

***Alma Mater Studiorum - Università di Bologna***

---

Facoltà di Medicina Veterinaria  
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria  
e Patologia Animale  
Servizio di Anatomia Patologica

Dottorato di Ricerca in

**Discipline Anatomoistopatologiche Veterinarie**

VET/03 PATOLOGIA GENERALE E ANATOMIA PATOLOGICA VETERINARIA

XIX ciclo

**ANIMALI TERRESTRI COME INDICATORI  
BIOLOGICI DEI VARI ECOSISTEMI IN  
RELAZIONE ALLA SALUTE UMANA**

*Tesi di dottorato della Dott.ssa Flavia Merendi*

Docente Guida:  
Chiar.mo Prof.  
Paolo Simoni

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof.  
Paolo Stefano Marcato

---

Anno Accademico 2005-2006

---

***Alma Mater Studiorum - Università di Bologna***

Facoltà di Medicina Veterinaria

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria

e Patologia Animale

Servizio di Anatomia Patologica

Dottorato di Ricerca in

**Discipline Anatomoistopatologiche Veterinarie**

VET/03 PATOLOGIA GENERALE E ANATOMIA PATOLOGICA VETERINARIA

XIX ciclo

**ANIMALI TERRESTRI COME INDICATORI  
BIOLOGICI DEI VARI ECOSISTEMI IN  
RELAZIONE ALLA SALUTE UMANA**

*Tesi di dottorato della Dott.ssa Flavia Merendi*

Docente Guida:  
Chiar.mo Prof.  
Paolo Simoni

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof.  
Paolo Stefano Marcato

**Anno Accademico 2005-2006**

# INDICE

INDICE .....	1
INTRODUZIONE .....	5
1. STRUTTURA DEI SISTEMI NATURALI: CATENE ALIMENTARI E RETI TROFICHE.....	7
1.1 Gli indici biotici .....	8
2. SISTEMA SENTINELLA ANIMALE .....	11
2.1 Vantaggi e limiti dei sistema sentinella .....	15
3. CENNI SUI CONTAMINANTI AMBIENTALI.....	18
4. POPs: GLI INQUINANTI ORGANICI PERSISTENTI.....	20
4.1 Organoclorurati .....	22
4.1.1 Comportamento cinetico.....	24
4.1.2 Meccanismo d'azione .....	25
4.1.3 Tossicità .....	26
4.2 Policlorobifenili .....	30
4.2.1 Comportamento cinetico.....	31
4.2.2 Meccanismo d'azione .....	33
4.2.3 Tossicità .....	35
5. METALLI PESANTI .....	38
5.1 Arsenico .....	41
5.1.1 Meccanismo d'azione .....	43
5.1.2 Aspetti tossicologici.....	43
5.1.3 Tossicità acuta.....	45
5.1.4 Tossicità a lungo termine .....	46
5.1.5 Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi .....	47
5.1.6 Effetti mutageni .....	48
5.1.7 Effetti cancerogeni .....	49
5.1.8 Effetti immunodepressivi.....	50
5.1.9 Impatto ambientale .....	51
5.2 Cadmio.....	55
5.2.1 Meccanismo d'azione .....	56
5.1.2 Aspetti tossicologici.....	58
5.1.3 Tossicità acuta.....	59
5.1.4 Tossicità a lungo termine .....	60
5.1.5 Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi .....	62
5.1.6 Effetti mutageni .....	65
5.1.7 Effetti cancerogeni .....	66
5.1.8 Effetti immunodepressivi.....	68
5.1.9 Impatto ambientale .....	69
5.3 Cromo .....	73
5.3.1 Meccanismo d'azione ed attività biologica .....	74
5.3.2 Aspetti tossicologici.....	75
5.3.3 Tossicità acuta.....	76
5.3.4 Tossicità a lungo termine .....	77
5.3.5 Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi .....	78
5.3.6 Effetti mutageni .....	79

5.3.7 Effetti cancerogeni .....	80
5.3.8 Effetti immunodepressivi .....	80
5.3.9 Impatto ambientale .....	81
5.4 Ferro .....	83
5.4.1 Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico .....	84
5.4.2 Aspetti tossicologici .....	86
5.4.3 Tossicità acuta .....	87
5.4.4 Tossicità a lungo termine .....	87
5.4.5 Effetti cancerogeni .....	88
5.4.6 Effetti immunodepressivi .....	88
5.4.7 Impatto ambientale .....	89
5.5 Mercurio .....	90
5.5.1 Meccanismo d'azione .....	92
5.5.2 Aspetti tossicologici .....	92
5.5.3 Tossicità acuta .....	92
5.5.4 Tossicità a lungo termine .....	93
5.5.6 Impatto ambientale .....	94
5.6 Piombo .....	96
5.6.1 Meccanismo d'azione .....	97
5.6.2 Aspetti tossicologici .....	99
5.6.3 Tossicità acuta .....	100
5.6.4 Tossicità a lungo termine .....	100
5.6.5 Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi .....	102
5.6.6 Effetti mutageni .....	104
5.6.7 Effetti cancerogeni .....	104
5.6.8 Effetti immunodepressivi .....	106
5.6.9 Impatto ambientale .....	107
5.7 Rame .....	109
5.7.1 Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico .....	109
5.7.2 Aspetti Tossicologici .....	111
5.7.3 Tossicità acuta .....	112
5.7.4 Tossicità a lungo termine .....	112
5.7.5 Effetti cancerogeni .....	113
5.7.6 Impatto ambientale .....	113
5.8 Selenio .....	114
5.8.1 Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico .....	115
5.8.2 Aspetti tossicologici .....	116
5.8.3 Tossicità acuta .....	117
5.8.4 Tossicità a lungo termine .....	118
5.8.5 Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi .....	119
5.8.6 Effetti cancerogenici e anti-carcinogenici .....	119
5.8.7 Effetti immunodepressivi .....	120
5.8.8 Impatto ambientale .....	121
5.9 Zinco .....	123
5.9.1 Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico .....	123
5.9.2 Aspetti tossicologici .....	126
5.9.3 Tossicità acuta .....	127
5.9.4 Tossicità a lungo termine .....	128

5.9.5 Tossicità sulla funzione riproduttiva e teratogenesi .....	128
5.9.6 Effetti mutageni .....	129
5.9.7 Effetti cancerogeni.....	131
5.9.8 Effetti immunodepressivi.....	131
5.9.9 Impatto ambientale .....	132
CONTRIBUTO ORIGINALE.....	133
INTRODUZIONE .....	133
6. IL CINGHIALE – QUALE MONITOR AMBIENTALE.....	135
7. IL PICCIONE – QUALE MONITOR AMBIENTALE.....	149
8. LA CARETTA CARETTA – COME MONITOR AMBIENTALE.....	163
9. GERMANO REALE – VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ DI DIFFERENTI TIPOLOGIE DI PALLINI DA CACCIA.....	177
11. LARVE <i>XENOPUS LAEVIS</i> – VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA DEI RITARDANTI DI FIAMMA BROMURATI (PBDES) .....	195
CONCLUSIONE COMPLESSIVA .....	199
BIBLIOGRAFIA .....	201



## INTRODUZIONE

Le specie selvatiche e sintropiche possono essere prese in considerazione non solo per le patologie che manifestano ed assumere quindi un notevole interesse in campo naturalistico per il mantenimento della biodiversità ed in campo veterinario per la possibilità che si instaurino fenomeni di tipo zoonosico, ma anche per ciò che possono rivelare sulla qualità dell'ambiente nel quale esse vivono.

È, quindi, opportuno indagare alcuni parametri che possono essere assunti, come validi indicatori (metalli pesanti: Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb Zn e metalloidi: As, Se).

I metalli pesanti come Pb, Cu, Fe, Zn, Cd, e Cr sono sostanze inquinanti presenti nell'ambiente in concentrazioni talvolta elevate in ragione soprattutto del loro impiego industriale; dotati di scarsa reattività chimica e biologica, tendono ad accumularsi nei tessuti degli organismi animali e raggiungere livelli tissutali elevati successivamente alla loro assunzione tramite l'aria, l'acqua e gli alimenti. Questi fenomeni di accumulo, nonostante non siano di così imponente entità come quelli che si osservano per altre sostanze tossiche come, ad esempio, gli insetticidi organoclorurati e i PCBs, possono esitare in risvolti tossicologici di notevole valore clinico e sanitario proprio in quelle specie animali selvatiche in cui avvengono.

Le attività di monitoraggio biologico negli animali selvatici sono di difficile esecuzione a causa di diversi fattori; al di là delle disposizioni legislative relative alla tutela di determinate specie, che

comportano la possibilità di reperimento di esemplari in buono stato di conservazione soltanto presso i centri di recupero della fauna selvatica (C.R.A.S.), si ricordano le abitudini di vita degli animali, le caratteristiche, sia climatiche che pedologiche, dell'ambiente stesso e il frequentissimo rinvenimento di animali deceduti ed in stato avanzato di decomposizione, condizione, questa, che impedisce qualsiasi intervento.

L'attuazione di queste opere di monitoraggio consente il reperimento di dati importanti, ad esempio, ai fini dell'individuazione delle cause di estinzione o caduta demografica di determinate specie animali. E' altresì utile per avere informazioni sul grado di inquinazione ambientale di zone definite e per escogitare misure atte a impedire l'insorgenza o la propagazione di eventi tossici qualora i livelli ambientali superino le soglie di allarme, in particolare in quelle specie, sia selvatiche che domestiche, caratterizzate da una maggiore sensibilità.

# **1. STRUTTURA DEI SISTEMI NATURALI: CATENE ALIMENTARI E RETI TROFICHE.**

Gli organismi viventi possono essere classificati – in base al loro metabolismo e al modo in cui si approvvigionano dell'energia necessaria alla loro sopravvivenza – in autotrofi ed eterotrofi e successivamente possono essere inseriti all'interno di catene alimentari, costituite da vari livelli od anelli che possiamo così esemplificare:

- primo livello: livello dei produttori (organismi autotrofi);
- secondo livello: livello dei consumatori primari (si nutrono degli organismi del primo livello);
- terzo livello: livello dei consumatori secondari.

Nulla vieta, comunque, che ci siano altri anelli successivi nella catena (Cairns e Pratt, 1993).

L'incasellamento degli organismi all'interno della catena alimentare, se da un punto di vista didattico è molto utile, da quello della realtà ecologica è molto semplicistico. Il modello più complesso che prende in considerazione tutte le possibili interconnessioni trofiche tra le specie è rappresentato dal termine di "rete trofica". La "rete trofica" esprime appunto l'intersecarsi delle funzioni trofiche all'interno di un'ecosistema (Miller, 1994).

Quando gli ecosistemi naturali vengono sottoposti a perturbazioni esterne, come quelle provocate da molte attività umane, si ha un'alterazione momentanea o permanente della loro funzionalità. Di fronte ad una perturbazione quale, per esempio, l'introduzione di

una sostanza tossica, l'autoregolazione degli ecosistemi risponde, per quanto possibile, in modo tale da contenere e superare le alterazioni introdotte.

La capacità di resistere ad una alterazione dipende chiaramente dall'intensità e dalla durata dell'alterazione stessa, ma anche dalla capacità di resistenza e di recupero dell'ecosistema.

La stabilità di un ecosistema può essere misurata tramite due grandezze relative:

– la resistenza: intesa come l'intensità dell'alterazione subita da una particolare funzione dell'ecosistema in seguito ad un determinato stress;

– la resilienza: funzione inversa del tempo richiesto da un sistema per recuperare i suoi valori normali (Peters, 1991).

In generale, gli ecosistemi con resistenza e resilienza basse, sono maggiormente esposti agli effetti negativi causati dalle perturbazioni esterne. Questo può essere un criterio per tenere sotto osservazione gli ambienti più fragili e per valutare l'entità dei possibili effetti di una sostanza tossica (Begon *et al.*, 1996).

## **1.1 Gli indici biotici**

Le discipline ambientali, a causa della complessità degli ecosistemi, si avvalgono di numerosi tipi di indicatori che, essenzialmente si possono classificare in due grandi classi: quelli biologici e quelli abiologici.

I fondamenti su cui si basa la scienza della bioindicazione presuppongono che le condizioni di un ecosistema possano essere valutate mediante i parametri propri delle comunità biotica (o delle

sue componenti) residenti in quello stesso ecosistema (Sheehan *et al.*, 1984).

Questi studi forniscono dunque informazioni significative non ricavabili altrimenti e permettono sia di rilevare direttamente sugli organismi gli effetti degli stress ambientali, sia di quantificare la capacità di ricezione dell'ambiente (dato importante nelle strategie della protezione ambientale), sia di mettere in evidenza eventuali effetti sinergici in miscele di sostanze e le interazioni che possono esistere tra un tossico e i parametri chimico-fisici dell'ambiente (Markret, 1993; Essink e Romeyn, 1994).

Per "bioindicatori" si intendono tutti quegli organismi (o parte di essi) che mediante reazioni identificabili (chimiche, biochimiche, fisiologiche o morfologiche) forniscono indicazioni sulla qualità dell'ambiente, mentre con il termine di "bioaccumulatori" ci si riferisce a quelli che assimilano quantità misurabili di elementi chimici e/o di composti xenobiotici (Connel, 1990; Schwaezenbach *et al.*, 1993).

I bioaccumulatori vengono scelti tra le specie in grado di assumere e tollerare elevate concentrazioni degli inquinanti, per dare informazioni quantitative sull'inquinamento ambientale; la scelta dei bioindicatori, invece, si basa sulla sensibilità degli organismi e consente valutazioni qualitative sugli effetti dell'inquinamento (Suedel *et al.*, 1994).

Per poter definire un organismo come bioaccumulatore o bioindicatore, (oltre alla sua accertata capacità di accumulare i contaminanti persistenti o di mostrare verso questi specifiche reazioni) dobbiamo possedere un'adeguata conoscenza dell'anatomia, fisiologia ed ecologia della specie, in quanto le

"nicchie ecologiche" delle varie specie tendono a differenziarsi, producendo così, nello stesso ambiente, diversi modi e livelli di esposizione ai contaminanti.

La posizione di un organismo nella catena alimentare è importante: infatti lungo questa si possono verificare per alcune sostanze fenomeni di biomagnificazione, che ne determinano la presenza in concentrazioni maggiori ai vertici delle diverse catene alimentari (Suedel *et al.*, 1994).

Il tipo di dieta è importante poiché con essa possono essere introdotte diverse quantità di contaminanti; è perciò fondamentale considerare non solo il posto che un organismo occupa nel suo ecosistema, ma anche, a parità di importanza, di quali specie si nutre.

Per esemplificare si può riportare uno studio in cui vennero analizzate 45 specie di uccelli selvatici e 22 specie di mammiferi, provenienti da un'area svedese contaminata, al fine di trovare la specie più idonea ad essere definita come bioindicatrice per il cadmio. Si registrarono concentrazioni maggiori negli animali erbivori, e ciò fu spiegato attribuendo importanza alla primaria e abbondante assunzione del metallo dal suolo da parte delle piante. (Frank, 1986).

Per quanto riguarda le modalità di esposizione, gli organismi si possono differenziare in bioconcentratori, bioaccumulatori e biomagnificatori.

I primi sono quelli in cui si notano fenomeni di arricchimento del tossico attraverso la sola via respiratoria, i secondi quelli che usufruiscono di tutte le vie possibili (respirazione, contatto, ingestione), mentre nei biomagnificatori si osservano livelli di

arricchimento crescenti passando dalla preda al predatore.

Gli organismi che presentano concentrazioni o effetti correlati con l'inquinamento (o di altri parametri ambientali) e che permettono dunque di eseguire biomonitoraggi, vengono indicati in generale come biomonitors (Vighi e Bacci, 1998).

## **2. SISTEMA SENTINELLA ANIMALE**

In condizioni appropriate l'uso degli animali domestici o selvatici può contribuire a identificare l'entità di un'esposizione a contaminanti noti, o svelare la presenza nell'ambiente di contaminanti chimici sconosciuti, prima che questi causino danni all'uomo (NRC, 1991).

Sebbene i progressi in termini di conoscenza, accettazione e uso delle specie sentinella per la stima del rischio per l'uomo in sanità pubblica abbiano avuto un lento percorso, negli ultimi anni si è assistito a uno sviluppo dei modelli "animali sentinella".

Nell'1991, il National Research Council (NRC, Animal as Sentinels of Environmental health Hazards e Board on Environmental Studies and Toxicology, Commission on Life Sciences) ha pubblicato un'estesa valutazione su diversi sistemi sentinella animali e sulla loro utilità in rapporto a diversi contaminanti presenti nell'ambiente e dei relativi rischi per la salute dell'uomo.

Come l'uomo, gli animali domestici o selvatici e i pesci sono esposti agli stessi contaminanti presenti nell'aria, nel suolo, nell'acqua e nel

cibo a cui è esposto l'uomo e come tali presentare effetti acuti e cronici conseguenti all'esposizione (Fig 1).

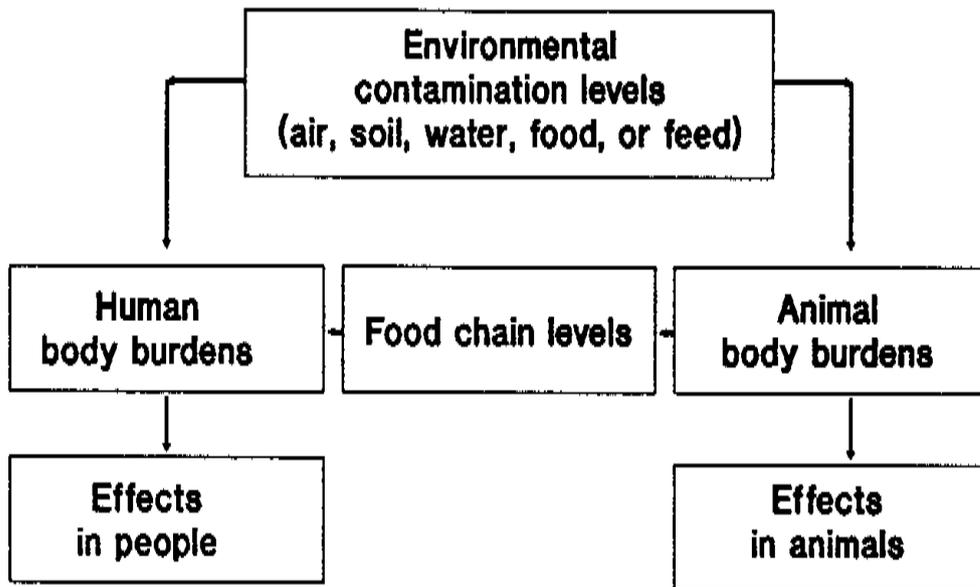


Fig. 1: Tratto dal NRC, 1991.

La popolazione animale utilizzata per regolamentare e monitorare l'ambiente viene definita "sistema sentinella animale" (SSA) e attraverso la raccolta e l'analisi di campioni offre l'identificazione di una ampia varietà di inquinanti ambientali pericolosi per la salute dell'uomo, per le diverse specie animali e per gli ecosistemi.

Il sistema sentinella può essere considerato un sistema chiuso, dove diverse caratteristiche possono essere selezionate (ad esempio la specie animale, la fonte di esposizione, la via per la quale gli effetti si manifestano e sono misurabili).

Una specie animale per essere considerata "sentinella" deve dare una risposta ad determinato agente o ad una classe di agenti, essere riferibile ad un determinato territorio e in ogni caso appartenere al territorio da monitorare.

Una specie sentinella può essere in stretta relazione con la fonte di esposizione. Animali come lombrichi, insetti terricoli, talpe, e arvicole sono strettamente legati al suolo. Nel caso dell'ambiente aereo nessun animale che vive sottoterra può essere preso in considerazione per monitorare l'inquinamento ad esso legato, specialmente se sono di grosse dimensioni o mobili e comunque tali da essere indipendenti dalla vegetazione filtrante. In questo contesto l'ape domestica è un eccellente monitor di inquinamento aereo (Faccin *et al.*, 2004). Un altro esempio è l'uso di piccioni che sono animali stanziali (Schilderman *et al.*, 1997; Nam e Lee, 2006). Gli animali erbivori risultano un valido modello come sentinelle dell'inquinamento delle piante. Le specie usate potrebbero dipendere da specifiche piante o da un pool di piante in relazione al tipo di dieta dell'animale in questione (ad esempio il panda che si ciba di solo bamboo o il koala di eucalipto).

Gli organismi acquatici sono i migliori monitor dell'inquinamento dell'acqua. Le prove biologiche in situ con pesci "ingabbiati" sono state utilizzate per molti anni per determinare la presenza di "sostanze chimiche" nei laghi e lungo i corsi d'acqua. I bivalvi come mitili e ostriche accumulano molte sostanze chimiche a concentrazione molte elevate rispetto a quelle presenti nell'ambiente in cui vivono. Da anni esiste un programma di monitoraggio delle acque condotto dal NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration) che tramite i molluschi monitorizza le acque soprattutto in vicinanza di scarichi urbani e industriali allo scopo di controllare le emissioni di sostanze chimiche tossiche rispetto ai limiti accettabili (NRC, 1991).

Oltre agli animali strettamente acquatici sono risultati idonei animali terrestri che in qualche modo possono usufruire di acqua come risorsa di cibo o habitat come ad esempio gabbiani, anatre, foche, rettili e anfibi (Alleva *et al.*, 2006).

Gli animali domestici come cane e gatto in relazione all'habitat dell'uomo, risultano degli idonei indicatori di inquinamento. Infatti questi sono esposti agli stessi inquinanti a cui si espone l'uomo. È da aggiungere che questi, soprattutto il gatto per le sue abitudini di vita (leccamento del pelo) risultano essere più esposti e accumulano maggiormente i contaminanti come ad esempio il piombo. I felini dei parchi-zoo sono dei buoni indicatori di inquinamento urbano e in particolare del piombo (NRC, 1991).

Un'ulteriore indice di scelta della specie animale come sentinella è la durata dello studio di monitoraggio che risulta essere influenzata da alcuni fattori. Il grado di tossicità atteso, la durata di esposizione al contaminante, la possibilità di raccolta di fluidi biologici e/o materiali biologici, la durata della vita e la capacità riproduttiva delle specie sentinella risultano essere solo alcuni dei fattori che rendono idonea una specie animale a discapito di un'altra (NRC, 1991).

Un sistema sentinella può essere usato per monitorare il livello di inquinamento e la sua distribuzione nell'ambiente. L'utilità di un sistema biologico è quella di permettere di accoppiare le misure di esposizione con una varietà di effetti sub-clinici e clinici di conseguenza ottenere una maggiore valutazione del rischio per l'uomo o per la popolazione animale.

Una volta che l'animale (o l'uomo) è stato esposto ad una sostanza chimica ne consegue tutta una serie di risposte biologiche che possono essere rilevate anche in tempi brevi dopo l'esposizione.

Il modo ottimale per valutare alterazioni delle caratteristiche biologiche è senza dubbio la misurazione tramite tecniche sierematologiche. Ciò è facilmente applicabile all'uomo, mentre per le specie animali allo stato libero o semilibero risultano più applicabili valutazioni morfologiche.

In questo contesto il monitoraggio chimico e cellulare può essere relativamente utile per valutare gli effetti tossici a breve termine. Le specie ittiche (pesci e molluschi in genere) e le specie selvatiche (intese come quelle che vivono sulla terra) possono essere monitorate per ottenere misure degli effetti dell'inquinamento ambientale. Inoltre risultano necessarie alcune conoscenze sia delle loro caratteristiche normali che degli agenti di malattia che li possono colpire e in ogni caso le popolazioni degli animali selvatici sono influenzate da fattori naturali interagenti che sono difficili da controllare, così bene come dai contaminanti che sono investigati (NRC, 1991).

## **2.1 Vantaggi e limiti dei sistema sentinella**

La maggior parte degli animali sentinella ha una durata di vita più breve di quella dell'uomo. Di conseguenza, il tempo di latenza-induzione delle loro patologie risulta inferiore rispetto a quello delle forme che si manifestano nell'uomo (De Nardo, 2005). In aggiunta, l'animale deve risultare più sensibile (dell'uomo) agli agenti con cui entra in contatto.

Il traguardo primario di un sistema sentinella è quello di identificare le sostanze o un pool di sostanze dannose presenti nell'ambiente. Un tempo questo avveniva attraverso studi epidemiologici nell'uomo o tossicologici in animali da laboratorio. Va detto, inoltre, che gli

studi condotti su animali da laboratorio sottostanno a condizioni mirate e condizionate (NRC, 1991).

Gli animali manifestano attraverso lo studio “sul campo” (cioè in ambiente non controllato sperimentalmente) effetti biologici e sanitari nonché patologie conosciute, insorte spontaneamente e non evocate in laboratorio. Questo offre un altro tipo di approccio alla stima del rischio per la salute umana al momento dell’insorgere di eventi spontaneamente. Le malattie spontanee, a differenza di quelle indotte sperimentalmente negli animali da laboratorio, riflettono, infatti, una naturale esposizione ad una ampia varietà di cancerogeni ambientali, agenti infettivi, o farmaci, e molti tumori manifestano interessanti similitudini (anatomo-istopatologiche ed epidemiologiche) con i tumori negli uomini (De Nardo, 2003).

Agli animali “sentinella”, quindi, viene riconosciuta una particolare utilità in tutte quelle circostanze in cui le procedure convenzionali sono ricche di incertezze, ovvero nelle valutazioni dell’azione di sostanze chimiche complesse, quando la biodisponibilità delle sostanze è incerta o gli agenti in questione sono scarsamente caratterizzati. L’utilizzazione dei sistemi sentinella animali può avere diversi scopi:

- evidenziare contaminanti ambientali;
- monitorare la contaminazione durante le diverse fasi della catena alimentare;
- investigare la biodisponibilità dei contaminanti nei molteplici distretti ambientali;
- facilitare la stima di un rischio derivante da una esposizione.

Gli animali possono monitorare ogni tipo di ambiente: posto di lavoro, abitazioni, ecosistemi sia acquatici che terrestri garantendo un'osservazione dell'ambiente investigato nella sua globalità (NRC, 1991).

