hanno mostrato caratteristiche di degenerazione, con riduzione del numero di cellule gangliari, aumento dell'eosinofilia e nuclei picnotici (Fig. 6E e F).



**Figura 6:** Camera cocleare. Si noti deplezione delle cellule sensitive capellate interne ed esterne (A-D). Ganglio spirale. Cellule gangliari mostrano caratteristiche di degenerazione: grandezza inferiore e perdita di cellule gangliari; aumento dell'eosinofilia e nuclei picnotici (E,F). Colorazione EE.

Le analisi istologiche non hanno mostrato alcuna altra alterazione rispetto alle strutture vestibolari. Nell'insieme, i dati raccolti dall'apparato uditivo, in particolare dal sistema vestibolo-cocleare, suggeriscono una neuropatia uditiva mediata da cobalto.

## 9. DISCUSSIONE

Tutti gli animali trattati con cobalto hanno mostrato evidenze istologiche simili a carico degli apparati uditivo e visivo; l'importanza delle alterazioni è stata correlata al livello di cobalto e al tempo di esposizione ad esso, piuttosto che al cromo o all'associazione tra i due metalli.

La distribuzione ematica e tissutale di Co e di Cr è risultata in accordo con quanto osservato in altri studi, che a seguito di somministrazione intravenosa, descrivono una distribuzione di cobalto essenzialmente nel rene e nel fegato (Ayala-Fierro et al., 1999; Greenberg et al., 1943; Gregus and Klaassen, 1986; Patrick et al., 1989). I dati di questo studio mostrano inoltre, che il cobalto è presente anche nel cuore (gruppo D).

Relativamente al cromo sono stati osservati livelli decrescenti nei seguenti organi: fegato > rene > polmone > cuore > pancreas. La distribuzione di Cr appare in accordo con quanto riportato in letteratura. Infatti, in uno studio condotto su ratti trattati con cromato di sodio per iniezione endovenosa si è visto che la maggior parte del cromo si concentra nel sistema reticoloendoteliale, insieme al fegato, seguito poi dal rene (Visek et al., 1953; Tandon et al., 1979).

Per quanto riguarda i fluidi oculari, pochi sono gli Autori che hanno studiato in essi la composizione e la distribuzione di elementi metallici (Cruciani et al., 2004; Aydin et al., 2005; Erie et al., 2005; Panteli et al., 2009). La composizione chimica del corpo vitreo e dell'umor acqueo è strettamente correlata a quella del sangue. Le sostanze possono passare la barriera "acqueo-sangue" sia per diffusione, a seconda del gradiente di concentrazione tra i due lati della membrana, che per ultrafiltrazione, a seconda del gradiente di pressione, o ancora per un trasporto attivo o solubilità lipoidale. (Duke-Elder e Gloster, 1969).

La presenza di cobalto e cromo nei fluidi oculari dei conigli trattati dimostra che è avvenuto un passaggio attraverso la barriera acqueo-sangue, simile per i due elementi, anche se non è stato possibile determinarne il grado di distribuzione.

Durante la fase "in vivo" dello studio, i conigli hanno sempre presentato un buono stato di salute ed hanno continuato ad alimentarsi normalmente; dalla valutazione dei comportamenti e dei sintomi clinici sono risultate alterazioni presenti solo in due animali trattati con cobalto (animali del gruppo A e D) durante la terza prova.

Probabilmente negli altri conigli trattati, il grado dei danni, che pur si sono riscontrati a livello istologico, non è stato sufficiente a causare un cambiamento nella manifestazione del comportamento.

I sintomi presentati dai due animali, sono solitamente indicativi di un coinvolgimento patologico intracranico, tipico di una sindrome vestibolare (SV), o di una sindrome vestibolare paradossa (PVS).

Le alterazioni cliniche manifestate nei due conigli, se poste in diagnosi differenziale, potrebbero essere attribuite anche ad altre patologie; infatti, la causa più frequente di sindrome vestibolare nel coniglio, che include anche nistagmo e “head tilt” di grado variabile con perdita di equilibrio e rolling, sembra essere l’encephalitozoonosi (Künzel et al., 2008), ma anche neoplasie del sistema nervoso centrale, specialmente linfomi maligni, come pure infezione da *Pasteurella multocida* (Kpodékon, 1983).

L’otite batterica o pasteurellosi, come origine dell’head tilt, può essere esclusa dalla diagnosi differenziale, dato che non si sono rinvenuti altri sintomi tipici, come la presenza di essudato purulento all’interno del canale uditivo e sintomi respiratori. Infatti, la pasteurellosi nei conigli è associata a diversi processi morbosi, inclusi rinite, sinusite, congiuntivite, infezione del dotto naso-lacrimale, otite, tracheite, polmonite ed ascessi (dentali, dermici) (Quesenberry e Carpenter, 2004), che nella nostra prova non sono mai stati riscontrati.

L’insorgenza dei sintomi neurologici nei nostri animali, è stata graduale ed ingravescente, a differenza della comparsa improvvisa che si verifica in corso di encephalitozoonosi. Dunque questo parassita può essere escluso come agente eziologico anche per il fatto che nessun’altro dei segni tipici di questa patologia, come nistagmo o atassia, sono stati osservati, né tantomeno cicatrici renali o granulomi cerebrali sono stati reperiti all’esame autoptico ed istologico.

Di conseguenza le alterazioni istologiche rinvenute negli animali inducono a ritenere che i sintomi presentati siano riconducibili ad una tossicità riferita ai metalli somministrati piuttosto che a comuni malattie infettive.

Nel passato Alagna e D’Acquino (1956) a seguito di somministrazioni sottocutanee di cloruro di cobalto in 16 conigli hanno osservato cambiamenti patologici in cristallino, retina, corioide e nervo ottico; il quantitativo totale di cloruro di cobalto che questi avevano ricevuto era 900 mg in trenta giorni. In particolare, era stata riscontrata una

degenerazione grassa nelle cellule dello strato esterno ed interno della retina, edema marcato, alterazioni pigmentarie e degenerazioni cellulari nelle cellule gangliari e nella coroide. Inoltre le fibre del nervo ottico erano rigonfie e tortuose con frammentazione delle loro guaine mieliniche.

Monies e Prost (1994), a livello della retina di conigli trattati per via intraperitoneale con cobalto cloruro (8 mg/kg/die per 25 giorni), hanno riportato atrofia delle fibre nervose, lesioni al ganglio, danni alle cellule amacrine e bipolari ed alterazioni nel nucleo dei fotorecettori.

Nel nostro studio il quantitativo totale di cloruro di cobalto somministrato è stato di 11.14 mg nei conigli dei gruppi A e B, 91.60 mg nei conigli del gruppo D, quindi le alterazioni oculari sono state riscontrate a concentrazioni circa 80 volte inferiori rispetto a quelle di D'Alagna e Monies (1994).

I nostri conigli esposti al cobalto hanno mostrato una deplezione delle cellule gangliari della retina, danno al nervo ottico, perdita di entrambi i tipi di cellule sensitive capellute e riduzione delle cellule gangliari nella coclea.

Gli esiti degli esami istologici dei due conigli della terza prova con sintomi neurologici evidenti ha messo in luce un'alterazione delle cellule gangliari della retina e della coclea molto più severa rispetto agli altri. Si è quindi ipotizzato, che le cellule gangliari siano l'obiettivo cellulare primario del cobalto a livello oculare e che il danno si estenda al nervo solo più tardivamente.