Considerando l'evidenza degli effetti tossici sugli animali sentinella alcune delle incertezze nel predire i rischi per l'uomo potrebbero essere diminuite.

Attualmente i dati dei test sugli animali da laboratorio costituiscono la componente principale per la stima del rischio, in quanto le informazioni cliniche ed epidemiologiche provenienti dai soggetti umani risultano frammentarie e non prive di lacune per molte sostanze diffuse nell'ambiente in senso lato, e soprattutto perché vi è un generale orientamento a non assegnare all'epidemiologia il compito di identificare i rischi, ma di assegnarlo alla ricerca tossicologica in vivo ed in vitro.

Mentre, più in generale, si va consolidando il razionale sotteso all'uso degli animali sentinella, nelle esperienze correnti è ormai acquisito come necessità l'inserimento in modo organico e sistematico un punto di osservazione sul fronte animale. I servizi di prevenzione, le agenzie per la protezione dell'ambiente e le diverse strutture sanitarie territoriali, in seguito ad una più aggiornata visione della salute legata all'ambiente, sollecitano sempre più la comunità scientifica ad approfondire le conoscenze dei diversi comparti ambientali da far confluire in un tentativo di valutazione organico (De Nardo, 2003).

In conclusione, un'ideale specie "sentinella" per la stima del rischio è quella esposta a contaminanti chimici negli habitat che condivide con l'uomo o comparabili con l'habitat dell'uomo e alle medesime

concentrazioni. Inoltre, esso sarà capace di rispondere agli insulti chimici che si manifestano con un ampio spettro di condizioni patologiche, includenti disfunzioni comportamentali e riproduttive, alterazioni immunologiche e biochimiche e alterazioni anatomiche come difetti congeniti e tumorali (NRC, 1991; De Nardo, 2005).

### **3. CENNI SUI CONTAMINANTI AMBIENTALI**

Con il termine inquinamento ci si riferisce ad un'alterazione di una caratteristica ambientale causata, in particolare, da attività antropica. Il termine è quanto mai generico e comprende molti tipi di inquinamento, il suo uso, inoltre, non è legato al solo inquinamento ambientale.

Generalmente si parla di inquinamento quando l'alterazione ambientale compromette l'ecosistema danneggiando una o più forme di vita. Allo stesso modo si considerano atti di inquinamento quelli commessi dall'uomo, ma non quelli naturali (emissioni gassose naturali, ceneri vulcaniche, aumento della salinità).

Quando si parla di sostanze inquinanti solitamente ci si riferisce a prodotti della lavorazione industriale (o dell'agricoltura industriale); tuttavia è bene ricordare che anche sostanze apparentemente innocue possono compromettere seriamente un ecosistema: per esempio versamento di latte o sale in uno stagno. Inoltre, gli inquinanti possono essere sostanze presenti in natura e non frutto dell'azione umana. Infine, ciò che è velenoso per una specie può

essere vitale per un'altra: le prime forme di vita immisero nell'atmosfera grandi quantità di ossigeno come prodotto di scarto, elemento che, se in eccesso può risultare tossico per molte specie animali e vegetali.

Una forte presa di coscienza sui problemi causati dall'inquinamento industriali (ed in particolare dai cancerogeni) è avvenuta nel mondo occidentale a partire dagli anni settanta. Già negli anni precedenti, tuttavia, si erano manifestate preoccupazioni per la salute legati allo sviluppo industriale.

Molte classi di sostanze chimiche potenzialmente tossiche sono presenti nell'ambiente. Alcuni agenti chimici, come ad esempio pesticidi e policlorobifenili (PCBs), sono composti che, attraverso il loro impiego, possono diventare dei contaminanti ambientali.

Altre sostanze (inorganiche) quali i metalli pesanti, in alcuni siti, possono ritrovarsi come componente naturale dell'ambiente, mentre in altri essere artificialmente immessi.

## **4. POPs: GLI INQUINANTI ORGANICI PERSISTENTI**

I più noti e studiati tra i contaminanti globali sono prevalentemente composti organoclorurati come i policlorobifenili ed i pesticidi clorurati (DDT, lindano, lordano).

A partire dai primi anni '70 sono stati attivati molti interventi di controllo su questi composti; ciò nonostante i POP destano preoccupazioni rilevanti, in quanto molti di questi vengono ancora largamente usati nei paesi in via di sviluppo. Inoltre la persistenza di questi composti, ed in alcuni casi la formazione di prodotti di degradazione altrettanto nocivi e persistenti, è tale da comportare problemi per tempi molto lunghi anche dopo la loro eliminazione.

E' difficile reperire dati sicuri sulle quantità di questi contaminanti scaricate annualmente nell'ambiente, soprattutto perché, essendo sostanze attualmente usate in paesi economicamente e tecnologicamente arretrati, risulta quasi impossibile ottenere informazioni attendibili.

L'aspetto più allarmante che riguarda i contaminanti persistenti è la loro possibilità di essere trasportati attraverso l'atmosfera in luoghi lontani anche migliaia di chilometri dalle sorgenti di emissione. Questo processo, denominato "Long Range Transport", è la principale causa della cosiddetta contaminazione globale (Kurts, 1990).

I contaminanti organici persistenti si muovono tutti in direzione delle zone fredde secondo meccanismi simili che dipendono da processi

ambientali di trasporto e dalle proprietà chimico-fisiche delle sostanze.

In generale i POP presentano una volatilità tale da produrre più o meno rapidi cicli di evaporazione e deposizione tra l'aria e gli altri comparti ambientali (suolo, acqua). Le temperature elevate delle zone tropicali e subtropicali favoriscono i processi di evaporazione, immettendo le sostanze in un flusso di trasporto atmosferico su vasta scala. Al contrario, le temperature fredde delle alte latitudini favoriscono i processi di deposizione (effetto del "condensatore freddo").

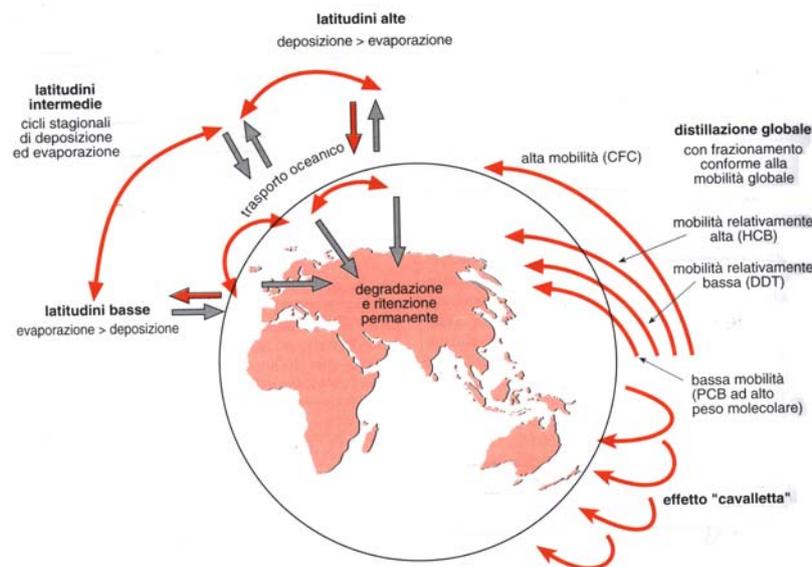
L'alternarsi di tali evaporazioni e successive deposizioni da luogo all'effetto "cavalletta", per cui lo spostamento dei contaminanti verso le zone fredde si compone di una serie di "salti", la cui ampiezza sarà funzione delle proprietà partitive della sostanza (Shearer, 1994; Wania e Mackay, 1996).

E' ovvio che la distanza che può essere raggiunta dal contaminante a partire dal luogo di emissione è funzione anche della sua mobilità. Tuttavia composti relativamente poco mobili possono comunque distribuirsi a livello globale a patto che il tempo di permanenza nel sistema ambientale sia sufficientemente lungo in rapporto alla velocità di trasporto.

I meccanismi grazie a cui i POP possono scomparire dal sistema ambientale sono essenzialmente di due tipi: fenomeni di degradazione e fenomeni di ritenzione permanente in alcuni comparti ambientali.

Il primo meccanismo può aver luogo sia sulla superficie terrestre (acqua, suolo, biota), sia nell'atmosfera, ma è comunque di entità piuttosto limitata.

Per quanto riguarda il sequestro, questo avviene in comparti praticamente immobili e con ridotta possibilità di scambio con altri settori ambientali, come ad esempio nei sedimenti oceanici. In termini generali l'entità di questo sequestro e funzione diretta della idrofobicità e funzione inversa della volatilità delle molecole (Wania e Mackay, 1996).



**Fig. 2:** Schema dei principali meccanismi di trasporto e destino globale dei contaminanti organici persistenti (da Wania e MacKay 1996, modificata).

#### 4.1 Organoclorurati

Gli insetticidi organoclorurati sono stati impiegati in modo veramente massiccio a partire dalla metà degli anni '40 fino alla metà degli anni '60 per il controllo degli insetti sia in ambiente agricolo che

domestico, e ancora oggi nessun altro tipo di pesticida è stato usato in così vasta scala a livello mondiale.

Un così largo utilizzo è comprensibile considerando la varietà di invertebrati sensibili alla loro tossicità, come zanzare (il DDT ha contribuito notevolmente nell'eradicatione della malaria), mosche, pulci, pidocchi, zecche, tarme e tutti i parassiti agricoli.

In seguito, a causa dello sviluppo di forme di resistenza negli organismi target e delle acquisizioni scientifiche riguardo la loro tossicità e potenzialità in materia di degrado ecologico, il loro uso ha subito un forte decremento ed alcuni composti sono stati addirittura dichiarati illegali.

In base alla struttura chimica i composti organoclorurati possono essere classificati in tre categorie:

DDT e suoi analoghi:	DDT Dicfol Perthane (1,1-dicloro-2,2-bis-etano) Prelan (1,1-bis-2-nitro-propano) Bulan (1,1-bis-2-nitro-butano) Clorfenetol Clorobenzilato Cloropropilato Bromopropilato Metossicloro TDE
Ciclodieni e derivati:	Aldrin Dieldrin Clordano Endrin Eptacloro Endosulfan
Idrocarburi clorurati:	Alfa-BHC Lindano ( gamma-BHC) Clordecane Mirex

#### **4.1.1 Comportamento cinetico**

L'entrata del tossico nell'organismo può avvenire per via respiratoria, percutanea e per ingestione. In tutti i casi l'assorbimento è rapido e pressoché completo in virtù dell'alta lipofilia di questi composti.

Nel sangue gli organoclorurati si trovano legati alla frazione lipoproteica del siero. Le loro concentrazioni a questo livello, in caso di esposizioni protratte, crescono costantemente fino al raggiungimento di un plateau che rappresenta una situazione di equilibrio dinamico tra quantità assorbita, quantità metabolizzata ed escreta e quantità accumulata negli organi di elezione.

I tessuti, sede di accumulo degli organoclorurati sono quelli caratterizzati da un più alto contenuto lipidico, primi tra tutti i depositi adiposi, ed in seguito fegato e tessuto nervoso.

Il sequestro del tossico nei grassi di deposito non va comunque visto come meccanismo di difesa efficace in quanto, a seguito di qualsiasi situazione stressante che determini un più o meno rapido dimagrimento, assistiamo alla mobilitazione di queste quote residuali con insorgenza di quadri sintomatologici acuti che invece, sono difficili da osservare in seguito ad una sola esposizione (Booth e McDonald, 1982).

Nell'organismo questi composti vengono metabolizzati, con velocità diverse a seconda del tipo di molecola in questione, attraverso molteplici reazioni chimiche tutte per lo più catalizzate dal complesso della monoossigenasi a funzione mista.

La via di eliminazione più importante è quella biliare, seguita in ordine dalla urinaria e dalla cutanea. Nei 3-4 giorni dopo la

somministrazione si registra l'eliminazione di una quota pari al 40-50% della dose assunta. Lo smaltimento della restante parte può durare mesi o anni in dipendenza del composto, della specie animale e delle condizioni fisiologiche dell'individuo.

#### **4.1.2 Meccanismo d'azione**

Tutti gli insetticidi organoclorurati esplicano la loro principale azione tossica a livello del sistema nervoso centrale.

La loro neurotossicità sembra essere dovuta ad alterazioni degli scambi ionici della membrana assonica. In particolare si assiste ad un ritardo nella chiusura dei canali del sodio e ad una diminuzione dell'uscita di potassio, circostanze che determinano una riduzione del potenziale di riposo e conseguentemente una diminuzione della soglia di eccitabilità (Booth e Mc Donald, 1982).

Questa azione eccitante si manifesta inizialmente a livello centrale ed in seguito anche a carico dei nervi sensitivi e motori periferici ed è la responsabile dei tremori muscolari e delle fascicolazioni caratteristiche del quadro sintomatologico.

Oltre alle alterazioni negli scambi ionici, gli organoclorurati sono responsabili, sempre a livello encefalico, di un aumento della concentrazione di radicali ammoniacali (Booth e Mc Donald, 1982). Proprio questa anomala concentrazione di radicali ammoniacali è la causa patogenetica delle crisi convulsive, per la cui insorgenza le sole alterazioni ioniche non possono bastare.(Pompa, 1994).

La sintomatologia in corso di avvelenamento da organoclorurati è caratterizzata dall'alternarsi di fasi eccitatorie a fasi di profonda depressione. Queste ultime si verificano quanto, a seguito della loro

prolungata eccitazione, le membrane assoniche si depolarizzano con conseguente blocco nella conduzione dello stimolo nervoso.

La paralisi muscolare che si instaura durante le fasi depressive è la principale causa di morte in questo tipo di avvelenamento.

Alcuni composti della famiglia degli organoclorurati sono responsabili di una diretta sensibilizzazione del miocardio all' azione delle catecolammine, e si dimostrano perciò responsabili di aritmie e fibrillazioni ventricolari.

Oltre all'azione tossica sul sistema nervoso, questi composti hanno capacità di induzione enzimatica a livello della frazione microsomiale degli epatociti con un incremento della produzione degli enzimi stessi.

L'aumentata attività delle monoossigenasi porta ad un abnorme metabolismo di molte sostanze, tra cui anche gli ormoni sessuali quali estrogeni, progestinici e testosterone con conseguenti disturbi sull' attività riproduttiva degli organismi esposti (Fry, 1995).

Le alterazioni riproduttive causate dai clororganici sono dovute anche ad inibizione dell' attività dell' ATP-asi. Ciò determina una limitazione nei trasporti del calcio che si manifesta con un notevole assottigliamento del guscio delle uova (Ghiasuddin e Matsumura, 1979).

#### **4.1.3 Tossicità**

In generale si può affermare che la tossicità dei composti clororganici dipende dal tipo di molecola, dalla forma in cui si presenta il preparato (in soluzioni oleose o in solventi organici risultano essere più pericolosi che in polveri o in sospensioni

acquose), dalla specie animale, dall'età e dello stato di nutrizione dell'individuo.

Le manifestazioni cliniche dell'avvelenamento acuto sono comuni a tutti gli insetticidi clororganici e la comparsa dei primi sintomi avviene in media dopo 4-5 ore (variando da pochi minuti a 24 ore) dall'esposizione ad una singola dose tossica.

La sindrome è di tipo neuromuscolare, preceduta da una fase prodromica in cui gli animali si dimostrano impauriti, ipersensibili ed eccessivamente aggressivi.

In seguito compaiono fascicolazioni, blefarospasmo, tremori e mioclonie continue o intermittenti, disturbi della locomozione ed atteggiamenti posturali insoliti. A questi segni di origine centrale si affiancano quelli dovuti ad una generica stimolazione del sistema nervoso autonomo, con midriasi, aritmie cardiache e intensa secrezione bronchiale.

Segue la fase convulsiva, che procede ad attacchi solitamente di breve durata. Nel caso di un attacco convulsivo molto prolungato si assiste alla comparsa di dispnea e ad un notevole aumento della temperatura rettale. L'aumento della temperatura è dovuto tanto all'intensa attività muscolare, quanto ad una azione diretta del tossico sui centri termoregolatori. Alla fine l'animale entra in una fase comatosa in cui presenta bradicardia o fibrillazione atrio-ventricolare dovuta alla iperpotassiemia. La morte avviene per insufficienza respiratoria.

Quando l'animale riesce a superare la fase critica, si assiste ad una progressiva diminuzione nella frequenza di insorgenza delle crisi, fino alla loro totale scomparsa. A volte, alcuni giorni dopo la guarigione, si può verificare una ricaduta anche mortale,

probabilmente causata dal rilascio nel torrente circolatorio dell'aliquota di tossico che era stata sequestrata dal tessuto adiposo di riserva (Pompa, 1994; Wright e Welbourn, 2002).

Le forme croniche di intossicazione devono essere distinte in base alla loro patogenesi. Qualora siano dovute alla mobilitazione dei tossici trattenuti nei tessuti di deposito conseguentemente a fattori stressanti, si assiste ad una sintomatologia simile a quella acuta, anche se di intensità generalmente inferiore. Questo fenomeno può comunque risultare mortale.

Quando invece l'avvelenamento di tipo cronico evolve in maniera progressiva, la sintomatologia presentata è correlata agli effetti tossici che questi composti esercitano a livello epatico ed i segni riscontrabili (dimagrimento, disappetenza, diminuzione delle produzioni zootecniche) non sono quindi assolutamente patognomoniche (Pompa, 1994; Wright e Welbourn, 2002).

Alla necropsia i fegati degli animali morti per un'intossicazione cronica da organoclorurati si presentano ingrossati, congesti e colpiti da estesi fenomeni degenerativi, ipertrofia degli epatociti, aumento dei depositi lipidici, marginazione dei granuli citoplasmatici ed aumento del reticolo endoplasmatico.

Significative e caratteristiche sono le alterazioni a carico della funzione riproduttiva che si instaurano in seguito ad esposizione a qualunque organoclorurato, anche se sotto questo aspetto risultano essere chiamati maggiormente in causa il DDT ed il suo metabolita DDE (dicloro-difenil-dicloro-etilene). Gli effetti di questi composti si manifestano con un'accentuata sottigliezza del guscio delle uova che porta, come diretta conseguenza, ad una estrema facilità di rottura.

Alcuni studi hanno messo in luce un effetto immunodepressore: per esempio si è notato come nel pulcino la somministrazione orale di 100 ppm di DDT per 40 giorni porti ad una diminuzione del peso degli organi linfoidei, ed in particolar modo della milza, del timo e della borsa di Fabrizio.

Infine può essere interessante rimarcare la differente tossicità che questi composti possono dimostrare in funzione dell'età del soggetto che li assume. Di particolare interesse è l'osservazione che un'esposizione a DDT di 0,5 mg/kg di peso corporeo in cavie di dieci giorni di età determina un incremento nella densità dei recettori muscarinici a livello della corteccia cerebrale, mentre negli adulti la stessa esposizione porta ad una diminuzione nella densità degli stessi recettori.

In pulcini di 30 giorni una dose singola di 50 mg/kg di lindano causa solo una minima perossidazione a carico dei lipidi nel fegato, mentre tali alterazioni risultano essere molto più estese e gravi in pulcini nati solo da 7 giorni (Rivera *et al.*, 1990).

Inoltre, a carico dei più giovani, si può notare anche un'inibizione dell'attività della superossido dismutasi ed un aumento dei livelli di glutazione. Questi effetti non sono stati registrati per le stesse dosi nel gruppo di animali più anziani (Samanta e Chainy, 1997).

## 4.2 Policlorobifenili

I policlorobifenili (PCBs) sono un gruppo di idrocarburi aromatici alogenati che furono sintetizzati per la prima volta nel 1881 e il cui utilizzo a partire dalla fine degli anni '20 è cresciuto molto rapidamente fino ai primi anni '70. Venivano infatti impiegati nell'industria dell'elettricità come isolanti di trasformatori e condensatori; sono stati usati come agenti impermeabilizzanti e nella produzione di inchiostri da stampa, vernici plastiche, saponi, lacche, gomme ed infine come additivi per antiparassitari (Roberts *et al.*, 1978).

Vista l'altissima stabilità, persistenza ambientale e tossicità che caratterizza questi composti, fin dal 1979 in America è stata proibita la loro produzione. Attualmente l'uso dei PCBs è stato vietato anche in Italia, in ottemperanza alla normativa dell'unione Europea predisposta sulla falsa riga di quella statunitense. Tuttavia, ancora oggi, in molti paesi tecnologicamente avanzati si continua a produrli per l'esportazione verso paesi in via di sviluppo dove la normativa è più permissiva o, addirittura, assente.

Fino dagli anni '70 sono stati condotti numerosi studi sulla presenza dei PCBs nell'ecosistema del Mediterraneo. La situazione agli inizi degli anni '90 dava i seguenti valori medi, validi per il mare aperto:

Aria	0,54 ng/m <sup>3</sup>
Acqua	0,1 ng/l
Sedimento	16 ng/g
Pesce (triglia – <i>Mullus barbatus</i> )	68 ng/g peso secco

E' interessante osservare come l'uso dei policlorobifenili non è stato così dispersivo come invece quello dei pesticidi; pertanto il fatto che si riveli ancora una quantità così importante di questi contaminanti indica quanto difficile sia il loro smaltimento e come sia notevole il loro trasporto in fase di vapore a partire da sorgenti lontane, situate nei paesi dove si possono utilizzare legalmente.

I suoli degli ecosistemi terrestri ed i sedimenti di quelli marini si comportano come "serbatoi" di queste sostanze, generando una tale inerzia che anche un immediato blocco su scala mondiale alla loro produzione non sarebbe in grado di modificare lo stato attuale per almeno alcuni decenni.

#### **4.2.1 Comportamento cinetico**

I PCBs sono facilmente assorbiti dagli organismi animali attraverso il tratto intestinale, il sistema respiratorio e la pelle.

In virtù della loro affinità per i lipidi tendono a concentrarsi specialmente nei tessuti adiposi di riserva, nel cervello e nel fegato. Possono comunque raggiungere concentrazioni relativamente alte anche a livello di muscolo, sangue e pelle (NAS, 1979; EPA, 1980-a).

Nell'organismo vengono metabolizzati principalmente in derivati fenolici o diidrodioici, ma la suscettibilità di ogni diverso isomero a tali trasformazioni varia notevolmente in funzione del numero degli atomi di cloro e della loro posizione. I composti con più alto numero di atomi di cloro, sottoponendosi difficilmente alle normali vie metaboliche, tendono ad accumularsi in modo massiccio e persistente (Schmitt *et al.*, 1985).

L'emivita biologica dei PCBs è stata studiata somministrando a ratti diversi composti policlorobifenilici per via endovenosa. Si è così potuto notare che l'emivita epatica presentata dal mono-clorobifenile è di 86 ore; quella del biclorobifenile di 99 ore, 193 ore quella del penta-clorobifenile mentre l'emivita dell'esa-clorobifenile arriva a 1.308 ore (Menzie, 1978).

I composti con basso numero di atomi di cloro, dunque, vengono metabolizzati in modo relativamente rapido ed in seguito sono eliminati con le urine e la bile.

Bisogna comunque evidenziare che i percorsi seguiti per l'assorbimento, la distribuzione, la biotrasformazione e l'eliminazione dei PCBs, oltre che dipendere dalle caratteristiche chimico-fisiche dei diversi isomeri, sono influenzati notevolmente dalla biologia della specie animale in questione (Hansen *et al.*, 1983).

Per questo motivo è impossibile descrivere un protocollo cinetico valido in assoluto.

Di notevole interesse ecotossicologico risulta essere la bioamplificabilità che presentano i policlorobifenili (Rohrer *et al.*, 1982).

Le concentrazioni di PCBs nel fegato degli uccelli ittiofagi sono le più alte (900 mg/kg di peso fresco), seguite da quelle rinvenute nei rapaci (50 mg/kg) e negli insettivori (0,65 mg/kg); gli erbivori, infine, sono gli uccelli che presentano le più basse concentrazioni (0,2 mg/kg) (NAS, 1979).

Da studi condotti in Mediterraneo negli anni recenti si è osservato infatti un notevole salto di concentrazione nel passaggio dai pesci agli animali ittiofagi, quali i mammiferi acquatici o gli uccelli. In questi

ultimi i livelli di PCBs aumentano di ben due ordini di grandezza rispetto a quelli riscontrati nelle loro prede (Marsili *et al.*, 1995). Questo fatto è certamente attribuibile alla posizione occupata nella catena alimentare, ma soprattutto trova la sua giustificazione nel diverso meccanismo di respirazione che esiste tra i predatori in questione (a respirazione aerea) e le loro prede (a respirazione acquatica). Infatti i policlorobifenili, avendo un coefficiente di ripartizione aria/acqua ( $K_{AW}$ ) dell'ordine di  $10^{-2}$ , sono caratterizzati da una trasportabilità in acqua 100 volte superiore a quella che presentano in aria. Per questo motivo la respirazione aerea è meno efficace nei processi di eliminazione dei PCBs e determina lo spostamento dell'equilibrio tra quota assunta e quota eliminata (Iwata *et al.*, 1993).

#### **4.2.2 Meccanismo d'azione**

Come accennato in precedenza i PCBs maggiormente tossici sono quelli che presentano le sostituzioni degli atomi di cloro in posizione "meta" e "para". Per queste molecole esiste un'elevata possibilità di rotazione degli anelli benzenici, di modo che questi anelli si vengono a trovare sullo stesso piano. Si formano così i PCBs "coplanari".

Tre dei, 20 PCBs coplanari possibili rivestono un'importanza tossicologica notevolissima: il 3,3', 4,4' tetraclorobifenile (PCB-77); il 3,3', 4,4', 5 pentaclorobifenile (PCB-126) ed il 3,3', 4,4', 5,5' esaclorobifenile (PCB-169) (Safe e Hutzinger, 1987).

Il motivo della particolare tossicità di questi congeneri va ricercato nella loro capacità di assumere una configurazione molto simile a

quella della diossina, considerata il composto più tossico per gli organismi viventi.