La maggior parte dei segni e delle lesioni riscontrate presentano somiglianze con una specifica patologia umana delle cellule dell'occhio, la neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON). Questa è limitata allo strato di cellule gangliari della retina, con interessamento del pigmento epiteliale retinico e dei fotorecettori. In questa patologia si nota una degenerazione pronunciata degli assoni e del corpo cellulare, con demielinizzazione ed atrofia osservate a partire dai nervi ottici, analogamente a quanto riscontrato nella nostra prova con il cobalto.

Nella atrofia ottica (LHON) viene sottolineata una alterata capacità di trasporto del glutammato (Beretta et al., 2004), la presenza di stress ossidativo (Beretta et al., 2006; Floriani et al., 2005), l'aumento di specie reattive dell'ossigeno mitocondriali (ROS) all'interno delle cellule gangliari della retina (Carelli et al., 2004) e morte cellulare apoptotica (Danielson et al., 2002; Zanna et al., 2005).

Sadun et al. (1998) ha ipotizzato che un meccanismo fisiopatologico comune, che coinvolga il deterioramento della funzione mitocondriale e, di conseguenza, il trasporto assonale, possa essere alla base, sia di malattie genetiche del nervo ottico, come la sindrome di Leber, che di neuropatie ottiche da deficit acquisiti di natura nutrizionale o tossica.

Alcuni studi ipotizzano che i mitocondri siano il target principale della tossicità da cobalto. E' noto che il cobalto induce uno stato "hypoxia-like" sia *in vivo* che *in vitro*, spesso in condizioni di pressione molecolare dell'ossigeno normali. Il coinvolgimento selettivo di alcuni tipi di cellule, in particolare i neuroni, in malattie con disfunzione mitocondriale sembra essere correlato al loro elevato fabbisogno energetico; infatti i sistemi nervoso centrale e periferico si basano prevalentemente sulla produzione di energia mitocondriale (Chen e Chan, 2006).

Si potrebbe quindi ipotizzare che le differenti tipologie neuronali siano caratterizzate da tipi mitocondriali e fabbisogni diversi, mostrando quindi un diverso grado di resistenza a sostanze tossiche che inducono effetti ipossia-simili.

Molti studi, inoltre, hanno rilevato una relazione inversa tra le attività mitocondriali e la mielinizzazione (Minckler et al., 1976; Andrews et al., 1999; Bristow et al., 2002).

Tutte le milioni di fibre del nervo ottico derivano dalle cellule gangliari dello strato interno della retina. Queste cellule occupano lo spazio tra lo strato plessiforme interno e lo strato che ricopre le fibre nervose retiniche. Ogni cellula gangliare retinica contribuisce con un assone, che viaggia internamente (verso il vitreo) dentro lo strato di fibre nervose e poi nell'origine del nervo ottico.

Nell'iniziale parte non mielinizzata dell'assone, anteriore alla lamina cribrosa ci sono varicosità ricche di mitocondri, che formano siti funzionali con elevata richiesta locale di energia (Wang et al., 2003). Le porzioni non mielinizzate delle cellule gangliari retiniche hanno una più bassa velocità di conduzione e richiedono un'energia molto più elevata per recuperare il potenziale elettrico, rispetto alla parte posteriore mielinizzata di questi stessi assoni, che sono più efficienti nel dispendio di energia e nella velocità di conduzione, poiché sfruttano la conduzione saltatoria (Waxman et al., 1978).

Di conseguenza a causa dei tratti non mielinizzati, le cellule gangliari retiniche sono elementi bioenergeticamente "deboli" del sistema nervoso centrale.

Nell'orecchio, le fibre nervose sono più dense per le cellule capellute interne che per quelle esterne e le fibre delle cellule capellute interne sono anche molto più mielinizzate, il che è in contrasto con le fibre nervose delle cellule capellute esterne non mielinizzate (Spoendlin et al., 1971).

Proprio questa analogia tra la mielinizzazione delle cellule capellute esterne dell'orecchio e quella delle cellule gangliari della retina potrebbe spiegare la loro specifica vulnerabilità nei confronti del cobalto.

Inoltre, il relativo consumo di ossigeno della retina è più elevato rispetto anche a quello del cervello, che risulta uno dei tessuti a più alto consumo di ossigeno dell'organismo (Yu e Cringle, 2001). Questo sistema funzionalmente dicotomico è probabilmente alla base dell'estrema sensibilità delle cellule gangliari della retina verso disfunzioni della catena respiratoria, stress ossidativi e, da ultimo, l'apoptosi (Carelli et al., 2004; Yu-Wai-Man et al., 2005).

Ciascuna di queste potrebbe essere di rilevanza patologica per neuropatie oculari con coinvolgimento primario o secondario dei mitocondri. Lo stress ossidativo a questo livello nelle cellule gangliari, causato da uno squilibrio tra la produzione e la rimozione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), potrebbe essere importante nella patogenesi di molte neuropatie ottiche (Tezel, 2006). Infatti la degenerazione delle cellule gangliari retiniche, l'atrofia del nervo ottico e la conseguente cecità sono caratteristiche cliniche molto frequenti nei disordini mitocondriali (Carelli et al., 2006).

Battaglia et al. (2009) hanno cercato di stabilire se il cobalto agisse come induttore di apoptosi mitocondrio-mediata e di chiarire il meccanismo di questo processo. Nello studio è stato osservato che il  $\text{Co}^{2+}$  è capace di indurre nei mitocondri di fegato di ratto, il fenomeno della transizione per permeabilità mitocondriale (MPT) con l'apertura dei pori di transizione, rigonfiamento mitocondriale e collasso del potenziale elettrico di membrana. Inoltre si è anche rilevato che  $\text{Co}^{2+}$  causa il rilascio di fattori pro-apoptotici, quali citocromo c e AIF (apoptosis inducing factor), con attivazione della caspasi e incrementato livello di espressione di HIF-1 $\alpha$ ; osservazioni queste che portano ad affermare che il cobalto è un induttore di apoptosi, innescata dallo stress ossidativo mitocondriale.

Ci sono evidenze in letteratura che suggeriscono come il cobalto sia citotossico nei confronti di molti tipi cellulari, inclusi i neuroni (Wang et al., 2000; Olivieri et al.,

2001; Yang et al., 2004), e come possa indurre morte cellulare sia per apoptosi che per necrosi (Huk et al., 2004), inducendo la frammentazione del DNA (Zou et al. 2001; Graham et al., 2004), l'attivazione della caspasi (Zou et al., 2002), l'incremento di produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Olivieri et al., 2001; Chandel et al., 2000; Zou et al., 2001), l'aumentata fosforilazione della proteinchinasi mitogeno-attivata (MAP) (Yang, 2004; Zou et al., 2002) ed elevati livelli di p53 (Chandel et al., 2000), nonché l'alterazione dell'integrità dei mitocondri (Bragadin et al., 2007; Battaglia et al., 2009; Karovic et al., 2007). Appare dunque consolidato che il cobalto, i cui effetti indotti sono ROS dipendenti (Jomova and Valko, 2011), media la comparsa di stress ossidativo che contribuisce alla tossicità cellulare e alla morte.

Infine, una recente pubblicazione ha indicato i neuroni e le cellule gangliari retiniche come principali obiettivi della tossicità da Co mediata da ROS (Matés et al., 2010).

In conclusione sarebbe proprio l'azione del cobalto nei confronti dei mitocondri e la produzione di specie reattive dell'ossigeno le cause potenziali degli effetti rinvenuti sulle cellule sensoriali acustiche ed ottiche piuttosto che il Cromo o l'associazione dei due metalli.

## 10. CONCLUSIONI

Nonostante la somministrazione protratta nel tempo, dopo un iniziale incremento ed una breve fase di plateau, i livelli di Co sono rapidamente decresciuti e lo stesso andamento si è ripetuto sia nel sangue che nel plasma. Una tendenza simile inoltre è stata osservata dopo avere raddoppiato la dose, ciò induce a pensare che vi possa essere un meccanismo di clearance dose-dipendente che va incontro a saturazione.