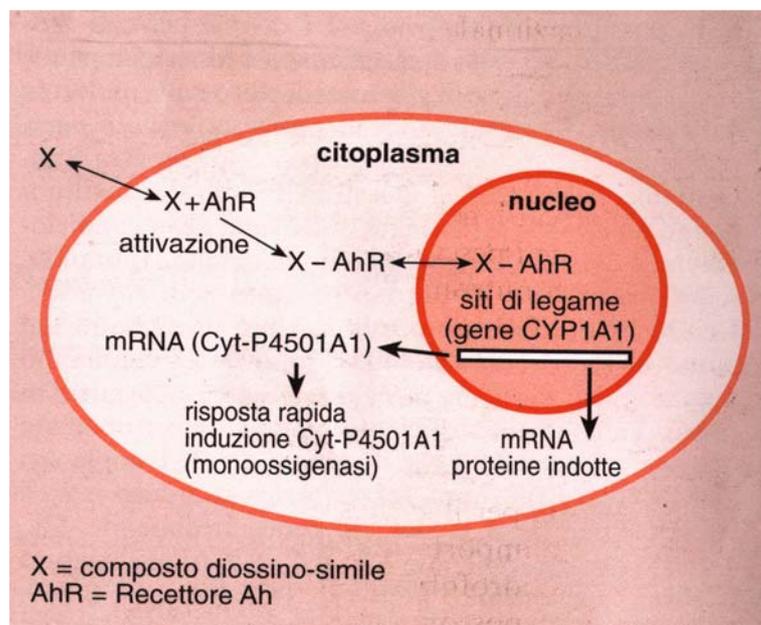
Infatti per similarità sterica, i tre PCBs coplanari sono in grado di reagire con lo stesso recettore citoplasmatico della diossina (Aryl Hydrocarbon Receptor o Ah-R) (Corsolini *et al.*, 1995)

La presenza di uno o due atomi di cloro in posizione “orto” diminuisce il tempo che la molecola può trascorrere nella configurazione planare e quindi la possibilità di legame con il recettore Ah.

Il meccanismo d'azione prevede che il composto tossico entri nella cellula attraverso la membrana plasmatica. Nel citoplasma trova il recettore Ah con il quale forma un complesso di attivazione che può entrare nel nucleo.

Qui i complessi PCB-Ah si accumulano ed interagiscono con sequenze specifiche del DNA (dette Elementi Sensibili alle Diossine o DRE). Tale interazione provoca la produzione di m-RNA per il citocromo P-450 e quindi l'induzione del sistema delle monoossigenasi a funzione mista. Vengono inoltre sintetizzati anche m-RNA per proteine a risposta pleiotropica, responsabili di svariate manifestazioni tossiche (Corsolini *et al.*, 1995)

Nel barbagianni una singola iniezione nel tessuto parenchimale epatico di 30 mg di Aroclor 1254 per chilo di peso corporeo ha fatto registrare un incremento dell'attività del citocromo P-450 (Rinzky e Perry, 1983).



**Fig. 3:** Meccanismo d' azione del recettore Ah (da Wania e MacKay1996, modificata).

Oltre che a ciò, la tossicità dei composti policlorobifenilici è ascrivibile anche ad interazioni con il turn-over di calcio, zinco e selenio, ad alterazioni nell'utilizzo della vitamina A e ad anomalie nel metabolismo dei pigmenti respiratori.

#### 4.2.3 Tossicità

I sintomi da avvelenamento acuto nelle specie aviarie comprendono elevata morbilità, incoordinazione muscolare, tremori (inizialmente intermittenti, poi continui) ed atteggiamenti posturali anomali (Stickel *et al.*, 1984). Alla microscopia il fegato appare colpito da emorragie focali, mentre l'intestino si presenta pieno di materiale semi-liquido nerastro.

La forma di intossicazione cronica si presenta con maggior frequenza rispetto alla acuta, ed è caratterizzata da calo delle difese immunitarie, diminuzione della crescita, dimagrimento e problemi nella riproduzione (Stickel *et al.*, 1984). In particolare quest' ultimo aspetto è dovuto ad una diminuzione dello spessore dei gusci delle uova (con conseguente maggior facilità di rottura e di minor schiudibilità). Ad esempio nell'aquila reale si è registrato una correlazione inversa tra spessore del guscio e concentrazione di PCBs (Wiemeyer *et al.*, 1984).

Colombi nutriti con diete contenenti 10 ppm di Aroclor 1254 per tre mesi hanno presentato nel tessuto adiposo residui pari a 736 ppm, mentre nelle loro uova si sono registrati livelli di 16 ppm di peso fresco (Tori e Poterle, 1983). La schiudibilità di queste uova non ha mostrato grandi variazioni durante la prima covata, mentre nella seconda deposizione, avvenuta sei mesi dopo, si è ridotta del 10% rispetto ai controlli (Heinz *et al.*, 1984).

Oltre che alla diminuita schiudibilità, i problemi riproduttivi comprendono anche anomalie comportamentali. Si è notato che il tempo di corteggiamento risulta notevolmente aumentato in piccioni esposti in maniera cronica a 10 ppm di PCBs nella dieta, e che solo il 50% delle coppie, finita la fase del corteggiamento, si dedica alla costruzione del nido e alla incubazione delle uova (Bird *et al.*, 1983). L'impedimento riproduttivo nei polli è stato registrato per livelli nella dieta inferiori a 5 ppm (Heinz *et al.*, 1984).

Somministrazioni giornaliere di 33 ppm ripetute per 70 giorni hanno provocato nello sparviero una significativa diminuzione nella concentrazione dello sperma non accompagnato da un aumento compensatorio di volume (McLane e Hughes, 1980).

Si suppone che tutte queste anomalie comportamentali e fisiologiche nei protocolli riproduttivi siano dovute alla riduzione dei livelli ormonali di estrogeni ed androgeni. Tale riduzione è attribuibile all'induzione nell'attività degli enzimi microsomiali epatici causata dai policlorobifenili (Tori e Poterle, 1983) ([www.gondrano .it](http://www.gondrano.it)).

## 5. METALLI PESANTI

I metalli pesanti sono elementi con caratteristico aspetto lucido, buoni conduttori di elettricità, che si comportano nelle reazioni chimiche da ioni positivi (cationi). Questa definizione si sostituisce a quella vecchia che si basava sulla densità dell'elemento e considerava come "pesanti" solo elementi con densità superiore 5.

La nuova definizione, basandosi sulla chimica del metallo, permette così di considerare come importanti inquinanti anche elementi non "pesanti" come ad esempio l'alluminio (densità 1.5) che pur non essendo pericoloso in condizioni "normali" diviene un potente tossico se posto in acque acide.

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

Metalli e metalloidi sono sostanze presenti nell'ambiente in qualità di elementi costitutivi dello stesso, nonché introdotti in seguito ad emissioni di tipo industriale.

Come rappresentato in fig. 4, l'attività umana rappresentata dalle industrie, dagli insediamenti urbani (intesi in particolare come scarichi di reflui e di impianti di depurazione degli stessi), dalle attività di miniera e agricole, comportano un rilascio (nell'aria, nel terreno e nelle acque) di notevoli quantitativi di metalli (in particolare Cd, Zn, Pb, e Hg), che passano direttamente, per dilavamento dai

terreni o legati ai sedimenti, nei bacini acquatici. Qui possono subire trasformazioni biologiche e chimiche, che ne comportano un accumulo nell'ambiente (sotto forma di sedimenti) e negli organismi, sia vegetali che animali, esplicando così la loro azione inquinante.

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

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

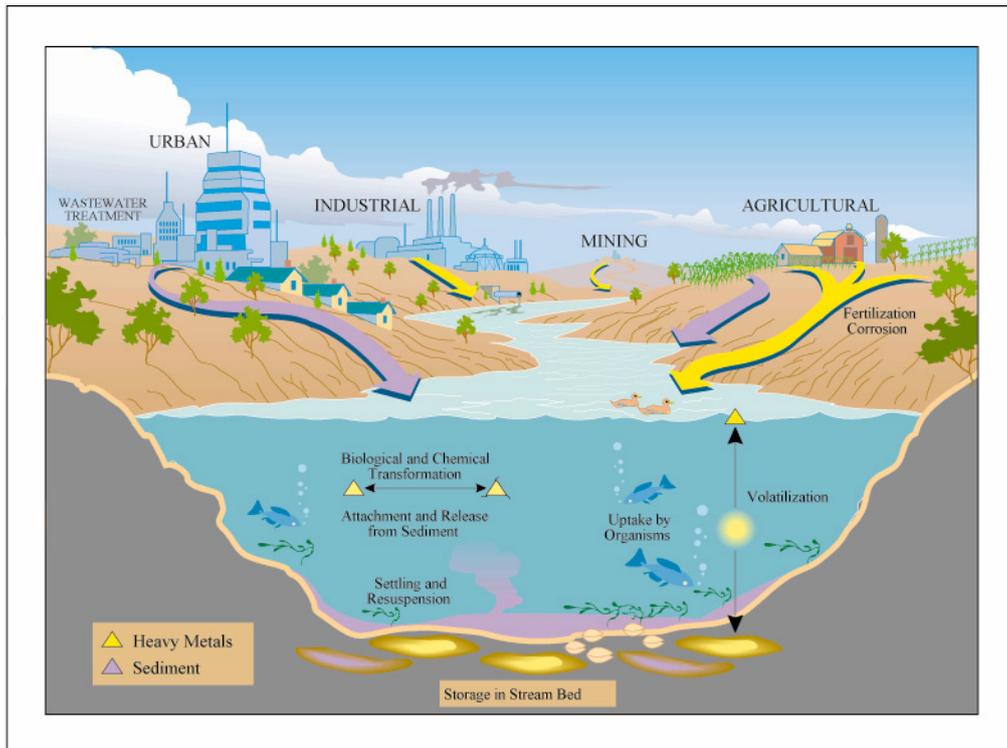


Fig. 4: Fonti di inquinamento dei metalli pesanti.  
 ([http://wwwbrr.cr.usgs.gov/projects/sw\\_inorganic](http://wwwbrr.cr.usgs.gov/projects/sw_inorganic))

## 5.1 Arsenico

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

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

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

pur concentrandosi negli organismi, non va incontro a biomagnificazione nella catena alimentare (Eisler, 1988).

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

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

Gli organismi marini, specialmente crostacei, possono contenere più di 100 mg As/kg di peso secco, in genere, come già precedentemente ricordato, in forma di arsenobetaine (Eisler, 1988). Le concentrazioni di arsenico nei tessuti di organismi marini mostrano un vasto range di valori, in genere più alte nei lipidi, nel fegato e nei muscoli, che variano con l'età dell'organismo, l'area geografica e la vicinanza ad attività umane di immissione. (Eisler, 1988).

### **5.1.1 Meccanismo d'azione**

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

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

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

Il meccanismo d'azione dei composti arsenicali, che si attua principalmente attraverso il blocco dei gruppi sulfidrilici delle proteine è comune ad altri metalli quali cadmio e selenio e questo potrebbe spiegare l'interazione dell'arsenico con questi elementi riportata da Reilly (2002); in particolare sembra che l'arsenico possa contrastare la tossicità derivata da un' eccessiva assunzione di selenio (Rhian e Moxon, 1943).

### **5.1.2 Aspetti tossicologici**

Tra le cause più comuni di intossicazione da As c'è la disponibilità di recipienti usati per contenere insetticidi o erbicidi non accuratamente

puliti dopo l'uso, ma anche la contaminazione di pascoli con erbicidi e pesticidi.

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

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

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

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

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

Va, altresì, ricordato che l'ingestione di dosi crescenti di arsenico è stata dimostrata conferire all'organismo una assuefazione tale da poter tollerare dosi letali (Bottarelli, 1993-a). Tale apparente tolleranza sembra essere dovuta all'insolubilità dei cristalli di arsenico ingeriti; l'assorbimento è molto lento e questo fa sì che la maggior parte della sostanza ingerita sia eliminata immutata con le feci, mentre solo una piccola quantità assorbita è rapidamente escreta con le urine, senza che si verifichi un accumulo nei tessuti (Clarke e Clarke, 1975): si tratta comunque di un'assuefazione limitata alla sola assunzione per via orale.

### **5.1.3 Tossicità acuta**

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

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

La forma acuta si manifesta inizialmente con un gusto metallico, una sensazione di secchezza e irritazione della bocca e della gola con difficoltà nella deglutizione; questi primi sintomi sono seguiti rapidamente da vomito o rigurgito di odore agliaceo, grave dolore addominale con rilevazione all'auscultazione di forti rumori borborigmici. L'animale si presenta cianotico con estremità fredde a volte con dolori agli arti, convulsioni e debolezza muscolare segno di

un coinvolgimento del sistema nervoso centrale. Dopo 24 ore si ha diarrea acquosa, a volte emorragica, accompagnata da tenesmo e forte disidratazione. Questa forte disidratazione porta inevitabilmente a collasso cardiocircolatorio e morte entro 3 giorni (Thienes e Haley, 1972; Clarke e Clarke, 1975; Bottarelli, 1993-a).

#### **5.1.4 Tossicità a lungo termine**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 5.1.6 Effetti mutageni

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

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

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

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

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

### **5.1.7 Effetti cancerogeni**

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

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

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

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

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

Il rischio di cancro sembrerebbe essere dose-dipendente con una sua diminuzione al cessare dell'esposizione al tossico ed alla sua eliminazione dal corpo (Mandal e Suzuki, 2002). Nordberg e Anderson (1981) e Lee-Feldstein (1986) hanno suggerito un meccanismo alternativo; secondo questi autori l'arsenico per essere efficace dovrebbe essere presente alla sintesi del DNA, per questo suggeriscono che l'arsenato sia incorporato nel DNA in sostituzione

del fosfato. Questo spiega anche perché l'arsenico sia clastogenico dal momento che il legame arsenato-fosfato sembra essere più debole del normale legame fosfodiesterico (Jacobson-Kram & Montalbano, 1985).

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

### **5.1.8 Effetti immunodepressivi**

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

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

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

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

Al proposito ricordiamo però che più di 80 anni fa già Toyama e Kolmer (1918) avevano dimostrato che basse concentrazioni di

arsenfenamine aumentavano gli anticorpi mentre alte concentrazioni li inibivano.

### **5.1.9 Impatto ambientale**

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

Si tratta di un elemento cristallino che come appena ricordato rappresenta lo 0,00005% del 1% della crosta terrestre e con un concentrazione media nelle rocce sedimentari e laviche di 2 mg/kg. E' concentrato in alcuni sedimenti di origine marina dove può raggiungere livelli di 3000 mg/kg.

Il principale carrier di arsenico nelle rocce e in molti tipi di depositi minerali è la ferro-pirite ( $\text{FeS}_2$ ) che può contenere più di 2000 mg/kg di arsenico (NRCC, 1978)

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

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

I principali fattori che influenzano la concentrazione di As nel terreno sono rappresentati dal tipo di roccia da cui il terreno ha origine e dalle attività umane ai quali si aggiungono il clima, le componenti organiche ed inorganiche del terreno ed il potere redox. Gli studi

portati avanti in tal senso hanno dimostrato che il tipo di roccia da cui il terreno ha origine è un fattore molto più importante nell'influenzare il contenuto di arsenico rispetto al tipo di terreno stesso (Tang, 1985; Tang, 1987).

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

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

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

La concentrazione massima consentita nell'acqua da bere è di 50 µg/l e il valore raccomandato da EPA e WHO è di 10 µg/l (EPA, 1985; WHO, 2001).

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

Il contenuto di arsenico nell'acqua di mare si attesta invece su valori variabili tra 0,001 e 0,008 mg/l tenendo presente che il dilavamento delle rocce e dei terreni porta all'immissione negli oceani di circa 45000 tonnellate di arsenico all'anno. L'immissione di arsenico,

inoltre, è notevolmente aumentata nel passato secolo, sia derivante da fonti naturali che come risultato dell'uso industriale e delle attività agricole e di deforestazione. E' anche vero, però, che solo una piccolissima quota dell'arsenico totale presente nei mari rimane disciolto nell'acqua, la maggior parte, infatti, si lega alle particelle di materiale in sospensione (Mandal e Suzuki, 2002).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 5.2 Cadmio

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

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

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

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

Nel settore industriale il cadmio è impiegato sostanzialmente nella produzione di batterie ricaricabili, come polo negativo nell'elettrocadmio, per la sua azione anticorrosiva per ferro ed acciaio e per quella stabilizzante nella produzione della plastica e di pigmenti per vernici. Stoeppler (1991) ricorda che il metallo è

presente nei fertilizzanti, nelle acque di scarico e nei fanghi di origine urbana, che ne rappresentano quindi un'ulteriore fonte di contaminazione ambientale.

### **5.2.1 Meccanismo d'azione**

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

Una scala di affinità per i diversi ligandi è stata delineata da Kägi e Hapke (1984), scala che, in ordine decrescente, può essere schematizzata come segue: tiolico ( $RS^-$ ) > fosforico ( $RPO^-$ ) > cloridrico ( $RCl^-$ ) > carbossilico ( $RCOO^-$ ). Tale affinità risulta essere direttamente proporzionale ai siti leganti presenti sulle molecole interessate, ed è pertanto più elevata per glutatione e metallotioneina.

Diverse possono essere le conseguenze dell'azione del metallo a livello cellulare tra queste ricordiamo l'inibizione delle ossidasi a funzione mista, le alterazioni di alcune attività del calcio e del suo trasporto transmembrana, il blocco della fosforilazione ossidativa dei mitocondri e le variazioni della funzionalità di vari metalloenzimi, quali alcool deidrogenasi, carbossipeptidasi, delta-ALA deidrasi, superossido dismutasi, ecc. (Sporn *et al.*, 1969; Webb, 1979; Goering *et al.*, 1995).

Il cadmio interferisce anche con le attività del calcio attraverso un suo rilascio dai siti di deposito intracellulare ed un aumento dei livelli di inositol-fosfatasi, probabilmente a seguito di un'interazione con un recettore di membrana (Smith *et al.*, 1989; Chen e Smith, 1992).

Inoltre, va ricordato che il cadmio può sostituirsi al calcio nel legame alla calmodulina ed essendo quest'ultima una proteina preposta alla regolazione di numerosi processi calcio-dipendenti, ciò si traduce in un'azione calcio-agonista da parte del metallo, con conseguente attivazione o inibizione, in funzione della sua concentrazione, degli enzimi calmodulino-sensibili, quali la fosfodiesterasi e l'adenosin-trifosfatasi Ca/Mg dipendente; il fenomeno può trovare conferma nel fatto che un trattamento con calmodulina-inibitori comporta miglioramenti del quadro tossico (Donnelly, 1978; Forsen *et al.*, 1979; Andersson *et al.*, 1982; Cox e Harrison, 1983; Habermann *et al.*, 1983; Chao *et al.*, 1984; Cheung, 1984; Mills e Johnson, 1985; Akerman *et al.*, 1985; Richard *et al.*, 1985).

La sostituzione dello zinco da parte del cadmio spiega invece la sua azione sui metalloenzimi, ciò trova una controprova nel fatto che carenze di zinco comportano un aggravamento degli effetti tossici (Vallee e Ulmer, 1972; Vallee e Glades, 1974).

Il cadmio, inoltre, inducendo l'attività della eme-ossigenasi, porta ad un conseguente incremento nella degradazione dell'eme, che a sua volta è responsabile di una riduzione dell'attività dell'ossidasi a funzione mista e del contenuto di citocromo P450.

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

### 5.1.2 Aspetti tossicologici

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

La sua tossicità può subire modificazioni in relazione all'interazione con altri metalli, quali rame, zinco e ferro. Gli effetti tossici del cadmio possono essere, infatti, ridotti, se non addirittura prevenuti, dalla presenza di zinco; il cadmio, a sua volta è in grado di diminuire l'assorbimento del ferro e del rame e di aumentare la deplezione epatica del primo e l'escrezione urinaria del secondo. Anche l'acido ascorbico, la vitamina D, la cisteina, il glutatione e il selenio esplicano effetti protettivi nei confronti delle azioni tossiche del cadmio (Worker e Migkovesky, 1961; Powell *et al.*, 1964; Pond *et al.*, 1966; Bunn e Matrone, 1966; Gunn *et al.*, 1968-a; Anke *et al.*, 1970; Fox e Fry, 1970; Fox *et al.*, 1971; Freeland e Cousins, 1973; Whanger, 1973).

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

### 5.1.3 Tossicità acuta

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

La prima manifestazione di un'esposizione acuta al metallo è l'insorgere di fenomeni irritativi a carico del tessuto interessato (tratto gastrointestinale o polmone), seguiti da nausea, vomito, scialorrea, diarrea e dolori addominali, quadro questo particolarmente grave ed intenso nei roditori, in quanto incapaci di vomitare. Il suo assorbimento per via inalatoria comporta anche dolori toracici, dispnea, vertigini, con successivo instaurarsi di polmonite e di edema polmonare ad esito fatale (Lucisano, 1994-b). Una singola dose di sali solubili somministrata per via parenterale può indurre lo sviluppo di fenomeni necrotici a carico del testicolo e dei gangli sensoriali, ai quali si associano, a dosi più elevate, necrosi epatica e danni in numerosi altri organi (Elinder, 1985). L'organo target dopo assorbimento di dosi elevate di cadmio è rappresentato, secondo Dudley *et al.* (1982), dal fegato, a carico del quale vengono descritti necrosi del parenchima, degenerazione del reticolo endoplasmatico rugoso e dei mitocondri e, ancora, proliferazione del reticolo endoplasmatico liscio.

E' possibile prevenire molti dei fenomeni tossici descritti in precedenza, quali ad esempio la necrosi testicolare, mediante pretrattamenti condotti con basse dosi di cadmio e/o somministrazioni ripetute dell'elemento, in quanto ritenuti in grado di

stimolare la sintesi di nuova metallotioneina che, data la sua capacità di sequestrare il metallo, può svolgere funzione protettiva per l'organismo (Nordberg, 1971).

#### **5.1.4 Tossicità a lungo termine**

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

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

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

Nel ratto, abbeverato con acqua contenente 5 µg/ml di cadmio acetato, è stata osservata e descritta da autori diversi (Perry e Schroeder, 1955; Schroeder, 1965; Schroeder, 1966; Kanisawa e Schroeder, 1969) la comparsa di ipertensione arteriosa ed assottigliamento delle arteriole renali, con alterazioni glomerulari

simili quelle riscontrate nell'ipertensione cronica benigna conseguente ad un'esposizione cronica professionale al metallo.

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

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

A carico dell'apparato respiratorio i principali rilievi sono dati da fenomeni infiammatori ed irritativi, con bronchite cronica ed edema,

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

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

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

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

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

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

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

Il danno testicolare non si presenta nelle specie prive di scroto, nelle gonadi delle specie aviarie (più resistenti agli effetti tossici) e nei soggetti non ancora sessualmente maturi, ed è legato a lesioni del letto vascolare, con possibile edema delle cellule interstiziali, ridotta produzione di androgeni nelle cellule del Leyding, necrosi delle cellule del Sertoli, inibizione della spermatogenesi e ridotta motilità spermatica (Parizek, 1957; Meek, 1959; Gunn *et al.*, 1968-b; Samarawickrama, 1979; Wong e Klaassen, 1980; Dwivedi, 1983). Somministrati per via sottocutanea, dosaggi pari a 0.2 mM/kg (circa 40 mg/Kg) di cloruro di cadmio si dimostrano in grado di indurre sterilità negli animali da laboratorio e di inibire la spermiogenesi nel bovino dopo iniezione endovenosa; quest'ultima azione può essere sfruttata come castrazione chimica in tale specie animale, perché porta alla soppressione permanentemente della produzione di sperma (Chiquoine e Suntzeff, 1965; Malcom, 1971; B. Venugopal e T.D. Luckey, 1978).

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

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

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

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

metallo si assista ad un aumento delle deformità e dei coaguli sanguigni e ad una riduzione della percentuale di schiusa e come in barbiglio blu (*Lepomis macrochirus*) concentrazioni di 80 ppb nell'acqua comportino edema, microcefalia e deformità delle pinne caudali (Ferm e Carpenter, 1968; Anke *et al.*, 1970; Mills e Dalgarno, 1972; Pickering e Gast, 1972; Scharpf *et al.*, 1972; Eaton, 1974; Ferm e Layton, 1981; Nakashima *et al.*, 1988).

Infine va ricordato che sia gli effetti sulle gonadi che quelli teratogeni possono essere antagonizzati con efficacia da una somministrazione di sali di selenio, cobalto e zinco, mentre, invece, quelli di piombo e mercurio esplicano un'azione sinergizzante (Parizek, 1957; Mason e Young, 1967; Gunn *et al.*, 1968-a; Gunn *et al.*, 1968-b; Ferm e Layton, 1981).

#### **5.1.6 Effetti mutageni**

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

Questa azione mutagena può essere interpretata sulla base del legame che il metallo contrae con due distinti siti del DNA; in questo modo il cadmio è in grado di intercalarsi tra i due filamenti di questa molecola, dove sostituisce lo zinco nell'acido desossiribonucleico e di alterarne la trascrizione attraverso la destabilizzazione della

struttura ad elica. A ciò si associa un'inibizione dell'attività della RNA polimerasi DNA- dipendente, che può alterare la trascrizione e l'espressione del codice genetico (Stoll *et al.*, 1976; Webb, 1979; Waalkes e Poirier, 1984).

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

#### **5.1.7 Effetti cancerogeni**

Il cadmio è classificato nei registri internazionali come cancerogeno (IARC, 1976; Sunderman, 1978; Nomiyama, 1982; Oberdörster, 1986; Oberdörster e Cox, 1990; Waalkes e Oberdörster, 1990; IARC, 1993; Waalkes *et al.*, 1993).

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

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

Gli studi condotti nel ratto, come osservato anche nell'uomo, mettono in evidenza come la comparsa di forme neoplastiche polmonari sia conseguente sia ad un'esposizione cronica continua che irregolare. L'attività oncogena del cadmio, non essendo stata dimostrata nel topo e nel criceto, è, comunque, da ritenersi specie-specifica (Takenaka *et al.*, 1983; Oldiges *et al.*, 1989; Heinrich *et al.*, 1989; Glaser *et al.*, 1990).

A livello prostatico, le forme tumorali, si presentano solo nei soggetti sessualmente maturi. A carico del testicolo sono state rilevate neoplasie delle cellule interstiziali ad opera di sali di cadmio sia iniettati direttamente nel tessuto interessato che dopo una loro assunzione orale (Gunn *et al.*, 1963; Gunn *et al.*, 1964; Haddow A. *et al.*, 1964; Rehm e Waalkes, 1988; Waalkes *et al.*, 1989).

Le osservazioni effettuate a carico del sistema emopoietico risultano piuttosto controverse: da una parte, infatti, si assiste ad un aumento di leucemie da esposizione cronica tramite l'alimentazione, mentre, dall'altra, il trattamento singolo con sali di cadmio per via sottocutanea ne comporta un loro decremento. Così, nel topo, la somministrazione sottocutanea di sali di cadmio determina un aumento del numero di linfomi, mentre nel criceto si assiste ad una sua diminuzione (Waalkes *et al.*, 1990; Waalkes *et al.*, 1993).

L'attività cancerogena esplicata dal metallo nel sito di iniezione o d'impianto è nota già da oltre 30 anni ed è dovuta ad una permanenza in situ del metallo con conseguente azione irritante, meccanismo questo che si dimostra comune a molti metalli (Heath *et al.*, 1962; Kazantzis, 1963; Haddow A. *et al.*, 1964; Poirier *et al.*, 1983; Waalkes *et al.*, 1988; Waalkes *et al.*, 1989; Waalkes e Oberdörster, 1990).

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

### **5.1.8 Effetti immunodepressivi**

Diversi e contrastanti sembrano essere gli effetti del cadmio a carico del sistema immunitario: bassi dosaggi di metallo sembrano avere, infatti, un effetto stimolante l'immunità umorale, che invece subisce una depressione con un loro marcato incremento, mentre livelli intermedi si dimostrano privi di attività in questo senso (Malavè e DeRuffino, 1984; Thomas *et al.*, 1985; Borgman *et al.*, 1986; Descotes, 1999). Un'ipotetica interpretazione di tali differenze di comportamento viene data da Dayan *et al.* (1990) come conseguenza di una diversità di effettuazione degli studi, che vengono condotti con l'impiego di antigeni T-dipendenti o T-indipendenti e secondo una durata e una via di somministrazione tra loro diversificate.

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

### 5.1.9 Impatto ambientale

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

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

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

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

In ambiente acquatico i fenomeni di adsorbimento e di conseguente concentrazione del metallo nei fondali sembrano strettamente legati

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## 5.3 Cromo

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

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

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

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

composti cromati e di cromo nei pressi delle strutture che li utilizzano è stato stimato attorno alle 30 tonnellate e 5 tonnellate rispettivamente).

### **5.3.1 Meccanismo d'azione ed attività biologica**

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

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

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

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

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

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

### **5.3.2 Aspetti tossicologici**

Il cromo nella forma trivalente non possiede alcun potenziale tossico ed attualmente non è possibile reperire in letteratura dati significativi concernenti intossicazioni a seguito di un'assunzione orale di tale ione, tenendo anche conto della sua incapacità di attraversare le membrane. Nel ratto, come messo in evidenza dai risultati degli studi effettuati da Autori diversi (Schroeder *et al.*, 1962; Mertz, 1969; Mertz e Roginski, 1971), un'alimentazione con latte contaminato con 100 ppm di cromo lattato non comporta alcun segno di tossicità, analoghi riscontri sono stati ottenuti da studi eseguiti nel gatto con diete addizionate di 1000 ppm.

Il cromo esavalente desta, invece, un maggiore interesse dal punto di vista prettamente tossicologico: questo ione, infatti, può indurre

alterazioni alimentari e comportamentali e modificazioni delle attività enzimatiche, dei parametri ematochimici, oltre ad una minore resistenza agli agenti infettivi (Eisler, 1986).

### **5.3.3 Tossicità acuta**

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

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

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

Le acque dolci e quelle acide aumentano la tossicità del cromo (EPA, 1980-b). Nei teleostei non esistono meccanismi di

adattamento o responsabili di variazioni nella reattività al metallo, tanto che un'esposizione ripetuta al cromo non comporta alcuna modificazione nelle risposte da parte dei pesci (EPA, 1980-b; Stevens e Chapman 1984).

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

#### **5.3.4 Tossicità a lungo termine**

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

Albuminuria con cellule di desquamazione, iperemia renale, degenerazione grassa e necrosi dell'organo sono gli effetti indotti da una somministrazione nel coniglio di cromati, così come 1.7 mg/kg di metallo somministrati alla stessa specie ed al ratto per 6 settimane inducono alterazioni ematochimiche e modificazioni morfologiche a carico del fegato (Tandon *et al.*, 1978; Laj *et al.*, 1984).

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

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

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

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

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

Infine va ricordato che il metallo, sempre nella forma esavalente, riduce l'accrescimento degli avannotti di trota e di salmone esposti

per 14-16 settimane a concentrazioni ambientali di metallo comprese tra 16 e 21 ppb (EPA, 1980-c).

### **5.3.6 Effetti mutageni**

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

A seguito di un'esposizione per 24 h a concentrazioni di 24 ppm nell'acqua o d'iniezione di 1 mg/kg di metallo si riscontrano, nei modelli animali, aberrazioni cromosomiche nelle branchie (Krishnaja e Rege, 1982). Gli studi effettuati da Uyeki e Nishio (1983) su colture di cellule ovariche di criceto mettono in evidenza un aumento negli scambi tra cromatidi fratelli ed un'inibizione della proliferazione cellulare a seguito di un'esposizione a 52 ppb di metallo, ma non a 0.52 ppb, Hatherill, (1981), al contrario, riscontra riarrangiamenti ed aberrazioni cromosomiche nel coniglio.

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

### **5.3.7 Effetti cancerogeni**

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

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

### **5.3.8 Effetti immunodepressivi**

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

cellulo- mediata in bovine da latte possa essere indotto da diete contenenti 0.5 ppm di metallo.

### **5.3.9 Impatto ambientale**

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

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

delineano livelli di cromo pari rispettivamente a 3.9 mg/kg e a 162.0 mg/kg.

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

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

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

## 5.4 Ferro

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

Il ferro è il quarto elemento, in abbondanza, della crosta terrestre dopo silicio, ossigeno e alluminio. Le caratteristiche di questo metallo sono la duttilità e la malleabilità e, per questo, è uno dei metalli più impiegati nell'industria metallurgica per la formazione di numerose leghe. Estratto dagli ossidi per riduzione e carburazione

con carbone negli altiforni, il ferro dà vita alla ghisa, che può successivamente essere convertita in acciaio.

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

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

#### **5.4.1 Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico**

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

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

Dal punto di vista biochimico, i composti biologici del ferro sono distinti in tre categorie: 1. ferro eme, il metallo chelato da una porfirina, come avviene nell'emoglobina, mioglobina e citocromi; 2.

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

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

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

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

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

#### **5.4.2 Aspetti tossicologici**

Il ferro è un metallo per cui carenze nell'assunzione sono in grado di indurre alterazioni dell'omeostasi negli organismi viventi, la cui manifestazione più tipica è l'insorgenza di un'anemia rigenerativa inefficace, caratterizzata da reticolocitosi e microcitosi eritrocitaria nella maggior parte delle specie animali e da ipocromasia (Harvey *et al.*, 1982; Weiser e O'Grady, 1983).

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

Si è visto che il ferro in eccesso assorbito dal tratto gastroenterico si accumula nelle cellule parenchimali, mentre quello somministrato per via parenterale si deposita nelle cellule reticoloendoteliali (Nath

*et al.*, 1972). Ad ogni modo, un accumulo di ferro, che va sotto il nome di emosiderosi e emocromatosi, rispettivamente nei tessuti e nel siero, provoca una serie di disordini eterogenei inquadrabili sia in stati acuti che cronici.

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

#### **5.4.3 Tossicità acuta**

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

#### **5.4.4 Tossicità a lungo termine**

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

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

#### **5.4.5 Effetti cancerogeni**

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

#### **5.4.6 Effetti immunodepressivi**

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

### 5.4.7 Impatto ambientale

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

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

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

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

## 5.5 Mercurio

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

La maggior degli autori concorda sui seguenti punti:

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

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

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

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

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

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

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

### **5.5.1 Meccanismo d'azione**

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

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

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

### **5.5.2 Aspetti tossicologici**

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

### **5.5.3 Tossicità acuta**

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

I sintomi della forma acuta comprendono incoordinazione muscolare, letargia, arruffamento delle penne (negli uccelli), agitazione, abbassamento delle palpebre, diarrea incoercibile, tachicardia, aumento della temperatura, dispnea e cianosi. La morte avviene per collasso cardiocircolatorio.

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

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

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

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

#### **5.5.4 Tossicità a lungo termine**

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

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

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

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

#### **5.5.6 Impatto ambientale**

Come già accennato ad inizio capitolo l'utilizzazione industriale del mercurio in questi anni ha subito un notevole impulso dal momento che il metallo viene usato per molteplici scopi che vanno dall'industria chimica (preparazione elettrolitica di Cl e soda) a quella elettrica, a quella farmaceutica ed anche a quella agro-zootecnica. Una tale diffusione di impieghi porta a maggiori rischi di inquinamento dell'ambiente. Il metallo, inoltre, può contaminare le acque per "fall out" di polveri provenienti dalla combustione del carbone e degli oli minerali (Lucisano, 1994-c).

Jerlonov (1969) ha studiato il ciclo biogeochimico del Hg e ha dimostrato che quest'elemento, sia come metallo che come composti organici, sedimenta in depositi acquatici e terrestri. Nei sedimenti acquatici e per azione di alcuni microrganismi bentonici, il mercurio può essere trasformato in composti inorganici o in composti organici (metil-mercurio e dimetil-mercurio). Il dimetilmercurio è un composto molto volatile e può evaporare dalle

acque all'atmosfera, diffondendo la contaminazione anche a zone non immediatamente prossime alla sorgente di inquinamento. Il metilmercurio, invece, rimane nell'idrosfera e da qui passa nella catena alimentare, secondo linee tradizionali: fitoplancton, zooplancton, pesci predatori ed infine l'uomo (apice della catena nutrizionale). Quando piante e animali muoiono, l'Hg in essi contenuto viene restituito ai sedimenti da dove il ciclo può ricominciare.

E' stato calcolato che nell'ambito della catena alimentare, che si realizza nell'ambiente acquatico, il Hg può concentrarsi fino a 10000 volte (Lucisano, 1994-c).

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

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

## 5.6 Piombo

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

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

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

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

Nell'ambito industriale il metallo e i suoi composti trovano impiego nella produzione di batterie in leghe con antimonio, stagno e rame, nell'allestimento di pigmenti per vernici e per l'industria ceramica; ancora è utilizzato nelle attività di smaltamento dei metalli, mentre è stato abbandonato il suo impiego come insetticida (arseniato di piombo), nella produzione delle plastiche (borato di piombo) e nella fusione dei caratteri di stampa. Il suo uso come piombo tetrametile e

tetraetile, quale antidetonante nelle benzine può essere ricordato, tra gli altri, come fonte di inquinamento ambientale, anche se oggi questa va rivestendo importanza sempre minore in ragione di una sua ridotta presenza nei carburanti (Venugopal e Luckey, 1978; Beretta, 1994; Eisler, 1988-b).

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

### **5.6.1 Meccanismo d'azione**

Il piombo, come già accennato precedentemente, lega fortemente i gruppi tiolici (SH), fosforici ( $\text{PO}_4$ ) e carbossilici (COOH) di numerosi ligandi di natura proteica ed in particolare degli enzimi presenti nei globuli rossi, con conseguenti alterazioni funzionali e strutturali.

Il legame alle proteine eritrocitarie comporta infatti un aumento di fragilità osmotica dei globuli, in seguito ad un'alterata permeabilità di membrana e di un blocco dell'ATPasi Na/K, queste portano non tanto ad una vera e propria alterazione del metabolismo cellulare, quanto, piuttosto, a decrementi delle dimensioni globulari, per

perdita di potassio ed acqua (Bishop e Surgerer, 1964; Lessler e Walters, 1973; Venugopal e Luckey, 1978).

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

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

Il piombo risulta in grado, probabilmente a causa di una riduzione della concentrazione extracellulare di calcio e di un peggioramento della captazione della dopamina e dell'attività dell'acido  $\delta$ -aminobutirrico, di inibire la funzione colinergica, inducendo così

scompensi nella trasmissione neuronale degli impulsi (Rossow *et al.*, 1987).

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

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

### **5.6.2 Aspetti tossicologici**

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

La composizione della dieta viene segnalata tra i fattori che possono modificare il comportamento tossicologico del piombo, infatti, quote elevate di proteine, di vitamina D, di acido ascorbico e nicotinico, di

calcio e di fosfati risultano in grado di diminuire la sensibilità degli animali alle intossicazioni, al contrario, bassi tenori di ferro e calcio favoriscono la mobilizzazione del metallo e carenze di vitamina E si dimostrano in grado di potenziarne l'effetto emolitico (Levander *et al.*, 1975; Venugopal e Luckey, 1978).

### **5.6.3 Tossicità acuta**

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

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

### **5.6.4 Tossicità a lungo termine**

Il quadro dell'intossicazione cronica è essenzialmente caratterizzato da una riduzione operata a carico dell'attività di vari organi,

dell'accrescimento e della durata della vita, nonché da alterazione della funzione renale, riproduttiva, del sistema emopoietico e dell'attività cerebrale.

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

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

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

I riscontri autoptici mettono in evidenza erosione e riduzione del tessuto renale. La nefropatia da piombo è caratterizzata, istologicamente, da tipiche inclusioni nucleari nelle cellule circostanti il tubulo prossimale, costituite da complessi piombo-proteina che compaiono precocemente e che si dissolvono dopo terapia con agenti chelanti, imputabili, quindi, al meccanismo detossificante del metallo (Choie e Richter, 1972, Venugopal e Luckey, 1978).

Rispetto agli effetti che si realizzano a carico del sistema emopoietico a seguito di esposizioni a lungo termine, l'anemia viene

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

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

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

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

Il piombo si dimostra in grado di alterare la funzionalità riproduttiva di entrambi i sessi e di esercitare importanti effetti teratogeni e sullo sviluppo neurale della prole.

I risultati degli studi condotti in ratti alimentati per un mese con diete contenenti 100 µg/kg di metallo delineano, in particolare, impotenza,

iperplasia prostatica e riduzione della secrezione dell'organo (Fahim *et al.*, 1972), che Choie e Richter (1972) ascrivono ad una stimolazione della sintesi di DNA. Nel ratto maschio, livelli ematici di piombo pari a 50  $\mu\text{g}/100$  ml inducono inibizione della spermatogenesi per danni testicolari, mentre nella femmina si osserva irregolarità estrale con estro vaginale persistente con successiva comparsa di cisti ovariche e riduzione dei corpi lutei (Hilderbrand *et al.*, 1972).

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

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

Va inoltre ricordato che precedenti osservazioni hanno dimostrato come diete contenenti il 10% di  $\text{PbCO}_3$  possano indurre nella prole paraplegia degli arti posteriori che si rende evidente 20 giorni dopo la nascita (Lampert *et al.*, 1967). 2 anni dopo il trattamento nella prole di scimmie trattate quotidianamente con 0.1 mg/kg di piombo o con diete contenenti 0.5 mg/kg di metallo si rendono evidenti alterazioni dell'apprendimento e comportamenti sociali anormali (Eisler, 1988-b).

### **5.6.6 Effetti mutageni**

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

### **5.6.7 Effetti cancerogeni**

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

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

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

In questi anni, sebbene non sia ancora stato possibile dimostrarla, molte sono state, le ricerche sulla correlazione tra l'esposizione al piombo ed i tumori maligni nell'uomo, Dingwall-Fordyce e Lane (1963) effettuarono uno studio su alcuni lavoratori inglesi esposti al piombo ma non dimostrarono alcun aumento dell'incidenza del cancro in tali soggetti.

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

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

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

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

### 5.6.8 Effetti immunodepressivi

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

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

Anche l'azione del piombo sulla risposta non specifica e sulla resistenza ai patogeni è caratterizzata da una pari discrepanza di risultati: a fronte di una stimolazione della fagocitosi quale rilevata con somministrazioni singole o ripetute di metallo a bassi dosaggi, un loro incremento ne determina invece un'azione depressiva. Allo stesso modo un'esposizione al metallo diminuisce la resistenza degli animali a numerosi patogeni, dato, questo, che è in netta contrapposizione al rilievo che la somministrazione di piombo immediatamente prima della stimolazione con *Klebsiella pneumoniae* aumenti la refrattarietà all'infezione (Koller e Roan

1977; Schlick e Friedberg, 1981; Tam e Hindschill, 1984; Laschi-Loquerie *et al.*, 1987).

### **5.6.9 Impatto ambientale**

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

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

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

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

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

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

## 5.7 Rame

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

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

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

### 5.7.1 Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico

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

Il rame è coinvolto direttamente nell'emopoiesi, nel metabolismo del tessuto connettivo, nella formazione della mielina dei neonati, nella sintesi dei pigmenti e nell'osteogenesi. Inoltre, presentando più stati

d'ossidazione, è impiegato nei processi respiratori, entrando a far parte delle citocromoossidasi, particolarmente concentrate nei muscoli e necessarie per il trasporto degli elettroni nei mitocondri, e nell'emocianina; altri cuproenzimi sono le tirosinasi, le monoamminoossidasi, le dopaminoidrossilasi.

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

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

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

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

Recentemente, inoltre, si è scoperta una certa correlazione fra il rame e le malattie neurodegenerative provocate da prioni; la proteina prionica, normalmente espressa dai neuroni come glicoproteina di superficie cellulare, infatti, si è dimostrata essere

una molecola legante il rame e, per questo, possiede un ruolo fondamentale nel metabolismo cerebrale di questo metallo. Essa può alterare l'ingresso intracellulare del rame e facilitare la sua incorporazione nella SOD (Superossido-dismutasi), oltre a comportarsi essa stessa come la SOD (Brown, 2001).

### ***5.7.2 Aspetti Tossicologici***

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

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

L'intossicazione da rame si può verificare o per un'eccessiva assunzione del metallo con la dieta, o per inefficienza delle vie di escrezione, come si verifica, ad esempio, in caso di ostruzione del coledoco o di qualsiasi patologia epatica o renale, ma anche per carenza di proteine che legano il rame (rendendolo così inattivo) e per deficit di Md, Fe, Zn, che competono con esso nell'assorbimento.

### **5.7.3 Tossicità acuta**

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

### **5.7.4 Tossicità a lungo termine**

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

I reperti anatomo-isto-patologici includono degenerazioni renali, ulcere alla mucosa gastro-enterica, epatomegalia e maggiore friabilità del fegato, che presenta pure aree necrotiche, edema polmonare e essudati in cavità addominale. Inoltre, eccessi di rame

nella dieta producono anche alterazioni cerebrali, evidenziabili con aree di trasformazione spongiforme nella sostanza bianca.

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

### **5.7.5 Effetti cancerogeni**

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

### **5.7.6 Impatto ambientale**

Si è già accennato all'importanza del rame come nutriente essenziale e alla sua presenza in sistemi inorganici ed organici animali e vegetali; questi ultimi soprattutto possono rappresentare potenziali pericoli per animali posti ai vertici della catena alimentare. Sono state identificate zone carenti del metallo nell'Australia Occidentale, in alcune regioni meridionali dell'Europa Occidentale e nel sud-est degli Stati Uniti.

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

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

## 5.8 Selenio

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

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

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

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

Il selenio veniva usato nei primi del '900 come pesticida nel controllo dei parassiti delle piante, mentre è ancora in uso come spray nel

controllo dei parassiti dei crisantemi e di altre piante ornamentali (Rosenfeld e Beath, 1964).

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

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

### **5.8.1 Meccanismo d'azione e ruolo fisiologico**

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

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

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

### **5.8.2 Aspetti tossicologici**

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

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

Si è rilevato che i ruminanti sono più sensibili al  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  per via orale rispetto ad equini, suini e polli. I maschi, inoltre, sembrano tollerare dosi di selenio più elevate rispetto alle femmine (Shortridge *et al.*, 1971; Pilch *et al.*, 1980; Gennaro *et al.*, 1983).

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

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

### **5.8.3 Tossicità acuta**

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

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

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

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

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

#### **5.8.4 Tossicità a lungo termine**

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

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

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

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

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

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

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

Il selenio è, inoltre, embriotossico in quanto interferisce con lo sviluppo dell'embrione perché riduce la disponibilità di ossigeno e di energia e teratogeno come ben documentato nelle ovaiole alimentate con mangimi seleniferi o con diete arricchite con 7-9 ppm di Se come  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  (54), a cui venivano somministrate per via parenterale quantità variabili di selenito sodico nella camera d'aria delle uova embrionale (Sukra *et al.*, 1976). I pulcini nati da questi animali presentano edema del collo e del capo, idrocefalo, aplasia o malformazioni del becco, microoftalmia o anoftalmia, gastroschisi, fusione, curvatura o mancanza delle dita.

### **5.8.6 Effetti cancerogenici e anti-carcinogenici**

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

Nelson e collaboratori hanno indotto tumori epatici non metastatizzanti in ratti alimentati con grani seleniferi contenenti 5-10 ppm di Se con un periodo di latenza di circa 18 mesi. Negli studi di Tscherkes carcinomi e adenomi epatici sono stati osservati nel 25% di ratti alimentati con 4,3 ppm di Se sottoforma di selenati. Questi dati sulla cancerogenicità dei selenati sono stati supportati da successivi studi condotti nel 1972 da Schroeder e Mitchner.

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

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

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

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

### **5.8.7 Effetti immunodepressivi**

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

La carenza di selenio, infatti, altera sia la capacità fagocitaria che quella killer nei confronti degli agenti patogeni, dei neutrofili; tali

difetti funzionali sono correlabili agli sconvolgimenti enzimatici che una carenza di selenio può causare a carico delle cellule (Serfass & Garthner, 1975; Boyne & Arthur, 1981 e Arthur et al., 1981).

Esistono considerevoli prove che se da un lato la carenza causa un'alterazione della risposta immunitaria, dall'altro la somministrazione di dosi supplementari di selenio aumenta la risposta dell'immunità umorale negli animali. Studi condotti da Spallholz *et al.* nel 1973 e da Shackelford e Martin nel 1980 hanno evidenziato, infatti, come topi a cui venga somministrata una dose di 1-3 ppm di selenio possano produrre aumentate quantità di anticorpi IgM e IgG anti-globuli rossi di pecora.

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

### **5.8.8 Impatto ambientale**

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

aree (Italia compresa), invece, non presenta elevati livelli, nei terreni e nei vegetali.

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

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

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

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

## **5.9 Zinco**

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

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

### **5.9.1 Meccanismo d’azione e ruolo fisiologico**

Lo zinco, in virtù delle succitate proprietà chimico-fisiche, compare in moltissime classi di enzimi e cofattori biologici: ossidoreduttasi, transferasi, idrolasi, liasi, isomerasi e ligasi. In base al legame che si

crea tra il metallo e la componente proteica si distinguono due tipi di composti: 1-metalloproteine, in cui il legame è forte, 2-complessi metallo-proteici, in cui è labile.

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

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

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

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

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

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

Un'intossicazione da zinco altera il metabolismo del Fe favorendone il suo turnover, diminuendo il tempo di vita degli eritrociti e l'accumulo del Fe come ferritina nel fegato (Settlemyre e Matrone, 1967-a; 1967-b).

Lo zinco è pure implicato nella modulazione del sistema immunitario, risultando da numerosi studi che carenze di zinco provocano una ridotta risposta immunitaria cellulo-mediata,

diminuzione dell'intensità delle reazioni di ipersensibilità ritardata, a cui consegue maggiore suscettibilità a infezioni e patologie negli animali e nell'uomo (Adams, 1999).

### **5.9.2 Aspetti tossicologici**

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

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

I giovani risultano più sensibili rispetto ad i soggetti adulti (Bottarelli, 1993-d); Grimmet *et al.* (1937) hanno infatti descritto un'intossicazione in giovani maiali la cui dieta era stata somministrata con la dieta, costituita in maggior misura da latte, zinco allo 0.1%,

sottoforma di lattato, mentre gli stessi autori hanno fallito nel produrre segni clinici in maiali adulti che sembrano tollerare bene fino a 35 gr di lattato di zinco al giorno e carbonato di zinco 0.1% nella razione (Brink *et al.*, 1959)

In realtà il fattore di sicurezza per lo zinco è abbastanza ampio; concentrazioni di 600 ppm non determinano effetti avversi nella maggior parte delle specie studiate e soltanto livelli di 1000 ppm o più possono provocare riduzione dell'assunzione di alimento e della crescita ponderale, alterata mineralizzazione ossea, anormalità ossee e cartilaginee e ridotte concentrazioni tissutali di Fe, Mn e Cu (NCR, 1980).

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

### **5.9.3 Tossicità acuta**

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

Inalazioni di alcuni sali di zinco, come cloruri e ossidi, come conseguenza di una esposizione di tipo industriale, provocano polmoniti nell'uomo, spesso ad esito letale, e una sindrome

caratterizzata da depressione, nausea, secchezza della gola e emicrania, sintomi simili a quelli della malaria. Cani e gatti si sono dimostrati immuni da queste sindromi da inalazione, ma i primi hanno presentato glicosuria, mentre i secondi degenerazione fibrosa pancreatica (Johnson e Stonehill, 1961, Goyer, 1996).

#### **5.9.4 Tossicità a lungo termine**

I primi segni di un'avvelenamento cronico da zinco nel maiale sono: dimagrimento, ridotto appetito e riduzione del coefficiente di conversione alimentare. Inoltre si osservano artriti, gastriti, enterite catarrale, congestione del mesentero ed emorragie dei ventricoli cerebrali dei linfonodi e della milza (Brink *et al.*, 1959).