Nessuna evidente alterazione, clinica o patologica, è stata associata alla somministrazione di cromo, mentre i conigli trattati con solo cobalto hanno mostrato anomalie principalmente al sistema ottico e vestibolo-cocleare.

Tutti gli animali esposti al cobalto hanno manifestato le stesse alterazioni istologiche, mentre la gravità, sia dei sintomi che dei danni ultrastrutturali, è dipesa dalla dose e dal tempo di esposizione.

Le alterazioni istopatologiche sono state comparabili a quelle di neuropatie ottiche caratterizzate da stress ossidativo, aumentata produzione di specie reattive dell'ossigeno e morte cellulare per apoptosi, si è quindi ipotizzato che il possibile obiettivo per la tossicità del cobalto possano essere i mitocondri, di cui le terminazioni nervose delle cellule gangliari retiniche sono ricche.

Un'analogia tra il ridotto grado di mielinizzazione delle cellule gangliari retiniche e le cellule capellute esterne dell'orecchio viene ipotizzata in considerazione anche della relazione inversa, riportata in letteratura, tra le attività mitocondriali e la mielinizzazione.

La comparazione tra i sintomi rinvenuti nel corso di intossicazione da Co, causata dal rilascio cronico di detriti in seguito ad usura di protesi, e i segni presenti in corso di neuropatia ottica ereditaria di Leber (LHON), potrebbe essere la chiave per chiarire il meccanismo patogenetico che riconosce il cobalto come agente tossico; infatti, un meccanismo fisiopatologico comune, che coinvolga il deterioramento della funzione mitocondriale e, di conseguenza, il trasporto assonale, potrebbe essere alla base sia di malattie genetiche del nervo ottico come la sindrome di Leber, che di neuropatie ottiche da deficit acquisiti di natura tossica.

Co ha la capacità, da un lato, di aumentare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che incidono sulle capacità funzionali dei mitocondri, dall'altro di aumentare la permeabilità mitocondriale inducendo il fenomeno della transizione (MPT).

Sebbene sia stato identificato il Cobalto come principale elemento di neurotossicità, il meccanismo molecolare che sta alla base deve ancora essere confermato. Le dosi elevate che sono state somministrate agli animali, scelte sulla base della principale finalità di questa ricerca, potrebbero avere “mascherato” una possibile predisposizione genetica o suscettibilità individuale, non è stato tuttavia possibile individuare un livello soglia.

## BIBLIOGRAFIA

**Abbasi, S.A., Nipaney, P.C., Soni, R.** (1989). Environmental status of cobalt and its micro determination with 7-nitroso-8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid in waters, aquatic weeds and animal tissues. *Anal. Lett.* 22(1), 225-235.

**Alagna, G., D'Acquino, S.** (1956). Alterazioni oculari da cloruro di cobalto. *Arch. Ottalm.* 56, 5-29.

**Alessio, L., Apostoli, P.** (2010). con la collaborazione di Elisa Albini e Simona Catalani. Manuale di medicina del lavoro e igiene industriale per tecnici della prevenzione Piccin. pp. 131-136.

**Alexandersson, R.** (1988). Blood and urinary concentrations as estimators of cobalt exposure. *Arch. Environ. Health.* 43(4), 299-303.

**Andrews, R.M., Griffiths, P.G., Johnson, M.A., Turnbull, D.M.** (1999). Histochemical localisation of mitochondrial enzyme activity in human optic nerve and retina. *Br. J. Ophthalmol.* 83, 231-235.

**Apostoli, P., Porru, S., Alessio, L.** (1994). Urinary cobalt excretion in short time occupational exposure to cobalt powders. *Sci. Total. Env.* 150, 129-132.

**Archibeck, M.J., Jacobs, J.J., Black, J.** (2000). Alternate bearing surfaces in total joint arthroplasty: biologic considerations. *Clin. Orthop. Relat. R.* (379), 12-21.

**A.T.S.D.R. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.** (2004). Toxicological Profile for Cobalt. Agency for Toxic Substances And Disease Registry. Atlanta GA. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp33.html> (accesso, 6 Aprile, 2010).

**Ayala-Fierro, F., Firriolo, J.M., Carter, D.E.** (1999). Disposition, toxicity, and intestinal absorption of cobalt chloride in male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Env. Heal. A.* 56, 571-591.

**Aydin, E., Cumurcu, T., Ozugurlu, F., Ozyurt, H., Sahinoglu, S., Mendil, D., Hasdemir, E.** (2005). Levels of iron, zinc, and copper in aqueous humor, lens, and serum in nondiabetic and diabetic patients: their relation to cataract. *Biol. Trace Elem. Res.* 108, 33-41.

**Bailey, M.R., Kreyling, W.G., Andre, S., Batchelor, A., Collier, C.G., Drosselmeyer, E., Ferron, G.A., Foster, P., Haider, B., Hodgson, A., Masse, R., Métivier, H., Morgan, A., Muller, H-L., Patrick, G., Pearman, I., Pickering, S., Ramsden, D., Stirling, C., Talbot, R.J.** (1989). An interspecies comparison of the lung clearance of inhaled monodisperse cobalt oxide particles—Part 1: Objectives and summary of results. *J. Aerosol Sci.* 20(2), 169-188.

**Barceloux, D.G.** (1999). Cobalt. *Clin. Toxicol.* 37(2), 201-216.

**Barnaby, C.F., Smith, T., Thompson, B.D.** (1968). Dosimetry of the radioisotopes of cobalt. *Phys. Med. Biol.* 13(3), 421-433.

**Bar-Or, D., Lau, E., Winkler, J.V.** (2000). A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia- a preliminary report. *J. Emerg. Med.* 19, 311-315.

**Bar-Or, D., Rael, L.T. Lau, E.P., Rao, N.K., Thomas, G.W., Winkler, J.V., Yukl, R.L., Kingston, R.G., Curtis, C.G.** (2001). An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala-His-Lys) prevents formation of copper-induced reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 284, 856-862.

**Bar-Or, D., Rael, L.T., Bar-Or, R., Slone, D.S., Mains, C.W., Rao, N.K., Curtis, C.G.** (2008). The cobalt-albumin binding assay: insights into its mode of action. *Clin. Chim. Acta.* 378, 120-127.

**Basketter, D.A., Briatico-Vangosa, G., Kaestner, W., Lally, C., Bontinck, W.J.** (1993). Nickel, cobalt and chromium in consumer products: a role in allergic contact dermatitis? *Contact Dermatitis.* 28(1), 15-25.

**Basle, M.F., Bertrand, G., Guyetant, S., Chappard, D., Lesourd, M.** (1996). Migration of metal and polyethylene particles from articular prostheses may generate lymphadenopathy with histiocytosis. *J. Biomed. Mater. Res.* 30, 157–163.

**Battaglia, V., Compagnone, A., Bandino, A., Bragadin, M., Rossi, C.A., Zanetti, F., Colombatto, S., Grillo, M.A., Toninello, A.** (2009). Cobalt induces oxidative stress in isolated liver mitochondria responsible for permeability transition and intrinsic apoptosis in hepatocyte primary cultures. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 41, 586-594.

**Beleznay, E., Osvay, M.** (1994). Long-term clearance of accidentally inhaled <sup>60</sup>Co aerosols in humans. *Health Phys.* 66, 392-399.

**Beretta, S., Mattavelli, L., Sala, G., Tremolizzo, L., Schapira, A.H., Martinuzzi, A., Carelli, V., Ferrarese, C.** (2004). Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines. *Brain.* 127, 2183–2192.