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

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

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

Un eccesso di zinco si è dimostrato avere effetti teratogenetici su embrioni di rana e pesci, probabilmente per inibizione della sintesi del DNA. Al contrario non esistono ancora conferme che un eccesso di zinco possa produrre effetti teratogeni nei mammiferi mentre sembra avere effetti protettivi contro alcune sostanze teratogeniche

come il calcio EDTA (Dawson et al, 1988; Fort *et al.*, 1989; Leonard and Gerber, 1989). Analogamente è stato dimostrato che la somministrazione in criceti di sali zinco in associazione a sali di cadmio può ridurre gli effetti teratogenici di quest'ultimi (NAS, 1979). Se non è stato ancora dimostrato che l'eccesso di zinco possa avere effetti teratogenici sui mammiferi, chiaramente teratogenica è la carenza (Dawson et al, 1988; Leonard and Gerber, 1989). Gli studi di Ferriera *et al.* (1989) hanno dimostrato che nei ratti una grave carenza materna di zinco può portare a malformazioni fetali in tutti i tessuti anche se le malformazioni scheletriche risultano le più comuni, probabilmente a causa di una riduzione della proliferazione cellulare e della attività della fosfatasi alcalina dell'osso (Leonard and Gerber, 1989).

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

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

#### **5.9.6 Effetti mutageni**

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

positive, dose-dipendenti in cellule linfatiche del topo o cellule ovariche di cavia; mentre studi sulla mutagenicità dello zinco inorganico su *Salmonella* spp hanno dato esito negativo (Thompson *et al.*, 1989).

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

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

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

### **5.9.7 Effetti cancerogeni**

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

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

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

### **5.9.8 Effetti immunodepressivi**

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

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

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

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

### **5.9.9 Impatto ambientale**

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

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

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

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

# CONTRIBUTO ORIGINALE

## INTRODUZIONE

Fatte salve le premesse esposte nell'introduzione della parte compilativa di questo studio, occorre giustificare le motivazioni che ci hanno spinto alla scelta di determinate specie piuttosto che di altre come rivelatrici di possibili modificazioni dell'ambiente ed essere quindi "sentinelle" riguardo a possibili stati di sofferenza e/o di malattia per l'animale e per l'uomo.

Tenendo presente che le attuali situazioni climatiche rendono, in misura minore o maggiore, universali le condizioni dei diversi ambiti in cui gli organismi viventi risiedono, abbiamo tuttavia ritenuto di scegliere come "sentinelle" specie animali che possono essere considerate appartenenti a territori circoscritti.

Ovviamente, chi compie ricerche in questo settore si trova di fronte a difficoltà di diversa natura (animali che compiono spostamenti migratori stagionali, inquinanti che giungono nell'ambiente considerato anche da molto lontano tramite precipitazioni atmosferiche, venti, differente sensibilità di specie nei confronti dei medesimi inquinanti, ecc).

Al fine di semplificare e rendere il più organico possibile il nostro studio abbiamo ritenuto opportuno, almeno in questa fase iniziale, fare cadere la nostra scelta sulle seguenti specie animali:

1. Cinghiale (*Sus scrofa*) quale animale terrestre, onnivoro, semistanziale;
2. Piccione (*Columba livia*) quale animale sensibile alle variazioni della qualità dell'aria, stanziale;
3. Anatra (*Anas platyrhynchos*) quale animale di aria, di acqua dolce, di terra, migratore;
4. Girini (*Xenopus laevis*) quali animali di acqua dolce, stanziali;
5. Mitili (*Mytilus galloprovincialis*) quali animali marini, stanziali;
6. Tartarughe marine (*Caretta caretta*) quali animali marini, migratori.

Su queste specie sono stati effettuati tests tossicologici e, per ciò che ci riguarda, indagini anatomo-istopatologiche.

Ci ha incoraggiato all'approfondimento dell'argomento trattato anche il fatto che in letteratura risultano essere assai carenti gli studi anatomoistopatologici che riguardano animali non trattati sperimentalmente e quindi più rispondenti alle reali situazioni ambientali.

## **6. IL CINGHIALE – QUALE MONITOR AMBIENTALE**

### **Introduzione**

Per la loro dieta onnivora i suidi in genere, e quelli selvatici in particolare, che non possiedono restrizioni alimentari e per i quali non vi sono controlli nella filiera produttiva, si rivelano animali molto utili nelle opere di monitoraggio ambientali.

In questo quadro il cinghiale s'inserisce a tutti gli effetti come anello di congiunzione fra le quote di metalli pesanti presenti nel suolo, nei vegetali e negli animali di cui si ciba e le altre specie animali, compreso l'uomo, che possono, a loro volta, nutrirsi del suide.

Si è scelto il cinghiale (*Sus scrofa*), inoltre, per arricchire la letteratura, abbastanza scarna in Italia, relativa al fenomeno dell'accumulo di metalli pesanti in tessuti animali, considerando anche diversi parametri come sesso, età e provenienza degli animali.

### **Materiali e metodi**

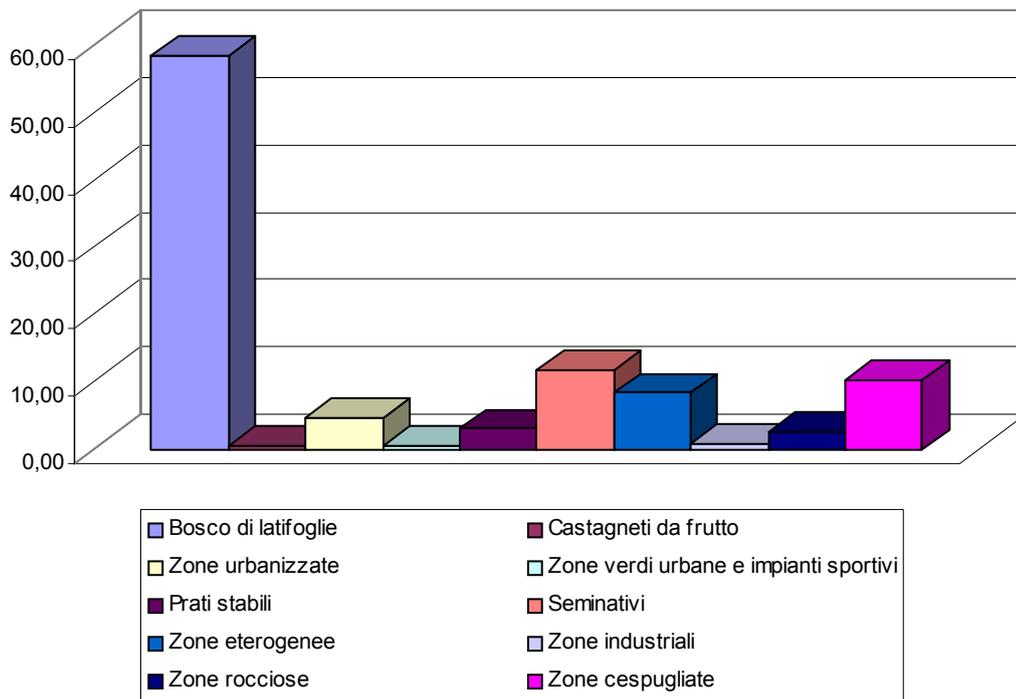
#### **Area di campionamento**

L'area in cui sono stati effettuati i campionamenti degli animali rientra nella provincia di Bologna; trattasi di zone appartenenti al comune di Montereenzio, territori situati su bassa collina, in cui i

cinghiali vivono da ormai molto tempo. Tali aree, localizzate sulla parte destra del fiume Idice (Fig. 1), sono caratterizzate da un'ampia copertura boschiva a latifoglie (58.3%), cui fanno seguito come percentuale di copertura le aree a seminativo (11.68%), eterogenee (11.68%), intese come aree in cui il 30% della superficie è cespugliato e la restante parte è zona aperta, e cespugliate (10.23%), come evidenziato in Fig. 2. Queste caratteristiche rendono l'area estremamente vocata per il cinghiale. Va inoltre tenuto presente che la presenza di aree urbanizzate e ancora di più di quelle industrializzate è estremamente ridotta (rispettivamente 4.63% e 0.69%).



Fig. 1- Localizzazione dell'area di studio.



**Fig. 2-** Uso del suolo nell'area oggetto di studio, espresso come percentuale rispetto all'estensione totale della stessa.

### **Modalità di campionamento.**

La disponibilità di esemplari di *Sus scrofa* utilizzati nell'indagine è stata conseguente all'abbattimento di cinghiali nell'ambito dei piani di controllo della specie con tecnica della battuta di caccia.

Gli interventi sono stati eseguiti nei mesi di novembre e dicembre 2001 e gennaio e febbraio 2002. In totale sono stati ottenuti 21 esemplari, immediatamente eviscerati dopo l'abbattimento. Per ogni soggetto è stata redatta un'apposita scheda identificativa nella quale venivano riportati il luogo di provenienza, il sesso, l'età degli animali, lo stato generale della carcassa, la presunta causa di morte e tutti i rilievi anatomo-patologici effettuati in sede di autoptica.

Nel corso dell'autopsia sono stati effettuati prelievi di organi quali fegato, reni, testicoli, cervello, polmoni, milza, muscoli diaframma,

massetere, della coscia, occhi e cuore; questi venivano regolarmente identificati e conservati in congelatore a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'esecuzione delle analisi.

### **Analisi tossicologiche**

Nell'effettuare questo studio, tutti i procedimenti analitici, i reattivi e gli standard utilizzati erano adeguati e rispondevano ai requisiti richiesti per la valutazione dei metalli pesanti.

### **Analisi anatomo-istopatologiche**

Campioni di fegato, rene, polmone, testicoli, milza e linfonodi degli animali abbattuti sono stati fissati in formalina di Carson, inclusi in paraffina, sezionati a  $5\mu$  e colorati con ematossilina-eosina ai fini dell'esame istologico.

Come controllo sono stati visionati 10 preparati istologici di rene e fegato appartenenti a suini allevati che avevano fino ad 1 anno di età ed erano in buone condizioni di salute.

### **Analisi statistica**

L'analisi statistica dei dati è stata condotta con il programma SPSS mediante il test dell'analisi della varianza (ANOVA) applicato ai valori riscontrati in ogni singolo tessuto in funzione del sesso e della classe di età di appartenenza dei soggetti. Ogni qualvolta un dato analitico fosse risultato inferiore al LOD, a questo, per i soli fini statistici, veniva sostituito un valore pari alla metà del LOD stesso, al fine di poter eseguire l'analisi statistica su tutti i dati disponibili. La significatività statistica è stata posta allo 0.05.

## Risultati

In tabella 1 viene riportata la composizione del campione in funzione dell'età (espressa come classe di appartenenza) e del sesso dei 22 soggetti utilizzati. Si ricorda che la classificazione in funzione dell'età degli animali è basata su quanto definito dall'Istituto Nazionale della Fauna selvatica e di seguito riportato: **classe 0**: lattonzoli, da 0 a 4 mesi, cuccioli che presentano un mantello a fasce longitudinali giallastre e marrone scuro (striati) mantenuto fino all'età di circa quattro mesi; **classe 1**: animali con età compresa fra 4 e 12 mesi (cosiddetti "rossi" o porcastri) caratterizzati dal mantello rossiccio che permane fino all'età di circa un anno; **classe 2**: soggetti con età compresa fra 1 e 2 anni (porcastroni/e); **classe 3**: soggetti da 2 anni a 5/6 anni (adulti, verri e scrofe), con mantello bruno scuro, che rappresentano la classe dei riproduttori; **classe 4**: soggetti da 6/7 anni in poi, definiti anziani (solenghi e scrofe).

Parametro		N. soggetti	
Sesso	Classe di età	Per classe	Totale
Maschi			14
	Classe 0	/	
	Classe 1	9	
	Classe 2	/	
	Classe 3	1	
	Classe 4	2	
Femmine			7
	Classe 0	/	
	Classe 1	2	
	Classe 2	/	
	Classe 3	1	
	Classe 4	4	
			<b>21</b>

**Tab. 1-** Composizione per sesso e classe di età del campione utilizzato.

La maggior presenza di soggetti di classe 1 è legata al fatto che la tecnica di caccia adottata, la braccata, comporta l'inseguimento di branchi di cinghiali, composti, come già illustrato nella sezione riguardante la biologia della specie, da femmine accompagnate dai piccoli dell'anno e di quello precedente. È quindi più facile l'abbattimento di questi soggetti e ciò spiega questa relativa disomogeneità del campione; in realtà questa composizione riflette la reale struttura per età dei branchi, che prevede una certa preponderanza di soggetti giovani rispetto agli adulti.

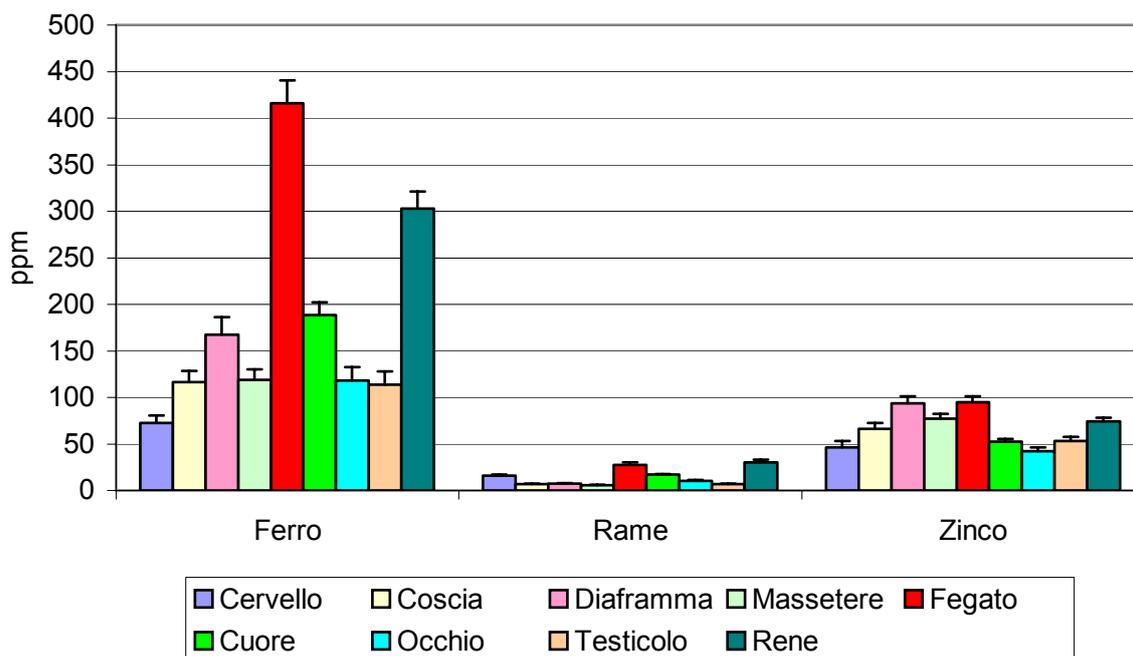
Per quanto riguarda la strutturazione per sesso, va sottolineato come la preponderanza di maschi sia dovuta ad un'elevata

presenza di questi nel campione di classe 1 (9 vs. 2 femmine); a testimonianza di come la tecnica di caccia possa influenzare la composizione del campione, ma rifletta d'altronde quella dei branchi braccati, si deve sottolineare come vi sia una notevole preponderanza di femmine nelle classi 3 e 4 (5 vs. 3 maschi in totale), a testimonianza dell'estrema difficoltà di abbattimento di soggetti maschi adulti (che vivono solitari) con questa tecnica di caccia.

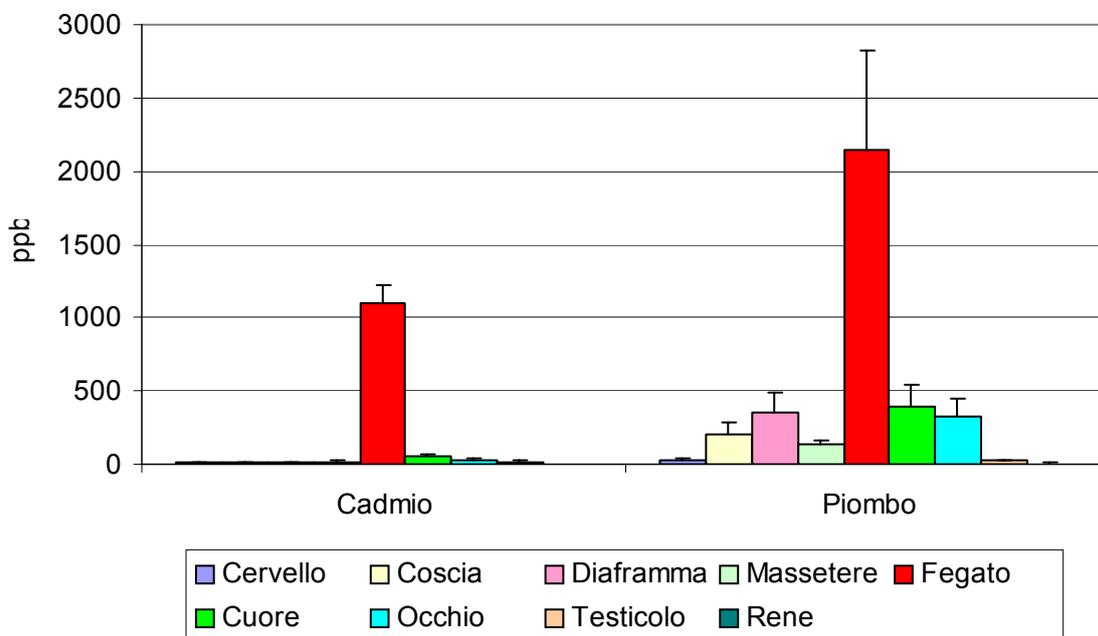
### **Risultati tossicologici**

Le concentrazioni di metallo sono espresse sempre sulla base del peso secco e sono riportate come valore medio  $\pm$  errore standard; qualora, nel raffronto con la bibliografia, si presenti l'esigenza di confrontare dati relativi a concentrazioni espresse su peso fresco, queste ultime venivano convertite applicando coefficienti numerici prestabiliti e specifici per ciascun organo, secondo quanto indicato da Strand *et al.* (1995) e riportato fedelmente da Frøslie *et al.* (2001) e pari a **2.76** per il **rene**, **3.66** per il **fegato** e **3** per tutti gli **altri tessuti**.

I valori medi  $\pm$  e.s. e i range di variazione rilevati nei tessuti analizzati sono riportati nelle figure 3 e 4.



**Fig. 3:** Concentrazioni medie ( e.s. di ferro, rame e zinco ( $\mu\text{g/g}$  tessuto secco) rilevate nei tessuti di cinghiale analizzati.



**Fig. 4:** Concentrazioni medie  $\pm$  e.s. di cadmio e piombo ( $\text{ng/g}$  tessuto secco) rilevate nei tessuti di cinghiale analizzati.

## **Risultati istopatologici**

A livello epatico si osserva costantemente degenerazione vacuolare, prevalentemente perilobulare (Foto 8), congestione e, in qualche caso, dissociazione focale delle lamine. In un caso si è osservato nello spazio porto-biliare un'infiltrato infiammatorio composto prevalentemente da granulociti neutrofilici (Foto 10; 11). In quasi tutti gli animali erano presenti strutture linfoidi simil-follicolari (Foto 9).

In un fegato si evidenzia un diffuso fenomeno di capillarizzazione con dilatazione dello spazio del Disse. Raramente si presentano fenomeni infiammatori. Soprattutto laddove le lamine epatiche si mostrano dissociate, si repertano all'interno degli epatociti piccoli corpi inclusi citoplasmatici a volte debolmente eosinofili, a volte decisamente basofili circondati da un alone chiaro (Foto 7).

I reni mostrano intensi fenomeni congestivi, elevata cellularità glomerulare e, in alcuni casi, aumento della matrice mesangiale. In un caso era presente una diffusa nefrite interstiziale, la cui componente cellulare era rappresentata principalmente da linfociti e plasmacellule (Foto 12; 13; 14).

I polmoni sono costantemente in preda a manifestazioni di polmonite interstiziale di tipo cronico con presenza, oltre che di linfociti e plasmacellule, anche di numerosi granulociti eosinofili (Foto 2; 3; 4; 5). In alcuni casi si reperta edema alveolare (Foto 6), iperplasia del BALT (Foto 1). Costante è la congestione.

Null'altro di significativo si segnala negli altri tessuti ed organi osservati.

## DISCUSSIONE

La letteratura si dimostra molto povera di studi effettuati sulle lesioni isto-patologiche rientranti in quadri d'intossicazioni acute e croniche da metalli pesanti negli Ungulati selvatici. Per il cinghiale non è stato rilevato nessun lavoro trattante l'argomento; la maggior parte degli studi riguarda le specie animali da laboratorio, mentre scarno si dimostra il panorama di indagini svolte sul capriolo.

Proprio in questa specie sono stati recentemente riveduti gli aspetti di lesività renale provocati da esposizioni continuate al cadmio in alcune zone della parte est dell'Austria (Beiglböck *et al.*, 2002). Le lesioni renali osservate in questi animali vanno dalla degenerazione vacuolare alla necrosi, dall'ispessimento della capsula del Bowman alla nefrocalcinosi, dalla deposizione di pigmenti al rigonfiamento glomerulare e alla fibrosi interstiziale. Questi ultimi due reperti, e anche le infiltrazioni linfo-istiocitarie osservate, furono associate all'età degli animali, come già riportato in indagini svolte sul ratto e sul cane (Chennekatu *et al.*, 1986; Robertson, 1986). Le frequenze delle deposizioni di pigmenti e dell'ispessimento della capsula del Bowman furono collegate sia all'età degli animali, sia alle elevate quote di cadmio presenti nel rene (fino a 22 ppm, di molto superiori alle nostre), che, quindi, rivestono anche un ruolo aggravante gli effetti degenerativi che si instaurano con l'età stessa. Furono inoltre osservate alterazioni a carico nucleare cellulare, quali rigonfiamento, cariolisi e picnosi, messi in stretta dipendenza solo con le quote di cadmio. Anche sull'origine della necrosi e della degenerazione vacuolare furono addotte le stesse ipotesi; in effetti questi reperti

fanno parte del quadro istologico tipico di animali cronicamente esposti al metallo. In particolare sono ampiamente noti gli effetti prodotti dal metallo a livello di tubulo prossimale, le cui cellule sono il vero target dell'intossicazione, e che includono soprattutto la necrosi. Questo spiega anche la maggiore concentrazione di cadmio nella corticale, dove i tubuli prossimali si trovano, che si riscontra normalmente a livello renale (Tataruch, 1993; Nowak, 1995), confermata anche nel presente studio.

Anche gli effetti tossici renali del piombo sono ben conosciuti e includono alterazioni mitocondriali, formazione di corpi inclusi nelle cellule dell'epitelio tubulare, fibrosi interstiziale e sia ipertrofia che atrofia dei tubuli stessi e dei glomeruli (Goyer, 1989; Nolan e Shaikh, 1992). A livello epatico si osservano degenerazione vacuolare e picnosi nucleare (Venugopal e Luckey, 1978). A livello di apparato genitale maschile si ricordano la succitata depressione della produzione di spermatogoni, cui si aggiunge il classico reperto dell'iperplasia prostatica (Friberg *et al.*, 1986). In ultimo bisogna citare le alterazioni degenerative che si instaurano a livello cerebrale e di midollo spinale, comprese anch'esse nel quadro del saturnismo (Venugopal e Luckey, 1978).

Per quanto riguarda le lesioni organiche correlate agli altri metalli oggetto del presente studio, si rimanda alla descrizione delle stesse inclusa nel capitolo dei metalli pesanti.

Al di là dei dati riportati in letteratura, per la maggior parte delle lesioni istologiche rinvenute nel presente lavoro non esiste una sicura correlazione con stati tossici causati dai metalli pesanti piombo, cadmio, ferro, zinco e rame. D'altra parte le basse

concentrazioni di detti metalli, e soprattutto di cadmio e piombo, che qui si osservano non forniscono substrato adatto per spiegare i fenomeni stessi, la cui presenza richiede dosaggi decisamente superiori (Tohyama *et al.*, 1987; Swiergosz *et al.*, 1998).

La presenza nel fegato di degenerazione vacuolare, soprattutto in posizione perilobulare, può rappresentare un quadro di moderata intossicazione che, comunque, non assume mai caratteristiche di stretta specificità.

La presenza dei piccoli corpi inclusi, sia eosinofili che basofili, era già stata segnalata, sempre nei cinghiali, nella tesi di laurea della Dott.ssa Maria Maddalena Mondelli (1999, Relatore Prof. Paolo Simoni), nella quale sia colorazioni istochimiche (PTAH) che osservazioni al microscopio elettronico a trasmissione avevano consentito di definire la natura degli stessi come corpi proteici contenenti nuclei di fibrina. Questi reperti erano stati interpretati come una riespressione da parte degli epatociti di capacità fagocitarie, da porsi forse in relazione con episodi aspecifici di stati tossici.

A livello renale, l'elevata cellularità glomerulare presente nella maggior parte degli individui può essere messa in relazione con il fatto che gli animali abbattuti erano in prevalenza di età adulta, ed è rilievo costante in tutte le specie di mammiferi che i processi di invecchiamento contemplino un aumento delle cellule, prevalentemente mesangiali, all'interno dei glomeruli.

I quadri costanti di polmonite interstiziale, che apparentemente non minano lo stato di benessere degli animali, sembrano rappresentare

fenomeni di adattamento a reiterati episodi infettivi e/o infestivi, comunemente riscontrati in molti animali selvatici.



## **7. IL PICCIONE – QUALE MONITOR AMBIENTALE**

### **Introduzione**

La scelta del piccione è stata determinata dal fatto che gli appartenenti a questa specie si possono considerare stanziali ed essere quindi esempi significativi delle reazioni dell'organismo animale a sollecitazioni facilmente individuabili e quantificabili.

La ricerca viene effettuata seguendo 2 canali diversi: il primo consiste nella quantificazione relative di possibili inquinanti quali i metalli pesanti in diversi organi e tessuti, il secondo nell'osservare se ci siano alterazioni macro e microscopiche fra i diversi gruppi rappresentanti ambienti diversi.

### **Materiali e metodi**

#### **Area di campionamento**

Le aree individuate per il campionamento degli animali da utilizzare per l'esecuzione della ricerca sono comprese nei territori dei comuni di Ferrara (FE), Pieve di Cento (BO) e Lendinara (RO) (Fig. 1); le postazioni di cattura erano situate in corrispondenza dei centri storici delle tre città.