**Beretta, S., Wood, J.P.M., Derham, B., Sala, G., Tremolizzo, L., Ferrarese, C., Osborne, N.N.** (2006). Partial mitochondrial complex I inhibition induces oxidative damage and perturbs glutamate transport in primary retinal cultures. Relevance to Leber hereditary optic neuropathy (LHON). *Neurobiol. Dis.* 24, 308–317.

**Berry, M., Easty, D.L.** (1993). Isolated human and rabbit eye: Models of corneal toxicity. *Toxicol. In Vitro.* 7, 461-464.

**Black, J.** (1996). Metal on metal bearings. A practical alternative to metal on polyethylene total joints? *Clin. Orthop. Relat. Res.* (329 Suppl), S244-S255.

**Borderie, D., Allanore, Y., Meune, C., Devaux, J.Y., Ekindjian, O.G., Kahan, A.** (2004). High ischemia-modified albumin concentration reflects oxidative stress but not myocardial involvement in systemic sclerosis. *Clin. Chem.* 50(11), 2190-2193.

**Bragadin, M., Toninello, A., Mancon, M., Manente, S.** (2007). The interactions of cobalt(II) with mitochondria from rat liver. *J. Biol. Inorg. Chem.* 12, 631-635.

**Bristow, E.A., Griffiths, P.G., Andrews, R.M., Johnson, M.A., Turnbull, D.M.** (2002). The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Arch. Ophthalmol.* 120, 791–796.

**Brown, T.E., Meineke, H.A.** (1958). Presence of an active erythropoietic factor (EPO) in plasma of rats after prolonged cobalt therapy. *P. Soc. Exp. Biol. Med.* 99, 435-437.

**Brune, D., Kjaerheim, A., Paulsen, G, Beltesbrekke, H.** (1980). Pulmonary deposition following inhalation of chromium-cobalt grinding dust in rats and distribution in other tissues. *Scand. J. Dent. Res.* 88, 543-551.

**Cai, Z., Manalo, D.J., Wei, G., Rodriguez, E.R., Fox-Talbot, K., Lu, H., Zweier, J.L., Semenza, G.L.** (2003). Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation.* 108(1), 79-85.

**Carelli, V., Barboni, P., Sadun, A.A.** (2006). Mitochondrial ophthalmology, in: Di Mauro, S., Hirano, M., Schon, E. (Eds.), *Mitochondrial medicine*. Informa Healthcare Abingdon, Oxon, UK, pp. 105–142.

**Carelli, V., Rugolo, M., Sgarbi, G., Ghelli, A., Zanna, C., Baracca, A., Lenaz, G., Napoli, E., Martinuzzi, A., Solaini, G.** (2004). Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1658, 172–179.

**Carter, D.C., Ho, J.X.** (1994). Structure of serum albumin, *Adv. Protein Chem.* 45, 153-203.

**Casarett, L.J., Doull, J.** (1986). *Toxicology: The basic science of poisons*, 3rd ed. New York, NY, Macmillan Publishing Company, pp. 56-57.

**Case, C.P., Langkamer, V.G., James, C., Palmer, M.R., Kemp, A.J., Heap, P.F., Solomon, L.** (1994). Widespread dissemination of metal debris from implants. *J. Bone. Joint Surg. Br.* 76(5), 701-712.

**CE (Comunità Europea)** (2003). Regolamento n. 1831 sugli additivi destinati all'alimentazione animale. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, L 268, 29-43.

**Chandel, N.S., Vander Heiden, M.G., Thompson, C.B., Schumacker, P.T.** (2000). Redox regulation of p53 during hypoxia. *Oncogene*. 19, 3840–3848.

**Chen, H., Chan, D.C.** (2006). Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18(4), 453-459.

**Christensen, J., Poulsen, O.M., Thomsen, M.** (1993). A short term cross-over study on oral administration of soluble and insoluble cobalt compounds: sex differences in biological levels. *Int. Arch. Occ. Env. Hea.* 65(4), 233-240.

**Collecchi, P., Esposito, M., Brera, S., Mora, E., Mazzucotelli, A., Oddone, M.** (1986). The distribution of arsenic and cobalt in patients with laryngeal carcinoma. *J. Appl. Toxicol.* 6 (4), 287-289.

**Cruciani, F., Moramarco, A., Antonelli, B., Mollo, R., Balacco-Gabrieli, C., Costantini, S., Ciaralli, L., Giordano, R., Sepe, A., Damore, E., Valeri, M.,** (2004). Evaluation of five elements in lenses and aqueous humor of experimental rabbits after induced opacity. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 141-147.

**Danielson, S.R., Wong, A., Carelli, V., Martinuzzi, A., Schapira, A.H., Cortopassi, G.A.** (2002). Cells bearing mutations causing Leber's hereditary optic neuropathy are sensitized to Fas-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 5810–5815.

**Davis, J.E., Fields, J.P.** (1958). Experimental production of polycythemia in humans by administration of cobalt chloride. *P. Soc. Exp. Biol. Med.* 99, 493-495.

**Decreto legislativo 116** (1992). Protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici, attuazione della direttiva CEE n 609/86. Supplemento ordinario alla Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea, n 40 del 18.2.1992.

**Déry, M.A., Michiaud, M.D., Richard, D.E.** (2005). Hypoxia-inducible factor 1: regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int. J. Biochem. Cell B.* 37, 535-540.

**Diaz, G.J., Julian, R.J., Squires, E.J.** (1994). Lesions in boiler chickens following experimental intoxication with cobalt. *Avian Dis.* 38(2), 308-16.

**Doherty, A.T., Howell, R.T., Ellis, L.A., Bisbinas, I., Learmonth, I.D., Newson, R., Case, C.P.** (2001). Increased chromosome translocations and aneuploidy in peripheral blood lymphocytes of patients having revision arthroplasty of the hip. *J. Bone Joint Surg. Br.* 83, 1075-1081.

**Domingo, J.L.** (1989). Cobalt in the environment and its toxicological implications. *Rev. Env. Contam. T.* 108, 105-132.

**Duke-Elder, S., Gloster, J.** (1969). The physiology of the eye and vision, In Duke-Elder, S. *System of ophthalmology*, Henry Kimpton, London, pp.201-225.

**EFSA** (2009). Parere del gruppo di esperti scientifici sull'uso dei composti di cobalto come additivi nell'alimentazione animale. *EFSA Journal.* 7(12), 1383.

**Erie, J.C., Butz, J.A., Good, J.A., Erie, E.A., Burritt, M.F., Cameron, J.D.** (2005). Heavy metal concentrations in human eyes. *Am. J. Ophthalmol.* 139(5), 888-93.

**Firriolo, J.M., Ayala-Fierro, F., Sipes, I.G., Carter, D.E.** (1999). Absorption and disposition of cobalt naphthenate in rats after a single oral dose. *J. Toxicol. Env. Heal. A.* 58, 383-395.

**Floreani, M., Napoli, E., Martinuzzi, A., Pantano, G., De Riva, V., Trevisan, R., Bisetto, E., Valente, L., Carelli, V., Dabbeni-Sala, F.** (2005). Antioxidant defenses in cybrids harboring mtDNA mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Febs. J.* 272, 1124–1135.

**Forbes, R.M., Cooper, A.R., Mitchell, H.H.** (1954). On the occurrence of beryllium, boron, cobalt, and mercury in human tissues. *J. Biol. Chem.* 209, 857-865.

**Foster, P.P., Peaman, I., Ramsden, D.** (1989). An interspecies comparison of the lung clearance of inhaled monodisperse cobalt oxide particle - Part II: Lung clearance of inhaled cobalt oxide in man. *J. Aerosol Sci.* 20(2), 189-204.