**Fig. 1:** Localizzazione dei comuni oggetto di campionamento.

### **Modalità di campionamento**

La disponibilità degli esemplari di *Columba livia* utilizzati per l'esecuzione dell'indagine era conseguente ad una loro cattura con reti operata, nell'ambito dei piani di controllo della specie, nei siti individuati e ad una loro successiva soppressione per dislocazione delle vertebre cervicali. Le carcasse venivano poi conferite in giornata alla Sezione di Patologia Aviare del Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna, dove veniva eseguita l'autopsia.

Per tutti i 54 esemplari a disposizione è stata redatta un'apposita scheda identificativa nella quale venivano riportati il luogo di provenienza, il sesso, l'età degli animali, lo stato generale della carcassa, la presunta causa di morte e tutti i rilievi anatomico-patologico effettuati in sede autoptica.

Nel corso dell'autopsia venivano effettuati prelievi di tessuto renale, polmonare, pancreatico, splenico ed epatico, che venivano fissati,

opportunamente identificati, in formalina tamponata. Aliquote di tessuto renale ed epatico venivano inoltre conservate in congelatore a  $-20^{\circ}\text{C}$  fino al momento dell'esecuzione dell'analisi tossicologiche.

### **Tecnica analitica**

Per tutti i procedimenti analitici i reattivi e gli standard utilizzati rispondevano ai requisiti richiesti per la valutazione dei metalli pesanti.

### **Analisi anatomo-istopatologiche**

I campioni di tessuto (fegato, rene, milza e polmone) sono stati fissati in formalina di Carson, inclusi in paraffina, sezionati a circa  $5\ \mu$  e colorati con E&E. Le osservazioni al microscopio ottico sono state svolte usando obiettivi da 5 a 40X.

### **Analisi statistica**

L'analisi statistica dei risultati è stata condotta con il Programma SPSS, mediante il test non parametrico di Kruskal-Wallis applicato ai valori delle quote residuali dei singoli metalli reperiti in ciascun animale. In particolare i confronti eseguiti investono le differenze rilevate in rapporto all'età degli animali, al sesso e al territorio di provenienza. Si è inoltre cercato di correlare i reperti anatomo-istopatologici con le concentrazioni tessutali dei vari metalli, al fine di valutare un possibile legame tra eventuali lesioni riscontrate e presenza di tossici.

## Risultati

### Risultati dell'indagine tossicologici

La tabella 1 riporta la suddivisione del campione in funzione della provenienza, del sesso e dell'età dei 54 soggetti utilizzati. La suddivisione in funzione dell'età degli animali è basata sulla loro dipendenza dai genitori e può essere così riassunta: 1) **nidiacei**, soggetti non assolutamente autonomi e oggetto di cure parentali per la sopravvivenza; 2) **giovani**, soggetti di un anno di età non ancora sessualmente maturi; 3) **adulti**, soggetti a piena maturità sessuale.

<u>Area</u>		<u>Sesso</u>		<u>Classi di età</u>		
	<b>Totale</b>	Maschi	<b>Femmine</b>	<b>Nidiacei</b>	<b>Giovani</b>	<b>Adulti</b>
<b>Ferrara</b>	26	18	8	/	3	23
<b>Pieve di Cento</b>	18	8	10	2	1	15
<b>Lendinara</b>	10	7	3	/	2	8
<i>Totale</i>		33	21	2	6	46

**Tab. 1:** Composizione per provenienza, classi di età e sesso del campione utilizzato.

Come primo passo nell'analisi dei campioni per la valutazione dei livelli di metalli pesanti nei tessuti di piccione si è provveduto ad operare una validazione delle metodiche utilizzate; in tabella 2 sono riportati per tutti gli elementi i valori ottenuti per i principali parametri valutati, limite di sensibilità (LOD), percentuale di recupero (%) e coefficiente di variazione (CV).

<b>Elemento</b>	<b>LOD (ng/g)</b>	<b>%</b>	<b>CV (%)</b>
Arsenico	2	90	< 10
Cadmio	2	90	< 10
Cromo	1	98	< 10
Manganese	10	95	< 10
Piombo	1	95	< 10
Rame	10	96	< 10

**Tab. 2-** Principali parametri considerati nella validazione delle metodiche applicate.

L'analisi statistica dei dati relativi alle concentrazioni dei singoli metalli nel tessuto epatico e renale di piccione, quando effettuata in funzione della provenienza dei campioni, non ha evidenziato, per nessuno degli elementi, particolari differenze. Si è quindi deciso di effettuare l'analisi in funzione dell'età e del sesso dei soggetti considerando tutti gli animali come appartenenti ad un unico gruppo. Ciò ha consentito di aumentare la numerosità del campione e di migliorare la potenza dell'analisi statistica.

I risultati delle indagini relative al reperimento dei metalli nei tessuti epatico e renale di piccione sono riportati nelle tabelle 3, 4 e 5

rispettivamente in funzione dell'età, del sesso e della provincia di provenienza, riassunti come valori medi  $\pm$  e.s. e range di variazione. Quando i dati vengono valutati in funzione dell'età, differenze statisticamente significative emergono per cadmio, manganese e rame (sempre  $p < 0.01$ ) a livello epatico e per il solo cadmio ( $p < 0.01$ ) a livello renale, mentre non si evidenziano differenze per arsenico, cromo e piombo. Nello specifico, i valori più elevati di cadmio si riscontrano, per entrambi i tessuti, negli esemplari adulti, con valori medi pari a  $2218 \pm 1483$  ppb nel fegato e a  $17520 \pm 15675$  ppb nel rene. Per quanto riguarda il manganese, i nidiacei presentano concentrazioni epatiche medie pari a  $14 \pm 1$  ppm, mentre gli altri due gruppi si attestano su valori pari a  $11 \pm 1$  ppm e a  $10 \pm 2$  ppm rispettivamente nei giovani e negli adulti, che risultano quindi perfettamente comparabili tra loro. Infine, per quanto riguarda le concentrazioni medie di rame, si può osservare come sia possibile osservare un progressivo decremento dei livelli epatici, che raggiungono i  $90 \pm 1$  ppm nei nidiacei vs.  $33 \pm 5$  ppm nei giovani e  $30 \pm 9$  ppm negli adulti ( $p < 0.01$ ).

Quando venga considerato il sesso degli animali, una significatività statistica ( $P < 0.01$ ) caratterizza solo il raffronto dei tassi renali di arsenico: i soggetti di sesso femminile presentano infatti una concentrazione circa doppia rispetto ai maschi ( $715 \pm 735$  ppb vs.  $324 \pm 291$  ppb rispettivamente). Per tutti gli altri metalli non è dato rilevare alcuna differenza significativa.

Le concentrazioni epatiche medie riscontrate sono superiori a quelle renali per l'arsenico ( $1621 \pm 2703$  ppb vs.  $476 \pm 540$  ppb) e il cromo ( $344 \pm 745$  ppb vs.  $198 \pm 342$  ppb), mentre per cadmio ( $1938 \pm 1527$

ppb vs  $15020 \pm 15664$  ppb), manganese ( $10 \pm 2$  ppm vs.  $27 \pm 7$  ppm) e piombo ( $669 \pm 863$  ppb vs.  $955 \pm 706$  ppb) si osserva la situazione opposta; per quanto riguarda il rame ( $32 \pm 14$  ppm vs.  $36 \pm 7$  ppm) si rileva una situazione di perfetta comparabilità.

Età	N.	Tessuto epatico					
		Media $\pm$ e.s.					
		Min-max					
		As (ng/g)	Cd (ng/g)	Cr (ng/g)	Cu ( $\mu$ g/g)	Mn ( $\mu$ g/g)	Pb (ng/g)
Nidiacei	2	$1205 \pm 373$ 941-1469	$97 \pm 22$ 82-113	$158 \pm 45$ 126-189	$90 \pm 1$ 90-91	$14 \pm 1$ 14-15	$609 \pm 149$ 504-714
Giovani	6	$1251 \pm 577$ 144-1745	$404 \pm 210$ 148-678	$227 \pm 134$ 71-440	$33 \pm 5$ 26-40	$11 \pm 1$ 9-13	$726 \pm 349$ 291-1271
Adulti	46	$1688 \pm 2921$ 144-20283	$2218 \pm 1483$ 403-8601	$367 \pm 805$ 12-4459	$30 \pm 9$ 0-44	$10 \pm 2$ 6-14	$665 \pm 929$ 206-6491
		Tessuto renale					
		Media $\pm$ e.s.					
		Min-max					
		As (ng/g)	Cd (ng/g)	Cr (ng/g)	Cu ( $\mu$ g/g)	Mn ( $\mu$ g/g)	Pb (ng/g)
Nidiacei	2	$307 \pm 237$ 139-475	$29 \pm 5$ 26-33	$118 \pm 37$ 93-144	$39 \pm 6$ 34-43	$38 \pm 10$ 31-45	$519 \pm 42$ 489-548
Giovani	6	$271 \pm 250$ 132-758	$845 \pm 943$ 51-2498	$98 \pm 57$ 35-200	$41 \pm 9$ 29-54	$27 \pm 7$ 18-36	$1585 \pm 1265$ 695-3829
Adulti	46	$510 \pm 572$ 94-2785	$17520 \pm 15675$ 1371-66885	$215 \pm 368$ 9-2128	$35 \pm 7$ 23-48	$26 \pm 7$ 17-49	$891 \pm 586$ 368-3139

**Tab. 3-** Concentrazioni di metalli rilevate nei tessuti epatico e renale (peso secco) di piccione suddivise in funzione dell'età degli esemplari esaminati.

Età	N.	Tessuto epatico					
		Media ± e.s.					
		Min-max					
		As (ng/g)	Cd (ng/g)	Cr (ng/g)	Cu (µg/g)	Mn (µg/g)	Pb (ng/g)
Maschio	33	1321 ± 815 144-3620	1925 ± 1073 403-4480	472 ± 930 12-4459	30 ± 6 13-42	10 ± 2 6-13	734 ± 1089 206-6491
Femmina	21	2092 ± 4232 144-20283	1959 ± 2084 82-8601	142 ± 131 14-476	35 ± 21 0-90	11 ± 2 8-15	567 ± 245 264-1271
		Tessuto renale					
		Media ± e.s.					
		Min-max					
Maschio	33	324 ± 291 94-1356	15488 ± 13580 1388-48698	223 ± 423 9-2128	36 ± 8 23-54	27 ± 7 17-49	865 ± 501 368-2571
Femmina	21	715 ± 735 126-2785	14284 ± 18819 26-66885	160 ± 149 24-614	36 ± 6 28-45	26 ± 6 17-45	1096 ± 941 397-3829

**Tab. 4-** Concentrazioni di metalli rilevate nei tessuti epatico e renale (peso secco) di piccione suddivise in funzione del sesso degli esemplari esaminati.

Provincia	N.	Tessuto epatico					
		Media $\pm$ e.s.					
		<i>Min-max</i>					
		As (ng/g)	Cd (ng/g)	Cr (ng/g)	Cu ( $\mu$ g/g)	Mn ( $\mu$ g/g)	Pb (ng/g)
Ferrara	26	1832 $\pm$ 3788 331-20283	2045 $\pm$ 1178 148-4474	188 $\pm$ 256 12-905	31 $\pm$ 5 21-44	10 $\pm$ 2 6-14	820 $\pm$ 1226 206-6491
Lendinara	10	1647 $\pm$ 761 700-2790	2576 $\pm$ 2558 365-8601	557 $\pm$ 938 47-2486	34 $\pm$ 6 26-42	11 $\pm$ 1 9-13	446 $\pm$ 180 275-816
Pieve di Cento	18	1302 $\pm$ 1087 144-3620	1429 $\pm$ 1113 82-4480	452 $\pm$ 1045 14-4459	33 $\pm$ 23 0-91	11 $\pm$ 2 8-15	576 $\pm$ 146 360-871
		Tessuto renale					
		Media $\pm$ e.s.					
		<i>Min-max</i>					
Ferrara	26	423 $\pm$ 323 94-1356	18241 $\pm$ 18240 112-66885	148 $\pm$ 267 9-1330	38 $\pm$ 6 25-48	27 $\pm$ 8 17-49	1224 $\pm$ 826 503-3829
Lendinara	10	227 $\pm$ 272 130-1000	15642 $\pm$ 15676 628-38485	245 $\pm$ 162 17-515	37 $\pm$ 9 26-54	25 $\pm$ 4 19-33	824 $\pm$ 636 368-2381
Pieve di Cento	18	691 $\pm$ 792 124-2785	10020 $\pm$ 10150 26-32064	244 $\pm$ 489 12-2128	32 $\pm$ 6 23-44	26 $\pm$ 6 18-45	639 $\pm$ 331 393-1776

**Tab. 5-** Concentrazioni di metalli rilevate nei tessuti epatico e renale (di peso secco) di piccione suddivise in funzione dell'area di provenienza degli esemplari esaminati.

## **Risultati dell'indagine anatomo-istopatologici**

Macroscopicamente, non si sono rilevate lesioni degne di nota. Istologicamente, gli organi più colpiti sono risultati essere il fegato ed il rene.

A carico del fegato si sono osservati alcuni casi di più o meno gravi episodi infiammatori con infiltrazione di elementi rotundo-cellulari ed eterofili fra le lamine epatiche ( Foto 7; 11).

Praticamente la totalità dei fegati mostrava degenerazione vacuolare più o meno estese di steatosi ed aree prevalentemente perilobulare (Foto 5).

In alcuni animali si rendevano evidenti piccoli foci congestizi (Foto 5; 6).

Noduletti linfatici di numero e di dimensioni variabili erano presenti nel parenchima di quasi tutti i soggetti esaminati sotto forma di aggregati simil-follicolari (Foto 4).

In un animale si osservavano granulomi presubibilmente di natura micotica (Foto 9; 10).

In alcuni fegati si sono potuti riscontrare ammassi di tipo nodulare di cellule linfocitarie, epiteliodi e polinucleate di tipo Langhans simili a granulomi tubercolari (Foto 8; 12; 13).

Formazioni nodulari simili si osservavano anche nel parenchima polmonare degli stessi soggetti (Foto 1; 2), talvolta polmonite interstiziale (Foto 3).

Alcuni reni mostravano infiltrati interstiziali prevalentemente costituiti da linfociti che denunciavano episodi di nefrite interstiziale cronica. Alcune milze presentavano imponenti episodi di emosiderosi. Null'altro è stato evidenziato a carico degli altri organi e tessuti. In un soggetto si è osservata presenza, a livello epatico di tessuto renale, senza che potessero evidenziarsi limiti fra i due tessuti (Foto 17; 18).

Una qualche differenza pare esistere fra i soggetti appartenenti alle diverse localizzazioni:

gli animali provenienti da Pieve di Cento non erano in preda a gravi manifestazioni patologiche. Nel lume intestinale di alcuni di essi si rinvenivano strutture di tenie (Foto 15; 16);

gli animali provenienti da Ferrara mostravano lesioni significative sia a livello epatico (Foto 8) che polmonare con espressioni morfologiche simil-tubercolari (Foto 1; 2);

gli animali provenienti da Lendinara presentavano lesioni epatiche di tipo simil-tubercolari (Foto 12; 13).

## DISCUSSIONE

Nell'analizzare la composizione del campione per provenienza, età e sesso si può innanzitutto osservare una certa discrepanza, anche se non così accentuata, in funzione della provenienza degli animali, e una ancor maggiore diversità in funzione dell'età.

Nel primo caso il gruppo più consistente è quello di Ferrara (26 esemplari) mentre quello più esiguo è quello di Lendinara (10 capi). Ciò trova giustificazione nel fatto che gli interventi di controllo operati nei tre comuni considerati avevano consistenza diversa, in funzione fondamentalmente di quella che è la reale densità delle tre popolazioni di piccione considerate, e quindi prevedevano prelievi numerici differenziati.

Per quanto riguarda le differenze per età, queste sono principalmente legate alla biologia della specie e alla tecnica di cattura scelta: i nidiacei infatti rimangono nel nido fino a quando non sono in grado di volare e quindi sono raramente catturati con le reti; analogamente, i giovani sono meno oggetto di selezione, anche perché non fanno parte della popolazione attiva dal punto di vista riproduttivo e quindi sono meno "interessanti" nell'ottica di un controllo della popolazione.

Queste diversità vanno tenute ben presenti nell'analisi statistica e nella sua interpretazione, in quanto possono introdurre dei bias, in particolare per quanto riguarda il confronto in funzione dell'età, che possono falsare i risultati ottenuti.

Qualora si rapportino i risultati conseguiti in merito ad una presenza epatica e renale di metalli nel piccione a quanto reperibile in

letteratura anche relativamente ad altre specie animali, è possibile concludere come i tassi rilevati possano essere riguardati quale conseguenza di un'esposizione cronica dei soggetti a livelli ambientali non eccessivamente elevati e come inoltre gli stessi non si dimostrino tali da incidere in maniera significativa sulle capacità riproduttive della specie, in quanto risultano costantemente inferiori ai valori soglia delineati come responsabili di alterazioni a carico dell'attività

Il fatto che non appaia un'evidente correlazione tra i dati tossicologici e quelli istologici può essere dovuto ai bassi dosaggi di metalli rilevati mediante tecnica di assorbimento atomico. Infatti, le lesioni riscontrate al microscopio ottico sono generiche e ascrivibili ad una molteplicità di cause, spesso fra loro sovrapposte, come avviene comunemente in animali che vivono allo stato libero.

In conclusione si può affermare, alla luce di quanto osservato con la presente indagine, che il piccione si conferma un valido biomonitor per la valutazione della qualità del suo ambiente di vita e, quale specie sintropica, anche per quello dell'uomo. L'esposizione a contaminanti ambientali si rivela di tipo cronico e a bassi livelli, che non sono in grado di indurre particolari lesioni o sintomatologie negli animali. Conseguentemente, non è stato possibile rilevare correlazioni tra i livelli di metalli e le lesioni a livello istologico. L'analisi dei tessuti da un punto di vista istopatologico si rivela quindi inefficace nell'identificare particolari esposizioni ad inquinanti, quando queste siano, come nel presente studio, di natura cronica e per livelli che, seppure al di sopra dei livelli di background comunemente definiti, non si dimostrano lesivi per gli animali.

Il reperimento, in alcuni soggetti, di lesioni simil-tubercolari può costituire un campanello d'allarme riguardo alla possibilità di contaminazione nei confronti di altri animali e dell'uomo (zoonosi). Più in generale, le manifestazioni di tipo infiammatorio rilevate in molti soggetti (non influenzanti comunque la composizione numerica della popolazione) può essere testimonianza di un raggiunto equilibrio fra le popolazioni stesse, gli agenti infettivi e/o infestanti e l'ambiente nel quale vivono altre specie animali, uomo compreso.

## **8. LA CARETTA CARETTA – COME MONITOR AMBIENTALE**

### **Introduzione**

La tartaruga marina *Caretta caretta* è stata oggetto di studio per verificare se i livelli di metalli pesanti e metalloidi sono tali da indurre negli animali osservati manifestazioni patologiche di una certa gravità e se gli spiaggiamenti possono essere conseguenti ad assunzione di tali contaminanti.

La tartaruga marina, sebbene non dimori abitualmente in siti prestabiliti, in questi ultimi anni sta modificando le proprie abitudini. Sempre più di frequente si rinviene la presenza di balanidi sul carapace, segno evidente della stanzialità dell'animale. L'alterazione del comportamento è causata dall'antropizzazione delle fasce costiere e degli imbocchi naturali ed artificiali (canali portuali), infatti gli risulta più facile alimentarsi in quanto si sono osservate delle vere e proprie crescite esponenziali della flora e fauna ivi presente e che rappresentano la loro dieta base.

Occorre tenere presente che l'uso delle sostanze chimiche aumenta quotidianamente nell'industria, nell'agricoltura e nelle abitazioni. L'ambiente acquatico è particolarmente sensibile rispetto a quello terrestre. I livelli di alcune di queste sostanze risultano più elevati nell'ecosistema costiero e marino a causa dell'afflusso dei fiumi così

come dal dilavamento dei terreni e dall'inquinamento diretto. Mentre sono ancora presenti rischi provenienti da fonti inquinanti locali come ad esempio le industrie e gli scarichi degli impianti di depurazione delle acque urbane, continuano ad esserci preoccupanti fonti di inquinamento non identificabili. In particolare, con la crescita della popolazione, le richieste di energia e l'industrializzazione, il rischio del trasporto atmosferico e di deposito di determinate sostanze chimiche è in aumento, ad esempio il mercurio, vengono trasportate in tutte le aree incluso l'Artico e l'Antartico.

## **Materiali e metodi**

Nel 2003 sono state trovate spiagge lungo la costa adriatica della Romagna (Foce fiume Reno, long. 12° 17' est, lat. 44°38' nord, Cattolica long. 12° 45' est lat. 43° 57' nord) (Fig 1) 11 esemplari di *Caretta caretta* (Foto 1).

Gli individui recuperati sono stati sottoposti ad autopsia che ha portato al prelievo di campioni di cuore, fegato, muscolo, osso e rene per l'analisi di metalli pesanti (Cd, Cr, Hg, Pb, e Se) e metalloidi (As) e per indagini di tipo anatomo-isto-patologico.

I campioni sono stati raccolti in sacchetti di plastica singoli e posti in freezer a -20 °C in attesa delle analisi tossicologiche; da altri campioni sono stati eseguiti strisci e impronte per le indagini citologiche, colorati con metodo May-Grünwald-Giemsa. Gli stessi da sottoporre ad indagini istopatologiche, sono stati fissati in formalina secondo Carson ed inclusi in paraffina. Le sezioni di

5µm di spessore sono state colorate con Ematossilina & Eosina (E&E).



Fig 1: Tratto di costa adriatica.

## Risultati

### Risultati dell'indagine tossicologica

In tabella 1 e in Fig. 1 e 2 sono riportati i valori medi  $\pm$  e.s. e i range di variazione relativi alle concentrazioni di ogni singolo metallo analizzato nei vari tessuti.

<u>Metallo</u>	<u>Organo</u>				
	<u>Cuore</u>	<u>Fegato</u>	<u>Muscolo</u>	<u>Osso</u>	<u>Rene</u>
Arsenico	28.85 ± 2.08 21.6-37.8	16.27 ± 1.78 6-22.7	83.81 ± 10.34 30.1-144	5.45 ± 1.40 1.02-18	25.2 ± 3.19 14.7-38.8
Cadmio	0.45 ± 0.07 0.20-0.87	1.46 ± 0.20 0.43-2.29	0.17 ± 0.06 < LOD-0.35	0.08 ± 0.01 < LOD-0.13	6.20 ± 2.52 0.57-19.4
Cromo	0.92 ± 0.25 0.41-2.55	0.46 ± 0.08 0.27-0.93	0.56 ± 0.05 0.30-0.91	0.38 ± 0.16 0.13-1.90	0.77 ± 0.15 0.42-1.37
Mercurio	0.75 ± 0.08 0.38-1.32	0.81 ± 0.11 0.34-1.33	0.70 ± 0.10 0.22-1.32	0.03 ± 0.003 0.02-0.06	0.70 ± 0.14 0.16-1.14
Piombo	0.34 ± 0.05 0.20-0.58	0.22 ± 0.02 0.13-0.34	0.10 ± 0.01 < LOD-0.16	1.46 ± 0.25 0.31-2.72	0.35 ± 0.05 0.21-0.55
Selenio	7.34 ± 4.48 4.48-10.5	5.54 ± 2.85 2.85-10.3	4.53 ± 2.52 3.07-6.93	0.74 ± 0.51 0.51-1.12	6.43 ± 0.76 3.90-9.73

**Tab. 1:** valori medi e range di variazione relativi alle concentrazioni per singolo metallo in relazione al tessuto analizzato.

Il metallo reperito alle concentrazioni più elevate è l'**arsenico**, che in tutti i tessuti presenta valori superiori a 1 ppm (da 1.02 ppm nell'osso a 144 ppm nel muscolo).

Tali concentrazioni sono da considerarsi entro i range definiti per un'esposizione di background (inferiori a 100 ppm peso secco per gli organismi marini), ma risultano comunque più elevati rispetto a quanto riscontrato sempre nel bacino dell'Adriatico e in Giappone da altri autori (Storelli & Marcotrigiano, 2000).

L'organo che presenta le maggiori concentrazioni è il muscolo pettorale ( $83.81 \pm 10.34$  ppm), seguito dal cuore, che per altro presenta valori pari a circa un terzo di questo ( $28.85 \pm 2.08$  ppm), dal rene ( $25.2 \pm 3.19$  ppm), dal fegato ( $16.27 \pm 1.78$  ppm) e dall'osso ( $5.45 \pm 1.40$  ppm). Tali risultati sono in accordo con quanto riportato da Storelli e Marcotrigiano (2000), che rilevano concentrazioni circa doppie di metalloide nel muscolo rispetto al fegato e da Sakai *et al.* (2000), che individuano anche un andamento residuale analogo a quanto osservato nel presente studio (muscolo > rene > fegato). Storelli e Marcotrigiano (2000) rilevano una buona correlazione tra peso dell'animale e contenuto di arsenico; le condizioni degli animali utilizzati in questo studio non hanno consentito di ottenere una misurazione del peso affidabile (molti soggetti, sebbene non in avanzato stato di decomposizione, avevano comunque iniziato il processo degenerativo), per cui non è stato possibile verificare l'esistenza di questa relazione anche in questo studio. Niente fa però ritenere che una simile correlazione non debba esistere anche per i soggetti da noi considerati.

Una possibile spiegazione degli elevati livelli di metalloide nei tessuti di *Caretta caretta* può essere la dieta che caratterizza questa specie: le tartarughe marine infatti si nutrono di elevati quantitativi di crostacei, che presentano normalmente e "fisiologicamente" concentrazioni notevoli di arsenico (da < 1 a 70 mg/kg), più elevate negli organismi bentonici (Norin *et al.*, 1985).

I livelli di arsenico reperiti nel presente studio, sebbene in accordo, quale profilo residuale, con quanto riportato da Storelli e Marcotrigiano (2000), sono comunque decisamente più elevati

rispetto a quanto riportato dagli autori. In considerazione di quanto appena sottolineato, nonostante non sia stata effettuata in questo studio una speciazione del metalloide, si può temere per gli animali considerati, al pari di quanto concluso da Storelli e Marcotrigiano (2000), un effetto tossico dell'arsenico a livello epatico. Storelli e Marcotrigiano (2000) infatti valutano i rapporti tra arsenico totale ed inorganico, osservando come la percentuale di forme inorganiche a livello epatico sia decisamente più elevata rispetto a quella nel muscolo e come la quantità di arsenico inorganico aumenti all'aumentare dei livelli di arsenico totale. Poiché le forme inorganiche sono quelle maggiormente tossiche, per un'azione a livello di gruppi sulfidrilici degli enzimi, non è da escludere, sebbene non sia nota l'esatta pericolosità del metalloide per le tartarughe, una certa epatotossicità dei livelli riscontrati nel presente studio.

Il **selenio** è l'elemento che presenta, dopo l'arsenico, le concentrazioni più elevate pur rimanendo nel range di background (40 ppm). Tra gli organi da noi esaminati il cuore presenta la maggior concentrazione ( $7.34 \pm 4.48$  ppm) seguita dal rene ( $6.43 \pm 0.76$  ppm) e dal fegato ( $5.54 \pm 2.85$  ppm). Confrontando i nostri dati con quelli riportati nell'unico studio che valuta le concentrazioni di selenio nei tessuti di *Caretta caretta* (Storelli *et al.*, 1998) è possibile affermare che le concentrazioni di selenio da noi trovate sono inferiori rispetto a quanto riportato dagli autori. Inoltre il profilo residuale definito nello studio di Storelli *et al.* (1998) è in accordo con quanto delineato nel presente studio. In considerazione del ruolo protettivo svolto dal selenio contro i radicali liberi, non stupisce

il fatto che organi particolarmente sensibili quali il cuore siano quelli che presentano le concentrazioni più elevate di metallo.

In analogia con i livelli di selenio inferiori rispetto a quanto reperito in bibliografia anche il **mercurio**, che è strettamente correlato con le concentrazioni di selenio, presenta quantitativi minori rispetto a quelli riportati negli studi considerati (Storelli *et al.*, 1998; Goodley *et al.*, 1999). I risultati sono molto vicini ai valori di background, pari a 1 ppm, e presentano i livelli più elevati nel fegato ( $0.81 \pm 0.11$  ppm), nel cuore ( $0.75 \pm 0.08$  ppm) e nel muscolo ( $0.70 \pm 0.10$  ppm) e rene ( $0.70 \pm 0.14$  ppm), ma comunque la distribuzione è abbastanza omogenea in tutti i tessuti, ad eccezione dell'osso, in accordo con la cinetica del metallo.

Per quanto riguarda il **cromo** i dati ottenuti sono in accordo con quanto ritrovato in letteratura (Storelli *et al.*, 1998) anche se i lavori svolti su questo metallo sono piuttosto scarsi. Dai risultati ottenuti si evince che l'organo dove più concentra è il cuore ( $0.92 \pm 0.25$  ppm) seguito dall'osso ( $0.38 \pm 0.16$  ppm) anche perché ricordiamo che l'osso, ed in particolare la regione epifisaria delle ossa lunghe, è sito di accumulo del metallo.

Il **cadmio** presenta nei vari tessuti presi in considerazione concentrazioni molto variabili, inferiori al LOD nell'osso e nel muscolo, e pari a 19.4 ppm nel rene; il secondo organo in ordine di concentrazione è il fegato ( $1.46 \pm 0.20$  ppm), seguito poi dagli altri organi, che presentano concentrazioni relativamente omogenee tra loro.

La presenza di concentrazioni elevate a livello renale ed epatico rispetto ad altri tessuti è spiegabile ricordando la cinetica del

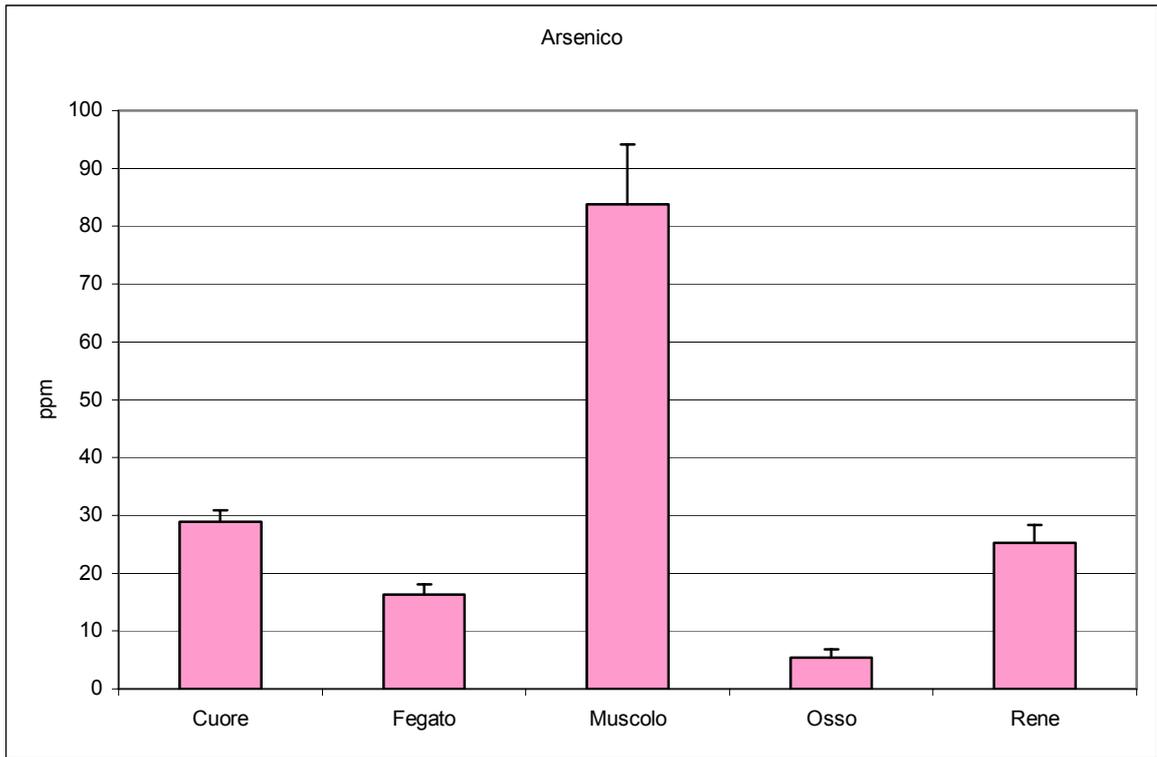
metallo stesso che prevede il legame con metallotioneine a livello epatico e il riassorbimento dei complessi Cd-tionina a livello del sistema tubulare renale.

Queste concentrazioni risultano essere, comunque, inferiori sia ai livelli di background, che negli organismi marini si aggirano sui 100 ppm, che a quelle riscontrate nell'Adriatico meridionale e in Giappone (Storelli et al, 2003; Godley et al, 1999; Sakai, 2000).

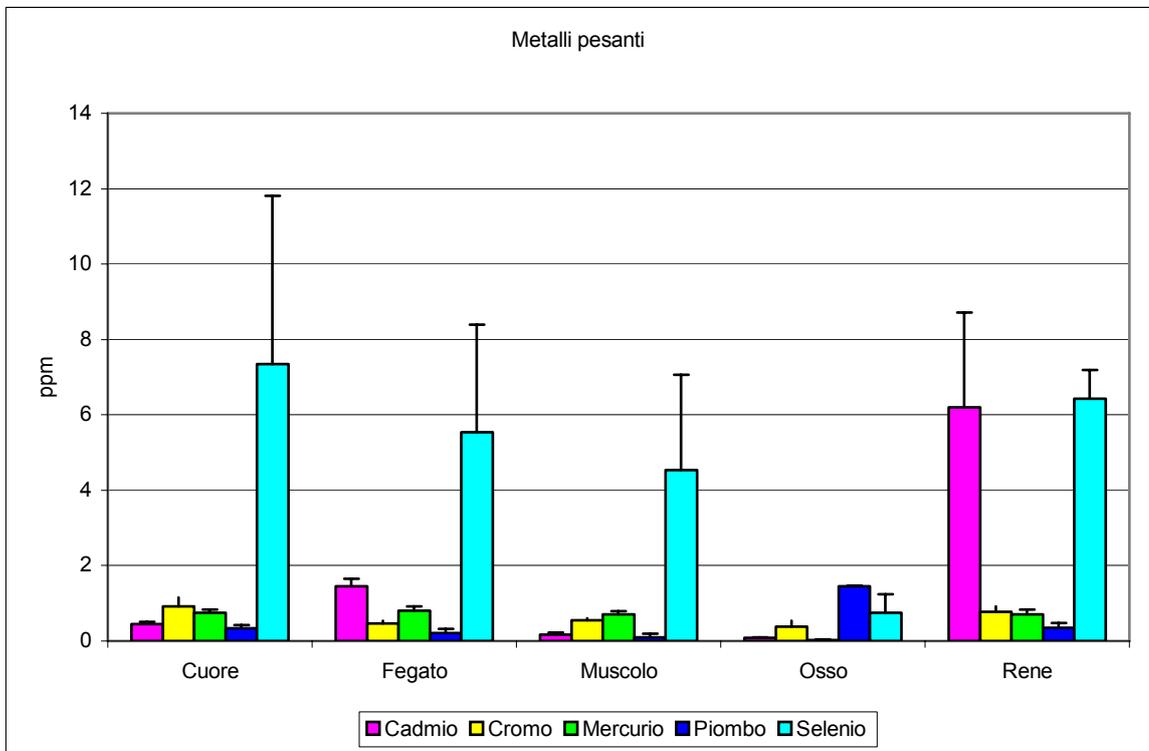
Il **piombo** ha una distribuzione omogenea nei vari tessuti esaminati, con valori inferiori all'1 ppm eccezion fatta per l'osso ( $1.46 \pm 0.25\text{ppm}$ ) che presenta la maggior concentrazione in accordo con la cinetica del metallo. Tali concentrazioni risultano in accordo con i dati reperiti in letteratura (Storelli et al, 2003; Godley et al, 1999; Sakai,2000) e sempre inferiori ai valori di background (1-20 ppm).

Dal punto di vista tossicologico, cadmio e piombo rivestono minore interesse a livello dell'ambiente marino perché scarse sono le possibili fonti di contaminazione.

L'unica possibilità di ottenere dati certi sarebbe quella di compiere una adeguata sperimentazione su questi animali, cosa ovviamente ed eticamente non attuabile perché animali protetti.



**Fig. 1:** Concentrazione Arsenico



**Fig. 2:** Concentrazioni Cd, Cr, Hg, Pb, Se

## **Risultati anato-istopatologici**

Le indagini necroscopiche hanno messo in evidenza lesioni simili in tutti i soggetti. Inoltre, alcuni di essi mostravano lesioni presubibilmente di origine traumatica (Foto 2; 3; 4), in un soggetto, a livello dell'esofago sono stati rinvenuti dei parassiti (Foto 5) e in un altro un amo da palamito infisso a tutto spessore (Foto 6). In particolare, il fegato risultava friabile anche applicando una moderata pressione, compatibile con uno stato steatosico. Nel soggetto n°8 si è potuto osservare una lesione circolare di circa 3 cm di diametro (Foto 5) circondata da una zona di colore più scuro. In sezione, si osservava un liquido necrotico-emorragico. I polmoni risultavano collassati e talvolta congesti. Si notavano un'aumento moderato delle dimensioni della milza e i reni, ad un primo esame, risultavano normali e talvolta congesti. Il tessuto adiposo si presentava scarso e si rilevavano generalizzati edemi emorragici in quasi tutti gli animali. Inoltre, a livello delle articolazioni erano presenti lesioni contenenti materiale purulento dalle dimensioni variabili da pochi centimetri a 8 cm (Foto 7.) in relazione allo spessore del grasso.

Le indagini istologiche hanno messo in evidenza steatosi a carico del fegato compatibile con il rilievo macroscopico (Foto 12); inoltre si è osservato necrosi, nubecole di batteri e stasi. A carico del polmone viene confermata la congestione, la stasi ematica e la necrosi. Per quanto riguarda la milza, sono stati confermati gli stati di necrosi, si è notata la presenza di formazioni cistiche, una sparsa apoptosi e nubecole di batteri (Foto 13; 14). Nei reni sono stati rilevati: materiale eosinofilo (ialino) nello spazio di Bowman,

scomparsa di diversi glomeruli, materiale necrotico in via di calcificazione, crescite batteriche in forma "cistica", fra l'altro osservabili anche in altri organi (Foto 15; 16). Nel grasso, le lesioni venivano identificate come ascessi purulenti a carico dei vasi sanguigni, confermata anche dalla citologia eseguita tramite strisci e impronte, dove si osservano cellule infiammatorie, batteri (sporigeni) e materiale necrotico (Foto 8; 9; 10; 11)

Le condizioni in cui sono stati reperiti gli esemplari spiaggiati hanno fortemente condizionato la possibilità di raccogliere gli organi da analizzare. In tabella 2 sono riportati per ogni singolo animale gli organi e tessuti che è stato possibile campionare sia per la tossicologia che per l'anatomia patologica.

Animali	Organi						
	Cuore	Fegato	Grasso	Milza	Muscolo	Ossso	Rene
1	X	X	X		X	X	X
2			X		X	X	
3			X		X	X	
4	X	X	X		X	X	X
5	X	X	X		X	X	X
6	X	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X	X
8	X	X	X	X	X	X	
9		X	X	X	X	X	X
10		X	X		X	X	X
11	X	X	X	X	X	X	X

**Tab.2:** Schema riassuntiva di organi e tessuti campionati per singolo animale.

La mancanza di caratteri sessuali secondari ben sviluppati non ha consentito di determinare l'età dei nostri soggetti, tranne in un caso (femmina) in cui sono stati individuati follicoli ovarici. D'altro canto proprio la mancanza di questi caratteri ha portato a considerare tutti i soggetti (tranne la femmina certa) classificabili quali giovani.

In conseguenza di ciò, non è stata effettuata un'analisi statistica in funzione né del sesso né dell'età.

## DISCUSSIONE

Le lesioni sia macroscopiche che microscopiche dimostrano che i soggetti spiaggiati sono spesso in preda a fenomeni patologici di gravità da media ad elevata. In particolare, le lesioni epatiche di tipo stetosico possono essere ritenute conseguenza di assunzione, mediante l'alimentazione, di sostanze a basso potere tossico, in quanto la distribuzione dei vacuoli lipidici è uniforme in tutto il parenchima, a dimostrazione che le lesioni non presentano caratteristiche di acutezza.

Le lesioni infiammatorie riscontrate a livello di tutti gli organi e parenchimi indicano che possono essere numerose le cause che danno origine a stati patologici in grado, nei casi più gravi, di portare gli animali a morte. L'aver trovato in preparati citologici ed istologici colonie di batteri e uova di macroparassiti non indica un necessario rapporto causale. È molto più probabile che gli animali colpiti da più di una noxa si trovino in uno stato cachettico tale da non consentire loro normali funzioni riguardanti aspetti essenziali della vita, che potrebbero spiegare gli episodi di spiaggiamento.

Le osservazioni di tipo anatomo-isto-patologico sono per altro avvalorate da quanto riscontrato dal punto di vista tossicologico: le concentrazioni reperite in tutti i soggetti sono infatti inferiori alle soglie tossiche definite per i singoli metalli e per l'arsenico. È quindi improbabile che la presenza di questi elementi possa indurre lesioni particolarmente gravi o patognomoniche specifiche.

In conclusione il monitoraggio eseguito su *Caretta caretta* dimostra che l'ambiente marino in cui questi animali vivono non presenta livello di inquinamento tali da portare all'accumulo di metalli pesanti

ed arsenico nei tessuti e che quindi le manifestazioni patologiche riscontrate sono da ascrivere a noxae di origine biologica.

## **9. GERMANO REALE - VALUTAZIONE DELLA TOSSICITÀ DI DIFFERENTI TIPOLOGIE DI PALLINI DA CACCIA**

### **Introduzione**

La presenza ambientale di pallini di piombo è uno dei maggiori fattori ecologici in grado di influire negativamente su dinamica di popolazione e conservazione delle specie di uccelli acquatici. La gravità del problema si concentra su questi uccelli poiché per abitudini etologiche ed alimentari, setacciano i fondali alla ricerca di piccoli oggetti duri, grit, necessari alla digestione, ingerendo erroneamente i pallini. Non va dimenticato che il problema non interessa solamente gli uccelli, ma tutti gli organismi viventi animali o vegetali presenti in ambiente umido, con la possibilità di una risalita del problema lungo la catena trofica interessando erbivori o predatori. I lavori sperimentali effettuati hanno chiaramente indicato come questa patologia sia debilitante, invalidante e ad elevata mortalità per gli animali e come in 2 secoli di utilizzo dei pallini di piombo, l'uomo abbia contribuito notevolmente all'inquinamento diretto delle zone umide.

Nonostante sia un problema datato, conosciuto in Nord America dal 1800, solo nell'ultimo decennio alcuni Stati Europei e gli Stati Uniti si sono mossi cercando una risoluzione al problema. In questi Paesi

sono state sperimentate leghe atossiche per la produzione di pallini, bandendo in senso assoluto o solo per la caccia agli acquatici, l'utilizzo del piombo.

In Italia l'attuale legislazione venatoria evita di prendere in considerazione il problema o di attuare regole in grado di prevenire l'accumulo ambientale del piombo, carenza normativa che appare dettata più da ritardi culturali che da scarsa importanza del fenomeno.

Al momento nel nostro Paese infatti, vengono commercializzate esclusivamente cartucce caricate con pallini in acciaio come unica alternativa a quelle tradizionali.

Critiche da parte del mondo venatorio alle cartucce con pallini in acciaio hanno riguardato le differenti caratteristiche balistiche rispetto al piombo ed in particolare la minore inerzia e perdita di velocità a parità di diametro, la maggiore resistenza all'aria dei pallini di acciaio di maggiori dimensioni necessarie e le distanze di tiro ravvicinate; tutto questo, associato ad un costo maggiore dell'1-2% rispetto a quelle tradizionali, comporta il continuo utilizzo del piombo a scopo venatorio.

Il presente lavoro è finalizzato a valutare la diversa tossicità di pallini da caccia prodotti con due diversi materiali, piombo e acciaio ferroso (pallini questi non commercializzati sul mercato italiano, ma presenti su quello statunitense), e per valutare la presunta atossicità della lega.

Si è voluto mettere in diretta contrapposizione i 2 differenti materiali (piombo, acciaio ferroso) per poter valutare da una parte l'andamento di un'intossicazione da piombo causata dall'ingestione di 2 o 4 pallini, presunte come quantità più probabili da ritrovare in

natura, a differenza dei lavori presenti in letteratura che ne utilizzano quantità maggiori (fino a 8); dall'altra stabilire se la definizione di "atossicità" riguardante l'acciaio ferroso fosse realmente attinente alla definizione data, intesa quindi come incapacità di produrre effetti avversi sugli animali.

## **Materiali e metodi**

### **Protocollo di trattamento**

La sperimentazione oggetto del presente lavoro è stata sottoposta a valutazione ed autorizzazione da parte del Comitato Etico-Scientifico, ottenuta in data 7 settembre 2004 (prot. 53925-X/6).

Presso il Dipartimento di Farmacologia e Tossicologia veterinaria della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna, sono stati tenuti a stabulazione libera in ambiente unico, 50 Germani Reali (*Anas platyrhynchos*), 25 maschi e 25 femmine di 6 mesi, alimentati con mangime completo in granaglie per volatili ed acqua *ab libitum*, mantenuti per 52 giorni ad una temperatura costante di 22°C ed un fotoperiodo il più possibile simile a quello naturale.

Al 7° giorno dal loro arrivo (giorno 0), ogni anatra è stata pesata ed è stato eseguito un prelievo di sangue dalla vena brachiale(P<sub>0</sub>), tramite vacutainer da 3 ml eparinizzato.

Gli animali sono stati suddivisi in 5 gruppi da 10 unità ciascuno (5 maschi e 5 femmine), inanellati con anelli di colore diverso e numerati, che consentivano di distinguere tra loro i gruppi, e trattati

con 2 o 4 pallini N°4 di piombo (gruppi V2 e V4) e 2 o 4 pallini N°6 di acciaio ferroso (equivalenti, secondo le specifiche del fornitore, al piombo N°4; gruppi B2 e B4); un gruppo, non trattato, è stato mantenuto come controllo (gruppo A). I pallini venivano inseriti direttamente in proventricolo con tubo in lattice della lunghezza di circa 20 cm.

A partire dal giorno 0 sono state effettuate 2 osservazioni quotidiane annotando nelle schede individuali (Tav. 1) eventuali segni clinici o alterazioni comportamentali indicative di intossicazione.

Dai singoli campioni di sangue sono stati prelevati 300 µl per la determinazione della concentrazione ematica di piombo. La restante parte è stata inviata al Dipartimento Clinico, sezione Clinica Medica per la determinazione di ALT, AST, LDH, creatinina, HCT, concentrazione di emoglobina.

I prelievi ematici ( $P_1$ ,  $P_2$ ,  $P_3$ ) sono stati ripetuti dopo 15, 30 e 45 giorni dall'inizio della sperimentazione. Nelle stesse date i singoli soggetti venivano nuovamente pesati per verificarne l'incremento ponderale.

Ogni qual volta un soggetto mostrasse chiari segni di sofferenza si provvedeva alla sua soppressione, previa effettuazione di un prelievo di sangue, ai fini analitici. Al termine dei 45 giorni di sperimentazione tutti i soggetti ancora in vita sono stati soppressi per dislocazione cervicale dopo il prelievo ematico e sono stati sottoposti ad autopsia.

### **Protocollo autoptico e analisi anatomo-istopatologiche**

La procedura autoptica includeva un esame di tutti gli organi e cavità. Dopo apertura della carcassa è stato effettuato un esame ispettivo del contenuto dello stomaco muscolare per valutare la presenza e lo stato corrosivo del pallino. Sono stati rimossi cervello, cuore, polmoni, fegato, reni e gonadi, analizzati macroscopicamente. Campioni di fegato, rene e milza sono stati prelevati subito dopo la morte degli animali, fissati in formalina di Carson, inclusi in paraffina, sezionati a 5 $\mu$  e colorati con ematossilina-eosina ai fini dell'esame istologico; contemporaneamente campioni di fegato, rene e muscolo sono stati conservati a -20°C per le analisi di tipo tossicologico.

### **Analisi tossicologiche**

Nell'effettuare questo studio, tutti i procedimenti analitici, i reattivi e gli standard utilizzati erano adeguati e rispondevano ai requisiti richiesti per la valutazione dei metalli pesanti.

## **Risultati**

### **Risultati dell'indagine tossicologica**

Nella tabella seguente sono riportati, come media  $\pm$  e.s., i pesi registrati dei pallini somministrati agli animali e il rispettivo peso al termine della sperimentazione. Appare evidente come si sia effettivamente verificata una dissoluzione degli stessi, a testimoniare un assorbimento di metalli durante la sperimentazione.

<i>GRUPPO</i>	<b>Peso pre-trattamento (g)</b>	<b>Peso post-trattamento (g)</b>	<b>% di dissoluzione</b>	<b>Stima della quantità di metallo assunta (g)</b>
B2	0.288 ± 0.0005	0.0982 ± 0.0037	57.08	0.1306
B4	0.4576 ± 0.0015	0.1992 ± 0.0054	56.47	0.2584
V2	0.35 ± 0.0056	0.268 ± 0.01	23.28	0.0815
V2	0.6972 ± 0.0105	0.59 ± 0.0322	15.37	0.1072

### **Analisi statistica**

L'analisi statistica dei dati è stata condotta con il programma Statistica 6.0 mediante il test dell'analisi della varianza per dati non parametrici, applicando il test Kruskal Wallis; il test è stato utilizzato per l'analisi dei dati biometrici, ematologici, biochimici e tossicologici, utilizzando come parametro di classificazione il gruppo di appartenenza. Per quanto riguarda i test ematologici, biochimici e ematotossicologici è stata presa in considerazione quale variabile aggiuntiva anche il tempo. Ogni qualvolta un dato analitico fosse risultato inferiore al LOD, a questo, per i soli fini statistici, veniva sostituito un valore pari alla metà del LOD stesso, al fine di poter eseguire l'analisi statistica su tutti i dati disponibili. La significatività statistica è stata posta allo 0.05.

Sebbene le percentuali di dissoluzione siano maggiori per i gruppi a basso dosaggio, è ben evidente come in realtà il quantitativo di metallo assorbito, sia esso acciaio ferroso o piombo, sia maggiore nei gruppi B4 e V4. Si tenga comunque presente che il quantitativo è una stima calcolata sulla base della percentuale di erosione, che

può solo quindi essere presa come indicazione delle quantità disponibili dell'assorbimento e non del reale quantitativo assorbito. La valutazione effettiva delle quote assorbite viene fornita invece dai valori ematici di piombo e ferro, discussi successivamente.