**Gallinaro, P., Piolatto, G.** (2009). Blind and deaf after total hip replacement? *Lancet*. 373, 1944; author reply.

**Gardner, F.H.** (1953). The use of cobalt chloride in anemia associated with chronic renal disease. *J. Lab. Clin. Med.* 41(1), 56-64.

**Gawkrodger, D.J.** (1993). Nickel sensitivity and the implantation of orthopedic prostheses. *Contact Dermatitis*. 28(5), 257-259.

**Graham, R.M., Frazier, D.P., Thompson, J.W., Haliko, S., Li, H., Wasserlauf, B.J., Spiga, M.G., Bishopric, N.H., Webster, K.A.** (2004). A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia-acidosis. *J. Exp. Biol.* 207, 3189-3200.

**Greenberg, D.M., Copp, D.H., Cuthbertson, E.M.** (1943). Studies in mineral metabolism with the aid of artificial radioactive isotopes: VII. The distribution and excretion, particularly by way of the bile, of iron, cobalt, and manganese. *J. Biol. Chem.* 147, 749-756.

**Gregus, Z., Klaassen, C.D.** (1986). Disposition of metals in rats: A comparative study of fecal, urinary, and biliary excretion and tissue distribution of eighteen metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 85, 24-38.

**Grimsley, L.F.** (2001). Iron and cobalt. In : Bingham E., B. Cofrssen, and C.H. Powell, Eds. *Patty's Toxicology*, 5<sup>th</sup> ed. Vol.3. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, pp.169-193.

**Grübl, A., Marker, M., Brodner, W., Giurea, A., Heinze, G., Meisinger, V., Zehetgruber, H., Kotz, R.** (2007). Long-term follow-up of metal-on-metal total hip replacement. *J. Orthop. Res.* 25, 841-848.

**Hahtola, P.A., Järvenpää, R.E., Lounatmaa, K., Mattila, J.J., Rantala, I., Uitti, J.A., Sutinen, S.** (2000). Hard metal alveolitis accompanied by rheumatoid arthritis. *Respiration*. 67, 209-212.

**Hallab, N., Jacobs, J.J., Black, J.** (2000). Hypersensitivity to metallic biomaterials: a review of leukocyte migration inhibition assays. *Biomaterials*. 21, 1301-1314.

**Harcourt-Brown, F.** (2002). *Textbook of rabbit medicine*. Oxford (UK): Butterworth Heinemann.

**Hill, C.H.** (1974). Influence of high levels of minerals on the susceptibility of chicks to *Salmonella gallinarum*. *J. Nutr.* 104(10), 1221-1226.

**Hollins, J.G., McCullough, R.S.** (1971). Radiation dosimetry of internal contamination by inorganic compounds of cobalt: An analysis of cobalt metabolism in rats. *Health Phys.* 21, 233-246.

**Hoet, P.M.H., Roesems, G., Demedts, M.G., Nemery, B.** (2002). Activation of the hexose monophosphate shunt in rat type II pneumocytes as an early marker of oxidative stress caused by cobalt particles. *Arch. Toxicol.* 76, 1-7.

**Horowitz, S.F., Fischbein, A., Matza, D., Rizzo, J.N., Stern, A., Machac, J., Solomon, S.J.** (1988). Evaluation of right and left ventricular function in hard metal workers. *Brit. J. Ind. Med.* 45, 742-746.

**Huk, O.L., Catelas, I., Mwale, F., Antoniou, J., Zukor, D.J., Petit, A.** (2004). Induction of apoptosis and necrosis by metal ions in vitro. *J. Arthroplasty*. 19, 84–87.

**IARC** (2006). Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. International Agency for Research on Cancer, Lyon.

**Ichikawa, Y., Kusaka, Y., Goto, S.** (1985). Biological monitoring of cobalt exposure, based on cobalt concentrations in blood and urine. *Int. Arch. Occ. Env. Hea.* 55, 269-76.

**International Commission on Radiological Protection (ICRP)** (1979). Limits for intakes of radionuclides by workers. New York, NY, Pergamon Press on behalf of the International Commission on Radiological Protection. ICRP Publication 67; *Annals of the ICRP*, 23, No.3-4.

**Ikeda, T., Takahashi, K., Kabata, T., Sakagoshi, D., Tomita, K., Yamada, M.** (2010). Polyneuropathy caused by cobalt-chromium metallosis after total hip replacement. *Muscle Nerve*. 42(1), 140-143.

**Isaac, G.H., Siebel, T., Oakeshott, R.D., McLennan-Smith, R., Cobb, A.G., Schmalzried, T.P. Vail, T.P.** (2009). Changes in whole blood metal ion levels following resurfacing: serial measurements in a multi-centre study. *Hip. Int.* 19, 330-337.

**Ishihara, N., Koizumi, M., Yoshida, A.** (1987). Metal concentrations in human pancreatic juice. *Arch. Environ. Health*. 42(6), 356-360.

**Ivancsitis, S., Diem, E., Pilger, A., Rüdger, H.W.** (2002). Induction of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by cobalt(II) and hydrogen peroxide in vitro. *J. Toxicol. Env. Health*. 65, 665-676.

**Jacobs, J.J., Skipor, A.K., Doorn, P.F., Campbell, P., Schmalzried, T.P., Black, J., Amstutz, H.C.** (1996). Cobalt and chromium concentrations in patients with metal on metal total hip replacements. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (329 Suppl), S256-S263.

**Jansen, H.M.L., Knollema, S., van der Duin, L.V., Willemsen, A.T., Wiersma, A., Franssen, E.J., Russel, F.G, Korf, J., Paans, A.M.** (1996). Pharmacokinetics and dosimetry of cobalt-55 and cobalt 57. *J. Nucl. Med.* 37(12), 2082-2086.

**Jarvis, J.Q., Hammond, E., Meier, R., Robinson, C.** (1992). Cobalt cardiomyopathy. A report of two cases from mineral assay laboratories and a review of the literature. *Jom-J. Occup. Med.* 34, 620-626.

**Jelkmann, W.** (2004). Molecular biology of erythropoietin. *Internal Med.* 43, 649-659.

**Jomova, K., Valko, M.** (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicol.* 283, 65-87.

**Jordan, C., Whitman, R.D., Harbut, M.** (1990). Memory deficits in workers suffering from hard metal disease. *Toxicol. Lett.* 54, 241-243.

**Karovic, O., Tonazzini, I., Rebola, N., Edström, E., Lövdahl, C., Fredholm, B.B., Daré, E.** (2007). Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse astrocytes. Similarities with hypoxia and role of HIF-1alpha. *Biochem. Pharmacol.* 73, 694-708.

**Kasprzak, K.S., Zastawny, T.H., North, S.L., Riggs, C.W., Diwan, B.A., Rice, J.M., Dizdaroglu, M.** (1994). Oxidative DNA base damage in renal, hepatic, and pulmonary chromatin of rats after intraperitoneal injection of cobalt(II)acetate. *Chem. Res. Toxicol.* 7, 329-335.

**Kpodékon, M.** (1983). Pathologie et pathogénie des complications auriculaires et encéphaliques de la pasteurellose du lapin d'élevage. *Ann. Rech. Vét.* 14, 225-232.

**Kraus, T., Schramel, P., Schaller, K.H., Zöbelein, P., Weber, A., Angerer, J.** (2001). Exposure assessment in the hard metal manufacturing industry with special regard to tungsten and its compounds. *Occup. Environ. Med.* 58, 631-634.

**Künzel, F., Gruber, A., Tichy, A., Edelhofer, R., Nell, B., Hassan, J., Leschnik, M.,**

**Thalhammer, J.G., Joachim, A.** (2008). Clinical symptoms and diagnosis of encephalitozoonosis in pet rabbits. *Vet. Parasitol.* 151, 115-124.

**Kusaka, Y., Ichikawa, Y., Shirakawa, T., Goto, S.** (1986). Effect of hard metal dust on ventilatory function. *Brit. J. Ind. Med.* 43, 486-489.

**Kusaka, Y., Iki, M., Kumagai, S., Goto, S.** (1996). Epidemiological study of hard metal asthma. *Occup. Environ. Med.* 53, 188-193.

**Kusaka, Y., Kumagai, S., Kyono, H., Kohoyama, N., Shirakawa, T.** (1992). Determination of exposure to cobalt and nickel in the atmosphere in the hard metal industry. *Ann. Occup. Hyg.* 36, 497-507.

**Langård, S., Costa, M.** (2007). Chromium. In: Norberg, G.F., Fowler, B.A., Norberg, M., Friberg, L.T. (eds) *Handbook on the Toxicology of Metals*. 3rd ed. Burlington, USA: Elsevier, pp.487-510.

**Larese Filon, F., Maina, G., Adami, G., Venier, M., Cocceani, N., Bussani, R., Massiccio, M., Barbieri, P., Spinelli, P.** (2004). In vitro percutaneous absorption of cobalt. *Int. Arch. Occ. Env. Hea.* 77, 85-89.

**Lasfargues, G., Wild, P., Moulin, J.J., Hammon, B., Rosmorduc, B., Rondeau du Noyer, C., Landier, M., Moline, J.** (1994). Lung cancer mortality in a French cohort of hard-metal workers. *Am. J. Ind. Med.* 26, 585-595.

**Lewis, C.P.L., Demedts, M., Nemery, B.** (1991). Indices of oxidative stress in hamster lung following exposure to cobalt(II) ions ; In vivo and in vitro studies. *Am. J. Resp. Cell Mol.* 5, 163-169.

**Lhotka, C., Szekeres, T., Steffan, I., Zhuber, K., Zweymüller, K.** (2003). Four-year study of cobalt and chromium blood levels in patients managed with two different metal-on-metal total hip replacements. *J. Orthop. Res.* 21, 189-195.

**Licht, A., Oliver, M., Rachmilewitz, E.A.** (1972). Optic atrophy following treatment with cobalt chloride in a patient with pancytopenia and hyper cellular marrow. *Isr. J. Med. Sci.* 8, 61-66.

**Lippi, G., Franchini, M., Guidi, G.C.** (2005). Cobalt chloride administration in athletes: a new perspective in blood doping? *Brit. J. Sport. Med.* 39, 872-873.

**Lippi, G., Montagnana, M., Salvano, G.L., Guidi, G.C.** (2006). Potential value for new diagnostic markers in the early recognition of acute coronary syndromes. *Can. J. Emerg. Med. Care.* 8, 27-31.

**Lison, D., Carbonelle, P., Mollo, L., Lauwerys, R., Fubini, B.** (1995). Physicochemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 600-606.

**Lison, D.** (2007). Cobalt. In: Norberg, G.F., Fowler, B.A., Norberg, M. Friberg, L.T. (eds) *Handbook on the Toxicology of Metals*. 3rd ed. Burlington, USA: Elsevier, 511–528.

**Maezawa, K., Nozawa, M., Hirose, T., Matsuda, K., Yasuma, M., Shitoto, K. Kurosawa, H.** (2002). Cobalt and chromium concentrations in patients with metal-on-metal and other cementless total hip arthroplasty. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 122, 283-287.

**Mao, X., Wong, A.A., Crawford, R.W.** (2011). Cobalt toxicity — an emerging clinical problem in patients with metal-on-metal hip prostheses? *Med. J. Aust.* 194, 649-651.

**Matés, J.M., Segura, J.A., Alonso, F.J., Márquez, J.** (2010). Roles of dioxins and heavy metals in cancer and neurological diseases using ROS-mediated mechanisms. *Free Radic. Biol. Med.* 49, 1328-1341.

**Matziolis, G., Perka, C., Disch, A.** (2003). Massive metallosis after revision of a fractured ceramic head onto a metal head. *Arch. Orthop Trauma Surg.* 123, 48-50.

**McKee, G.K., Watson-Farrar, J.** (1966). Replacement of arthritic hips by the McKee-Farrar prosthesis. *J. Bone Joint Surg. Br.* 48, 245–259.

**Meecham, H.M., Humphrey, P.** (1991). Industrial exposure to cobalt causing optic atrophy and nerve deafness: A case report. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 54, 374-375.

**Megaterio, S., Galetto, F., Alossa, E., Capretto, S.** (2001). Systemic effects of ionic release in wear of prosthetic head: a case report. *G. Ita. Ort. Traum.* 27, 173-175.

**Merian, E.** (1985). Introduction on environmental chemistry and global cycles of chromium, nickel, cobalt, beryllium, arsenic, cadmium and selenium, and their derivatives. *Curr. Top. Env. Toxicol. Chem.* 8, 3-32.

**Merritt, K., Brown, S.** (1995). Release of hexavalent chromium from corrosion of stainless steel and cobalt chromium alloys. *J. Biomed. Mater. Res.* 29, 627-633.

**Merritt, K., Brown, S.** (1996). Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions. *Clin. Orthop. Relat. Res.* (329 Suppl), S233-S234.

**Meyer-Bisch, C., Pham, Q.T., Mur, J.M., Massin, N., Moulin, J.J., Teculescu, D., Carton, B., Pierre, F., Baruthio, F.** (1989). Respiratory hazards in hard metal workers: a cross section study. *Brit. J. Ind. Med.* 46, 302-309.

**Minckler, D.S., McLean, I.W., Tso, M.O.** (1976). Distribution of axonal and glial elements in the rhesus optic nerve head studied by electron microscopy. *Am. J. Ophthalmol.* 82, 179–187.

**Monies, A., Prost, M.** (1994). Experimental studies on lesions of eye tissues in cobalt intoxication. *Klin. Oczna.* 96, 135-139.

**Moulin, J.J., Wild, P., Romanzino, S., Lasfargues, G., Peltier, A., Bozec, C., Deguerry, P., Pellet, F., Perdrix, A.** (1998). Lung cancer risk in hard-metal workers. *Am. J. Epidemiol.* 148(3), 241-248.

**Munita, C.S., Mazzilli, B.P.** (1986). Determination of trace elements in Brazilian cigarette tobacco by neutron activation analysis. *J. Radioan. Nucl. Ch. Le.* 108(4), 217-227.

**Mur, J.M., Moulin, J.J., Charruyer-Seinerra, M.P., Lafitte, J.** (1987). A cohort morality study among cobalt and sodium workers in an electrochemical plant. *Am. J. Ind. Med.* 11, 75-81.

**Muramatsu, Y., Parr, R.M.** (1988). Concentrations of some trace elements in hair, liver and kidney from autopsy subjects-relationship between hair and internal organs. *Sci. Total Env.* 76, 29-40.

**Naylor, G.P.L., Harrison, J.D.** (1995). Gastrointestinal iron and cobalt absorption and iron status in young rats and guinea pigs. *Hum. Exp. Toxicol.* 14, 949-954.

**Nuevo Ordenez, Y., Montes-Bayon, M., Blanco-Gonzalez, E., Paz-Jimenez, J., Tejerina-Lobo, J.M., Pena-Lopez, J.M., Sanz-Medel, A.** (2009). Metal release in patients with total hip arthroplasty by DF-ICP-MS and their association to serum proteins. *J. Anal. At. Spectrom.* 24, 1037-1043.

**Oldenburg, M., Wegner, R., Baur, X.** (2009). Severe cobalt intoxication due to prosthesis wear in repeated total hip arthroplasty. *J. Arthropl.* 24, 825 e 15-20.

**Olivieri, G., Hess, C., Savaskan, E., Ly, C., Meier, F., Baysang, G., Brockhaus, M., Müller-Spahn, F.** (2001). Melatonin protects SHSY5Y neuroblastoma cells from cobalt-induced oxidative stress, neurotoxicity and increased beta-amyloid secretion. *J. Pineal. Res.* 31, 320–325.

**Ostapczuck, P., Valenta, P., Rutzel, H., Nürnberg, H.W.** (1987). Application of differential pulse anodic stripping voltmeter to the determination of heavy metals in environmental samples. *Sci. Total Env.* 60, 1-16.

**Paley, K.R., Sobel, E.S., Yalow, R.S.** (1958). Effect of oral and intravenous cobaltous chloride on thyroid function. *J. Clin. Endocr. Metab.* 18, 850-859.

**Panteli, V.S., Kanellopoulou, D.G., Gartaganis, S.P., Koutsoukos, P.G.** (2009). Application of anodic stripping voltammetry for zinc, copper, and cadmium quantification in the aqueous humor: implications of pseudoexfoliation syndrome. *Biol. Trace Elem. Res.* 132, 9-18.

**Patrick, G., Batchelor, A.L., Stirling, C.** (1989). An interpecies comparison of the lung clearance of inhaled monodisperse cobalt oxide particles-Part VI: Lung clearance of inhaled cobalt oxide particles in SPF Fischer rats. *J. Aerosol Sci.* 20, 249–255.

**Pazzaglia, U.E., Apostoli, P., Congiu, T., Catalani, S., Marchese, M., Zarattini, G.** (2011). Cobalt, chromium and molybdenum ions kinetics in the human body: data gained from a total hip replacement with massive third body wear of the head and neuropathy by cobalt intoxication. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 131, 1299-1308.

**Peters, T.Jr.** (1995). *All About Albumin Biochemistry, Genetics, and Medical Applications*, second edition, Academic Press, New York 1995.

**Prescott, E., Netterstrom, B., Faber, J., Hegedus, L., Suadicani, P., Christensen, J.M.** (1992). Effect of occupational exposure to cobalt blue dyes on the thyroid volume

and function of female plate painters. *Scand. J. Work Env. Hea.* 18, 101-104.

**Quesenberry, K.E., Carpenter, J.W.** (2004). Ferrets, rabbits and rodents. In: *Clinical medicine and surgery*. 3rd edition. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri.

**Qian, Z.M., Li, H., Sun, H., Ho, K.** (2002). Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.* 54, 561-87.

**Reichenbach, A., Schnitzer, J., Reichelt, E., Osborne, N.N., Fritzsche, B., Puls, A., Richter, U., Friedrich, A., Knothe, A.K., Schober, W.** (1993). Development of the rabbit retina, III: Differential retinal growth, and density of projection neurons and interneurons. *Vis. Neurosci.* 10, 479-479.

**Reuber, S., Krcuzer, M., Kirchgessner, M.** (1994). Interactions of cobalt and iron in absorption and retention. *J. Trace Elem. Elect. H.* 8, 151-158.

**Rizzetti, M.C., Liberini, P., Zarattini, G., Catalani, S., Pazzaglia, U., Apostoli, P., Padovani, A.** (2009). Loss of sight and sound. Could it be the hip? *Lancet.* 373, 1052.

**Ruokonen, E.L., Linnainmaa, M., Seuri, M., Juhakoski, P. Söderström, K.O.** (1996). A fatal case of hard-metal disease. *Scand. J. Work Env. Hea.* 22, 62-65.

**Sadun, A.** (1998). Acquired mitochondrial impairment as a cause of optic nerve disease. *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* 96, 881-923.

**Scansetti, G., Botta, G.C., Spinelli, P., Reviglione, L., Ponzetti, C.** (1994). Absorption and excretion of cobalt in the hard metal industry. *Sci. Total Env.* 150, 141-144.

**Scansetti, G., Maina, G., Botta, G.C., Bambace, P., Spinelli, P.** (1998). Exposure to cobalt and nickel in the hard-metal production industry. *Int. Arch. Occ. Env. Hea.* 71, 60-63.

**Schade, S.G., Felsher, B.F., Bernier, G.M., Condrad, M.E.** (1979). Interralationship of cobalt and iron absorption. *J. Lab. Clin. Med.* 75, 435- 441.

**Schaffer, A.W., Pilger, A., Engelhardt, C., Zweymueller, K., Ruediger, H.W.** (1999). Increased blood cobalt and chromium after total hip replacement. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37, 839–844.

**Schirmacher, U.O.E.** (1967). Case of cobalt poisoning. *Br. Med. J.* 1, 544-545.

**Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M., Wang, G.L.** (1994). Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 296(38), 23757-23763.

**Shirakawa, T., Kusaka, Y., Fujimura, N., Kato, M., Heki, S., Morimoto, K.** (1990). Hard metal asthma: cross immunological and respiratory reactivity between cobalt and nickel? *Thorax.* 45, 267-271.

**Simesen, M.** (1939). The fate of cobalt after oral administration of metallic cobalt and subcutaneous injection of carbonato-tetramine cobalt chloride, with remarks on the quantitative estimation of cobalt in organic materials. *Arch. Int. Pharmacod. T.* 62, 347-356.

**Smith, I.C., Carson, B.L.** (1981). Trace metals in the environment. Ann Arbor, MI, Ann Arbor Science Publishers.

**Smith, T., Edmonds, C.J., Barnaby, C.F.** (1972). Absorption and retention of cobalt in man by whole-body counting. *Health Phys.* 22, 359-367.

**Sorbie, J., Olatunbosun, D., Corbett, W.E., Valberg, L.S.** (1971). Cobalt excretion test for the assessment of body iron stores. *Can. Med. Assoc. J.* 104 (9), 777-782.

**Spoendlin, H.** (1971). Degeneration behavior of the cochlear nerve. *Arch. Klin. Exp. Ohren. Nasen. Kehlkopfheilkd.* 200, 275-291.

**Stebbins, A.L., Horstman, S.W., Daniell, W.E., Atallah, R.** (1992). Cobalt exposure in a carbide tip grinding process. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 53(3), 186-192.

**Steens, W., Von Foerster, G., Katzer, A.** (2006). Severe cobalt poisoning with loss of

sight after ceramic-metal pairing in a hip-a case report. *Acta Orthop.* 77, 830-832.

**Steinbrech, D.S., Mehrara, B.J., Saadeh, P.B., Greenwald, J.A., Spector, J.A., Gittes, G.K., Longaker, M.T.** (2000). Hypoxia increases insulin like growth factor gene expression in rat osteoblasts. *Ann. Plas. Surg.* 44, 529-534.

**Sun, H., Li, H., Sadler, P.J.** (1999). Transferrin as a metal ion mediator. *Chem. Rev.* 99, 2817-42.

**Sundaram, P., Agrawal, K., Mandke, J.V., Joshi, J.M.** (2001). Giant cell pneumonitis induced by cobalt. *Indian J. Chest Dis. All. Sci.* 43, 47-49.

**Sunderman, F.W., Hopfer, S.M., Swift, T., Rezuke, W.N., Ziebka, L., Highman, P., Edwards, B., Folcik, M., Gossling, H.R.** (1989). Cobalt, chromium and nickel concentrations in body fluids of patients with porous coated knee or hip prostheses. *J. Orthop. Res.* 7, 307–315.

**Swennen, B., Buchet, J.P., Stănescu, D., Lauwerys, R.** (1993). Epidemiological survey of workers exposed to cobalt oxides, cobalt salts, and cobalt metal. *Brit. J. Ind. Med.* 50, 835-842.

**Szakmary, E., Ungvary, G., Hudak, A., Tatrai, E., Naray, M., Morvai, V.** (2001). Effects of cobalt sulfate on prenatal development of mice, rats, and rabbits, and on early postnatal development of rats. *J. Toxicol. Env. Heal. A.* 62, 367-386.

**Talbot, R.J., Morgan, A.** (1989). An interspecies comparison of the lung clearance of inhaled monodisperse cobalt oxide particles-- Part VIII: Lung clearance of inhaled cobalt oxide particles in mice. *J. Aerosol Sci.* 20(2), 261-265.

**Tandon, S.K., Behari, J.R., Kachru, D.N.** (1979). Distribution of chromium in poisoned rats. *Toxicol.* 13, 29-34.

**Taylor, D.M.** (1962). The absorption of cobalt from the gastrointestinal tract of the rat. *Phys. Med. Biol.* 6, 445-451.

- Taylor, A., Marks, V.** (1978). Cobalt : A review. *J. Hum. Nutr.* 32, 165-177.
- Templeton, D.** (1996). Cobalt. In: *Biological monitoring of chemical exposure in the workplace*. Vol.2. Geneva, World Health Organization. pp.35-50.
- Teraoka, H.** (1981). Distribution of 24 elements in the internal organs of normal males and the metallic workers in Japan. *Arch. Environ. Health.* 36(4), 155-165.
- Tezel, G.** (2006). Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: mechanisms and consequences. *Prog. Retin. Eye Res.* 25, 490–513.
- Thomas, R.G., Furchner, J.E., London, J.E., Drake, G.A., Wilson, J.S., Richmond, C.R.** (1976). Comparative metabolism of radionuclides in mammals—X. Retention of tracer-level cobalt in the mouse, rat, monkey, and dog. *Health Phys.* 31, 323-333.
- Torti, S., Torti, F.M.** (1994). Iron and ferritin in inflammation and cancer. *Adv. Inorg. Biochem.* 10, 119-37.
- Tower, S.S.** (2010a). Arthroprosthetic cobaltism: identification of the at-risk patient. *Alaska Med.* 52, 28-32.
- Tower, S.S.** (2010b). Arthroprosthetic Cobaltism: Neurological and Cardiac Manifestations in Two Patients with Metal-on-Metal Arthroplasty: A Case Report. *J. Bone Joint Surg.* 92, 1-5.
- Tower, S.S.** (2010c). Cobalt Toxicity in Two Hip Replacement Patients. *Epidemiology, Bulletin* N°14, <http://www.epi.Alaska.gov>.
- Turedi, S., Gunduz, A., Mentese, A., Dasdibi, D., Carahan, S.C., Sahin, A., Tuten, G., Kopuz, M., Alver, A.** (2009). Investigation on the possibility of using ischemia-modified albumin as a novel and early prognostic marker in cardiac arrest patients after cardiopulmonary resuscitation. *Resuscitation.* 80, 994-999.
- Valberg, L.S., Ludwig, J., Olatunbosun, D.** (1969). Alteration in cobalt absorption in patients with disorders of iron metabolism. *Gastroenterology.* 56 (2), 241-251.

**Van Vleet, J.F., Boon, G.D., Ferrans, V.J.** (1981). Induction of lesions of selenium-vitamin E deficiency in ducklings fed silver, copper, cobalt, tellurium, cadmium, or zinc: protection by selenium or vitamin E supplements. *Am. J. Vet. Res.* 42(7), 1206-1217.

**Vendittoli, P.A., Ganapathi, M., Lavigne, M.** (2007). Blood and urine metal ion levels in young and active patients after Birmingham hip resurfacing arthroplasty. *J. Bone Joint Surg. Br.* 89, 989–990.

**Venugopal, B., Luckey, T.D.** (1978). *Metal Toxicity in Mammals, 2.* New York: Plenum Press, 1978., p. 286.

**Vernau, K.M., Osofsky, A., LeCouteur, R.A.** (2007). The Neurological Examination and Lesion Localization in the Companion Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Vet. Clin. North Am. Exotic Animal Pract.* 10, 731-758.

**Visek, W.J., Whitney, I.B., Kuhn, U.S.C., Comar, C.L.** (1953). Metabolism of Cr51 by animals as influenced by chemical state. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 84, 610-615.

**Walter, L.R., Marel, E., Harbury, R., Wearne, J.** (2008). Distribution of chromium and cobalt ions in various blood fractions after resurfacing hip arthroplasty. *J. Arthropl.* 23, 814-821.

**Wang, G., Harra, T.K., Mitra, S., Lee, H.M., Englander, E.W.** (2000). Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl<sub>2</sub> in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic Acids Res.* 28, 2135–2140.

**Wang, L., Dong, J., Cull, G., Fortune, B., Cioffi, G.A.** (2003). Varicosities of intraretinal ganglion cell axons in human and nonhuman primates. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2–9.

**Waxman, S.G.** (1978). Prerequisites for conduction in demyelinated fibers. *Neurol.* 28, 27–33.

- Wehner, A.P., Busch, R.H., Olson, R.J., Craig, D.K.** (1977). Chronic inhalation of cobalt oxide and cigarette smoke by hamsters. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 38, 338-346.
- Wild, P., Perdrix, A., Romazini, S., Moulin, J.J., Pellet, F.** (2000). Lung cancer mortality in a site producing hard metals. *Occup. Environ. Med.* 57, 568-573.
- Wojciech, B., Christodoulou, J., Sadler, P.J., Tucker, A.** (1998). Multi-metal binding site of serum albumin. *J. Inorg. Biochem.* 70, 33-39.
- Yamagata, N., Murata, S., Torii, T.** (1962). The cobalt content of human body. *J. Radiat. Res.* 5, 4-8.
- Yang, S.J., Pyen, J., Lee, I., Lee, H., Kim, Y., Kim, T.** (2004). Cobalt chloride induced apoptosis and extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 activation in rat C6 glioma cells. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37, 480–486.
- Yu, D.Y., Cringle, S.J.** (2001). Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularized and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.* 20, 175–208.
- Yukawa, M., Amano, K., Suzuki-Yasumoto, M., Terai, M.** (1980). Distribution of trace elements in the human body determined by neutron activation analysis. *Arch. Environ. Health.* 35, 36-44.
- Yu-Wai-Man, P., Chinnery, P.F., Griffiths, P.G.** (2005). Optic neuropathies- importance of spatial distribution of mitochondria as well as function. *Med. Hypotheses.* 65, 1038–1042.
- Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Martinuzzi, A., Carelli, V., Rugolo, M.** (2005). Caspase-independent death of Leber's hereditary optic neuropathy hybrids is driven by energetic failure and mediated by AIF and endonuclease G. *Apoptosis.* 10, 997–1007.
- Zhang, C., Cai, W., Li, Y., Su, H.C.** (1998). Quantitative analysis of calcitonin gene-related peptide- and neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers in mesenteric blood vessels of rats irradiated with cobalt-60 gamma rays. *Radiat. Res.* 149, 19-26.

**Zou, W., Yan, M., Xu, W., Huo, H., Sun, L., Zheng, Z., Liu, X.** (2001). Cobalt chloride induces PC12 cells apoptosis through reactive oxygen species and accompanied by AP-1 activation. *J. Neurosci. Res.* 64, 646–653.

**Zou, W., Zeng, J., Zhuo, M., Xu, W., Sun, L., Wang, J., Liu, X.** (2002). Involvement of caspase-3 and p38 mitogen-activated protein kinase in cobalt chloride-induced apoptosis in PC12 cells. *J. Neurosci. Res.* 67, 837–843.