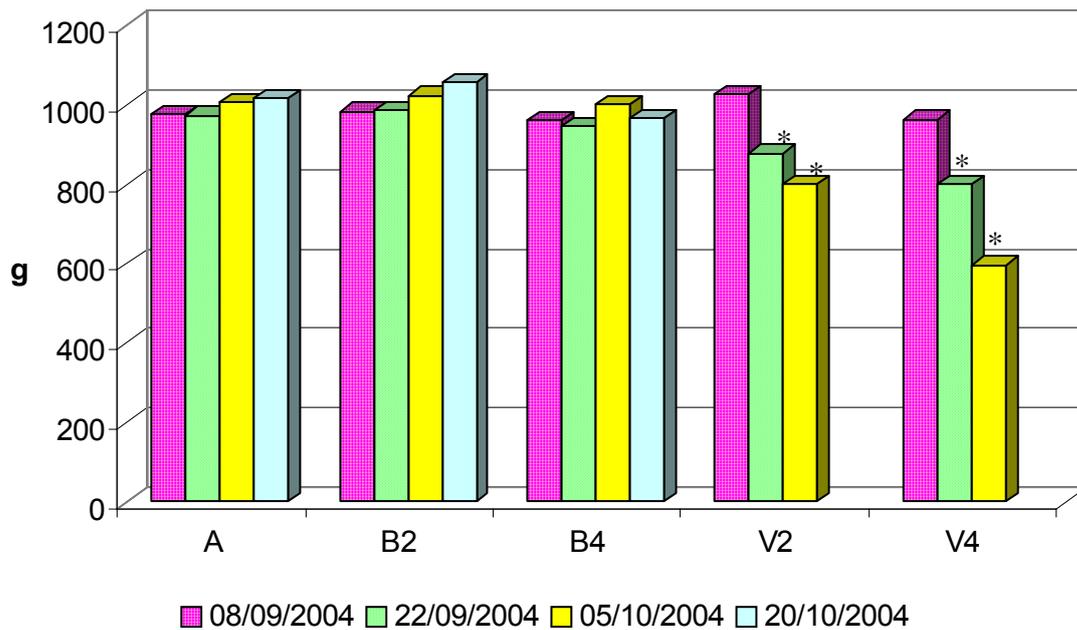
I pesi medi dei singoli gruppi in funzione del tempo sono riportati in Fig. 1.

Valutando i dati del primo giorno di campionamento, i pesi medi per ogni gruppo sono molto simili tra loro, dimostrando l'omogeneità del campione considerato.

I gruppi A e B2 hanno presentato una crescita costante e fisiologica del peso corporeo, nonostante un leggero calo al secondo campionamento, osservato anche nel gruppo B4, riconducibile ad un adattamento fisiologico degli animali al trattamento ed alle nuove condizioni di stabulazione.

Il gruppo B4 al terzo campionamento presentava livelli di crescita ponderale sovrapponibili ai gruppi precedenti, con un decremento successivo riconducibile all'intossicazione da ferro presente, raggiungendo i valori medi osservati al primo campionamento.

I gruppi V2 e V4 mostravano un calo progressivo del peso, considerevolmente maggiore tra il 2° ed il 3° campionamento, con differenze statisticamente significative tra i vari punti sperimentali.



**Fig. 1-** Andamento dei pesi medi espressi in grammi nei 5 gruppi sperimentali in funzione del tempo. \*:  $p < 0.05$ .

### **Risultati dell'indagine anatomo-istopatologica**

Dal punto di vista macroscopico le lesioni più evidenti si sono riscontrate nei soggetti trattati con pallini di piombo. L'organo che presentava alterazioni più evidenti in maggiore percentuale risultava essere il fegato che si presentava pallido, di colorito tendente al giallastro, a volte atrofico e con evidenziazione della lobulatura.

Spesso, nel complesso, gli animali apparivano in preda a fenomeni di più o meno accentuata disidratazione e cachessia (Foto 3).

Anche istologicamente, l'organo più colpito risultava essere il fegato dei soggetti trattati con pallini di piombo.

Le lesioni più evidenti e a carico della maggior parte dei soggetti esaminati erano:

1. stasi biliare intracitoplasmatica (Foto 9; 11; 12) ed intracanalicolare (Foto 10);
2. steatosi di vario grado (Foto 13; 14; 15);
3. focolai di necrosi (Foto 7; 8);
4. infiltrazione di cellule infiammatorie fra i cordoni epatocitari (Foto 10).

In due soggetti si sono rilevate colonie di Aspergilli nello “scuttilo” della parte addominale ed in una auricola (cuore) al centro di reazioni infiammatorie e necrotiche (Foto 22; 23; 24; 25; 26).

Nel rene di alcuni soggetti si è osservata un’infiltrazione interstiziale di cellule infiammatorie e “sferule” di materiale proteico nello spazio di Bowman e nel lume dei tubuli (Foto 19; 20; 21).

I soggetti trattati con pallini di ferro acciaioso non evidenziavano lesioni macroscopiche degne di nota. Istologicamente, l’unico dato di un qualche rilievo si poteva riscontrare nei polmoni sotto forma di una elevata reattività del BALT (Foto 4; 5; 6). Si sono riscontrati casi isolati di steatosi epatica e alcuni di degenerazione vacuolare in corrispondenza ad una moderata reazione parvocellulare (Foto 17). Un rene era in preda ad un modesto infiltrato parvocellulare e presenza nello spazio di bowman di “sferule” proteiche.

## DISCUSSIONE

Il lavoro eseguito intendeva valutare la reale tossicità dei pallini di piombo in contrapposizione alla presunta atossicità dell'acciaio ferroso. Dai dati ottenuti risulta come il piombo sia in grado di causare un grave quadro sintomatologico con depressione da lieve a grave, diarrea e disidratazione, ipotermia, atassia, debolezza muscolare e *wing drop*. Nel nostro caso alcuni soggetti hanno manifestato un decorso particolarmente rapido con morte dell'animale entro la prima settimana. In contrapposizione l'acciaio ferroso non ha causato nessun dato clinico rilevabile durante l'intero periodo di sperimentazione (45gg.). A livello ematologico risulta chiaro come la capacità del piombo di interferire sulla sintesi dell'emoglobina e sulla permeabilità della membrana eritrocitaria, possa causare un serio stato anemico con crollo improvviso dei parametri di HB ed ematocrito, non riscontrabile nei soggetti trattati con acciaio ferroso. Allo stesso modo l'aumento dell'attività emocateretica splenica e la stasi biliare rilevata a livello anatomico patologico causano un danno epatico, evidenziabile dall'interpretazione dei dati biochimici con l'aumento dei livelli di AST (imputabile in parte anche al danno muscolare), non presente nei gruppi di animali trattati con acciaio ferroso e nel gruppo di controllo. I dati tossicologici riferiti a sangue e tessuti rivelano come il piombo possa, in certi casi, raggiungere concentrazioni elevate depositandosi prima a livello epatico poi renale. I dati del piombo ematico dei gruppi A, B2 e B4 ci portano a credere che ci sia stata una contaminazione dell'acqua di lavaggio comune tramite le feci

dei soggetti trattati con piombo, non sufficiente comunque a raggiungere tassi ematici tossici. Di non facile interpretazione risultano gli alti livelli muscolari di zinco e rame, probabilmente conseguenza di un aumento di metallotioneine indotte dal piombo stesso e non presenti nei gruppi trattati con acciaio ferroso e nel gruppo di controllo. E' in ogni caso difficile poter effettuare un quadro completo del problema, poiché in natura esistono molte variabili in grado di modificarlo. E' importante quindi considerare che i dati ottenuti in questo lavoro, seppur simili a quanto riportato in letteratura, possono in alcuni casi discostarsi da questi per il diverso protocollo utilizzato. Il lavoro ha in ogni caso dimostrato la pericolosità dei pallini di piombo per gli Anatidi a differenza della "innocuità" dell'acciaio ferroso. Sarebbe quindi importante considerare l'eventualità di utilizzare queste leghe anche nei nostri distretti venatori al fine di non procurare sofferenze inutili ad animali che per abitudini etologiche sono coinvolti in questo problema.

L'indagine anatomo-istopatologica presenta dei notevoli riscontri sia con l'osservazione comportamentale degli animali, sia con le risultanze dell'indagine tossicologica.

Non deve in ogni modo stupire che le lesioni più significative siano state riscontrate nei soggetti trattati con pallini di piombo, anche a dosaggi che si possono ritenere di modesta entità.

Il fatto che manifestazioni simili a quelle sopra descritte, ottenute in condizioni sperimentali, si siano riscontrate anche in animali liberi è indicativo del fatto che l'ambiente ha subito da parte dell'uomo un tipo di contaminazione di grado molto elevato, come già accennato nell'introduzione.



## **10. BIVALVI MARINI – IMPORTANZA DELLA DIAGNOSI ISTOPATOLOGICA**

### **Introduzione**

I molluschi bivalvi marini, in particolare la specie *Mytilus galloprovincialis* in quanto organismi filtratori e bioaccumulatori possono essere presi come indicatori biologici dell'inquinamento marino. La concentrazione raggiunta dagli inquinanti nei tessuti biologici può superare in maniera significativa quella presente nell'ambiente e, per questo i bioaccumulatori forniscono importanti informazioni sugli inquinanti presenti e sulla loro biodisponibilità. Anche gli organismi vegetali si comportano come bioaccumulatori, in particolare alcune macroalghe brune e verdi sono utilizzate per le loro proprietà di accumulare metalli pesanti, mentre in genere non sembrano accumulare inquinanti organici.

I requisiti richiesti nella scelta di un bioaccumulatore, sono essenzialmente:

- alta tolleranza agli stress ambientali;
- capacità di bioaccumulo;
- sensibilità all'inquinamento;
- ampia distribuzione;
- facile raccolta e maneggiabilità;
- facile identificazione;

- ciclo vitale pluriennale;
- adeguate conoscenze sull'anatomia, fisiologia ed ecologia della specie.

Questi organismi viventi non subiscono passivamente gli effetti di un'alterazione ambientale ma attuano una serie di risposte che tendono a ripristinare l'omeostasi. Tali variazioni concernano la fisiologia, ma anche la morfologia. Questo sta a significare l'importanza di un'analisi istopatologica del bioindicatore unitamente alla valutazione di parametri biochimici, enzimatici che nell'insieme sono volti a definire il grado di stress o di benessere dello stesso.

Nel nostro lavoro abbiamo scelto come organismo bioindicatore la specie *Mytilus galloprovincialis* soprattutto per la sua ampia diffusione sia nel nostro mare Adriatico sia nell'intera area Mediterranea, in modo tale da avere una vasta reperibilità di informazioni relative alle patologie che questi molluschi bivalvi possono sviluppare.

La diagnosi istopatologica ha la finalità nei mitili stati di stress che sono indice della qualità dell'ambiente e si riflettono sia sulla produttività che sulla commerciabilità dei mitili stessi.

A tal fine abbiamo considerato i seguenti markers istopatologici:

- infiltrazione emocitaria nei vari organi;
- alterazioni dell'epitelio tubulare della ghiandola digestiva;
- anomalie dello sviluppo gonadico;

infestazioni parassitarie.

L'esame istopatologico deve anche servire, insieme ad altri esami collaterali, a formulare una diagnosi nei casi di mortalità che coinvolgano interi allevamenti in modo da salvaguardare la produttività e limitare i danni economici.

In definitiva, la diagnosi istopatologica costituisce il “trait d’union” tra l’ambiente e la produttività stessa.

## **Materiali e metodi**

Nei mesi di Marzo, Aprile, Maggio, Giugno e Luglio 2005 è stato effettuato un campionamento di mitili della specie *Mytilus galloprovincialis* da allevamenti situati nelle acque costiere prospicienti Cesenatico. Di tutti i campioni prelevati ne sono stati processati 50, uniformemente distribuiti per tutta la durata del campionamento. I molluschi, in età giovanile, sono stati privati delle valve e immersi in formalina di Carson. Dopo fissazione, i campioni sono stati inclusi in paraffina, tagliati al microtomo ottenendo sezioni di circa 5µm di spessore e colorati con le seguenti colorazioni:

- Ematossilina & Eosina (E&E);
- Grocott;
- Huek;
- PAS.

Il sezionamento è stato effettuato secondo gli assi trasversale e longitudinale in modo da consentire la visualizzazione di tutti gli organi interni.

## Risultati

Dall'indagine istopatologica che abbiamo condotto nel corso del progetto di ricerca è emerso che i campioni esaminati presentavano alterazione (Foto 7) e riduzione (Foto 8; 9) dello sviluppo gonadico, atrofia dell'epitelio tubulare della ghiandola digestiva (Foto 17), infiltrazione linfoemocitaria (Foto 1; 3; 5), reazione connettivale (Foto 6) e presenza di parassiti (Foto 2; 4; 11; 14; 15; 16).

La colorazione di Huek per la ricerca di lipofuscine nell'epitelio tubulare della ghiandola digestiva è risultata negativa. Pertanto, si può ritenere che il contenuto dei vacuoli, di colore giallo-arancio, sia costituito da pigmenti carotenoidi, mentre i vacuoli rotondeggianti sarebbero verosimilmente di natura lipidica. Entrambe queste caratteristiche sono espressione della funzionalità della ghiandola digestiva.

Gli organi più colpiti dalle infestazioni parassitarie sono rappresentati dalle branchie e dall'apparato digerente.

I parassiti in causa sono microrganismi di forma ovoidale con nucleo eccentrico che possono essere assimilabili a forme vegetative di protozoi. È stato anche osservato un germinoma.

Infine, nei mesi di giugno e Luglio si è verificato un fenomeno di mortalità legato al distacco dei mitili dalle reste. All'esame istologico non sono state rilevate alterazioni a carico dei vari organi, in particolare il piede e la ghiandola del bisso sono indenni da lesioni. Le colorazioni PAS e Grocott per la ricerca di miceti sono risultate negative.

## **DISCUSSIONE**

Nei mitili esaminati è evidente uno stato di stress testimoniato dalla riduzione dell'apparato gonadico e delle lesioni riscontrate a carico dell'apparato digerente. Anche la presenza di parassiti può essere considerata come un fattore predisponente allo stress. D'altra parte lo stress stesso può facilitare l'infestazione parassitaria. Diversamente da quanto riportato in letteratura, nei nostri preparati istologici non abbiamo riscontrato infezioni da Copepodi. Ciò potrebbe essere dovuto alla giovane età dei mitili campionati. Infatti, tutte le segnalazioni presenti in letteratura si riferiscono ad animali adulti. Il fenomeno di mortalità legato al distacco dei mitili dalle reste potrebbe essere dovuto ad una insufficiente circolazione idrica e a condizioni di ipossia. L'assenza di lesioni istopatologiche a carico dei vari organi, infatti suggerisce che possa trattarsi di un fenomeno acuto. In definitiva, le lesioni osservate nel corso della nostra indagine, non sono tali da comportare rischi per la salute umana, ma possono compromettere la capacità riproduttiva e della crescita dei mitili con conseguenti danni economici. Pertanto possiamo concludere affermando che la diagnosi istopatologica dei molluschi bivalvi marini, in particolare dei mitili risulta importante sia per monitorare l'inquinamento ambientale sia per salvaguardare la produzione di questi molluschi tanto richiesti sul mercato.



## 11. LARVE *XENOPUS LAEVIS* – VALUTAZIONE ISTOPATOLOGICA DEI RITARDANTI DI FIAMMA BROMURATI (PBDES)

### Introduzione

I bifenilipolibromurati (PBDE), utilizzati quali ritardanti di fiamma nella produzione di polimeri, plastiche, impianti elettrici e tessuti, sono molecole notoriamente riconosciute come nocive per la tiroide, dove esercitano il ruolo di interferenti endocrini alterando il bilancio degli ormoni tiroidei. Nonostante questi effetti siano noti da tempo, pochi sono gli studi effettuati per valutare l'attività dei PBDE sulla fauna selvatica. Uno dei modelli animali maggiormente utilizzati per la valutazione degli effetti a livello tiroideo sono gli anfibi, in particolare *Xenopus laevis*, ormai riconosciuto come modello validato anche dall'OECD.

Scopo del presente lavoro è la valutazione degli effetti di una miscela di PBDE (DE-71) sulla metamorfosi di girini di *Xenopus laevis*, esposti tramite l'acqua a concentrazioni simili a quelle ambientali, tra gli stadi di sviluppo 47 e 56.

## **Materiali e metodi**

### **Protocollo di trattamento**

Girini di 7 giorni (stadio 47 di sviluppo) sono stati suddivisi in 4 differenti gruppi sperimentali di 150 esemplari ciascuno. Tre dei quattro gruppi ottenuti erano esposti tramite l'acqua, in condizioni statiche, a una miscela di PBDE in metanolo (DE-71 technical mix, CIL Inc., Andover, USA) alla concentrazione nominale di 0.1 ng/l (Vasca A) e 1 ng/l (Vasca B) e al solo solvente (Vasca C) rispettivamente; il quarto gruppo era tenuto come controllo negativo e sottoposto a nessun trattamento.

A cadenza settimanale, allo scopo di mantenere costante la concentrazione nominale di PBDE nell'acqua e di ridurre l'accumulo di ammoniaca che si poteva avere a seguito del mancato ricircolo dell'acqua stessa, veniva effettuato un ricambio di acqua, con aggiunta di ritardante di fiamma fresco. Il trattamento con PBDE veniva sospeso al 28° giorno.

Gli animali venivano alimentati ad libitum 2-3 volte al giorno.

A partire dal giorno 0 e con cadenza settimanale 15 esemplari da ogni vasca venivano prelevati, pesati e misurati e successivamente in parte congelati a  $-80^{\circ}\text{C}$  in attesa delle successive analisi e in parte posti in formalina tamponata per le analisi anatomo-istopatologiche.

## **Analisi dell'indagine anatomo istopatologica**

Settimanalmente, cinque soggetti sono stati campionati e fissati in formalina di Carson; successivamente gli stessi sono stati inclusi in paraffina, tagliati al microtomo ottenendo sezioni di circa 5µm di spessore e colorati con ematossilina-eosina.

## **Risultati**

### **Risultati dell'indagine anatomo-istopatologica**

Nelle prime settimane di trattamento non si osservano modificazioni, né macroscopiche, né microscopiche, degne di nota a carico dei diversi organi e tessuti (Foto 1; 2). Alla 4° settimana l'apparato che mostra maggiore sofferenza è quello branchiale che si presenta con modificazioni significative delle emibranchie documentate sia al M.O. (Foto 3; 4) che al S.E.M. (Foto 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12) (per gentile concessione del Prof. Cardellini della Facoltà di Scienze Biologiche dell'Università di Padova). Queste, infatti appaiono meno rilevate e disordinatamente distribuite (Foto 4; 11).

Gli altri distretti dell'organismo non manifestavano segni evidenti di alterazioni morfo-funzionali.

## **DISCUSSIONE**

Le risultanze del presente studio dimostrano che in condizioni sperimentali, con la somministrazione di dosaggi relativamente elevati di ritardanti di fiamma (PBDEs), ma comunque sempre simili a quelle rilevate in monitoraggi ambientali si producono lesioni di notevole gravità, tali da fare supporre gravi danni funzionali.

## CONCLUSIONE COMPLESSIVA

Le ricerche da noi effettuate adottando metodiche sia tossicologiche che antomo-istopatologiche tendono a dimostrare come raramente ed in controllate condizioni sperimentali si trovi una buona corrispondenza fra i dati tossicologici e quelli morfologici.

In animali che vivono liberi o semiliberi in ambienti difficilmente controllabili la corrispondenza sopra citata è in gran parte vanificata, anche perché le concentrazioni di possibili inquinanti rilevate nei tessuti esaminati è risultata sempre (ampiamente) al di sotto dei valori soglia di tossicità.

Le patologie riscontrate sono assai spesso dovute a noxae biologiche (virus, batteri, miceti, macroparassiti, ecc.) la cui azione può essere considerata indipendente o solo scarsamente dipendente da cause di natura chimica.

Il ritrovamento, comunque, di lesioni istologiche che segnalano possibili rischi zoonosici (granulomi simil-tubercolari, granulomi micotici, ecc) dimostra che anche l'indagine morfologica può essere di grande utilità per valutazioni di tipo igienico-sanitarie.

Il fatto che anche gli animali cosiddetti selvatici vivano, comunque, in ambienti ampiamente antropizzati comporta una enorme facilità di trasmissione di patologie più o meno gravi fra uomo-animale domestico-animale selvatico e viceversa nelle varie possibili combinazioni.

Monitoraggi periodici e sistematici su più specie animali possono pertanto essere di grande utilità per poter consentire alle Autorità

sanitarie interventi atti a limitare e/o prevenire danni alla salute delle popolazioni animali e dell'uomo.

# **BIBLIOGRAFIA**

- Adams R.H., (1999).** *“Farmacologia e terapeutica veterinaria”*. Edizione italiana a cura di C. Beretta, EMSI (Ed.), Roma, pp. 793-823.
- Akerman K.E.O., Honkaniemi J., Scott I.G., Andersson L.C., (1985)** *“Interaction of  $Ca^{2+}$  with calmodulin activated ( $Ca^{2+} + Mg^{2+}$ )-ATPase activity of human erythrocyte ghosts”*. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, **845**: 48.
- Alexander J., Mikalsen A., Ryberg D., (1986)** *“Microsomal reduction of Cr VI”*. ACTA PHARMACOL. TOXICOL. (COPENH), **59**: 267.
- Alleva E., Francia N., Pandolfi M., De Marinis A.M., Chiarotti F., Santucci A. (2006).** Organochlorine and heavy-metal contaminants in wild mammals and birds of Urbino-Pesaro province, Italy: an analytic overview for potential bioindicators. Archives of environmental contamination and toxicology 51: 123-134.
- Amoruso M.A., Witz G., Goldstein B.D., (1982)** *“Enhancement of rat and human phagocyte superoxide anion radical production by cadmium in vitro”*. TOXICOL. LETT., **10**: 133.
- Anderson R.A., (1986)** *“Chromium metabolism and its role in disease processes in man”*. CLIN. PHYSIOL. BIOCHEM., **4**. 31.
- Anderson R.A., Polansky M.M., Bryden N.A., Roginski E.E. Mertz W., Glinsmann W., (1983)** *“Chromium supplementation of human subjects: effects on glucose, insulin, and lipid variables”*. METABOLISM, **32**: 894.
- Anderson R.L., Walbridge C.T., Fiandt J.T., (1980)** *“Survival and growth of Tanytarsus dissimilis (Chironomidae) exposed to copper, cadmium, zinc and lead”*. ARCH. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., **9**: 329.
- Andersson T., Drakenberg T., Forsen S., Thulin E., (1982)** *“Characterization of the  $Ca^{2+}$  binding sites of calmodulin from bovine testis using  $^{43}Ca$  and  $^{113}Cd$  NMR., Eur”. J., BIOCHEM., **126**: 501.*
- Anke M., Henning A., Schneider H.J., Ludke H., Von Cager W., Schlegal H., (1970)** *“The interrelations between cadmium, zinc, copper and iron in metabolism of hens, ruminant and man”*. In: TRACE ELEMENT METABOLISM IN ANIMALS, C.F. Mills Ed., Livingstone, Edinburgh, p. 317.
- Appenroth D. e Braunlich H., (1988)** *“Age dependent differences in sodium dichromate nephrotoxicity in rats”*. EXP. PATHOL., **33**: 179.

- Applequist H., Asbirk S., Drabaek I.,** (1984) *“Mercury monitoring: mercury stability in bird feathers”*. MAR. POLLUT. BULL., 15:22-24.
- Aranyi C. Bradof J.N. O’Shea W.J. Graham J.A. & Miller F.J.** (1985). Effects of arsenic trioxide inhalation exposure on pulmonary antibacterial defence in mice. J. Toxicol. Environ. 15: 163-172.
- Arean J.M.,** (1974) POISONING, 3<sup>rd</sup> ed., Charles C. Thomas, Publ., Springfield, Ill.
- Arena J.M.,** (1970). *“POISONING”*. 2<sup>nd</sup> Ed., Thomas, Springfield, p.369.
- Arthur J.R., Boyne R., Hill H.A.O. e Okolow-Zubkowska M.J.** (1981) *“The production of oxygen-derived radicals by neutrophils from selenium-deficient cattle”* FEBS LETT. 135, pp 187-190.
- Astolfi E.; Taccagno A. ; Fernandez J.C.G. ; Vaccaio R. & Stimola R.,** (1981) in BIOL. TRACE ELEM.RES. 3:133.
- Baggiolini M., de Duve C., Masson P.L. e Heremans J.F.,** (1970). *“Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes”*. J. EXP. MED., 131:559.
- Baker E.L., Goyer R.A., Fowler B.A.,** (1980): *“Occupational lead exposure, nephropathy and renal cancer”*. AM J INDUSTR MED 1:139-148.
- Bancks R.B. e Cooke R.T. Jr,** (1986) *“Chromate reduction by rabbit liver aldehyde oxidase”*. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., **137**: 7.
- Banis R.J., Ponds W.G., Walker E.F., O’Connor J.R.,** (1969) *“Dietary Cd, Fe, and Zn interactions in growing rats”*. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., **130**: 802.
- Barrett J. e Livesey P.J.,** (1983) *“Lead induced alterations in maternal behavior and offspring development in the rat”*. NEUROBEHAV. TOXICOL. TERATOL., **5**:557.
- Barth D., Berlin A., Engel R., Recht P., Smeets J. Eds.,** (1973) *“Proceedings international symposium. Environmental health aspects of lead.”* COMIS. EUROPEAN COMMUN., Luxembourg. 1, p.168.
- Beach R.S., Gershwin M.E. & Hurley L.S.,** (1982) III. *“Zinc deprivation versus restricted food intake in MRL/1 mice- the distinction between interacting dietary influences”*. J.IMMUNOL. 129: pp 2686-2692.

- Begon M, Harper J.L., Townsend C.R.,** (1996) - *Ecology*. Third edition, Oxford, Blackwell, Science, 1068.
- Beiglböck C., Steineck T., Tataruch F. e Ruf T.,** (2002). „*Environmental Cadmium induces histopathological changes in kidneys of roe deer*”. ENVIRON. TOXIC. AND CHEM., 21,9: 1811-1816
- Beneko V.; Wagner V.; Wagnerova M. & Botola J.** (1988) in J.HYG.EPIDEMIOL. MICROBIAL. IMMUNOL. 32:137
- Beretta C.,** (1994) “*Piombo*”. In: TOSSICOLOGIA VETERINARIA, a cura di C. Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, p. 153.
- Bernstam L., Nriagu J.** (2000). Molecular aspects of arsenic stress. J. Toxicol Environ. Health B Crit. Res. 3(4): 293-322.
- Bernstein J.,Evan A.P., Gardner K.D.** (1987): “*Epithelial hyperplasia in human polycystic kidney disease. Its role in pathogenesis and risk of neoplasia*”. AM J PATHOLOGY 129:92-101
- Bhattacharyya M.H.,** (1991) “*Cadmium-induced bone loss: increased susceptibility in females*”. WATER AIR SOIL POLLUTION, **57-58**: 665.
- Biesinger K.E. e Christensen G.M.,** (1972) “*Effects of various metals on survival, growth, reproduction, and metabolism of Daphnia magna*”. J. FISH. RES. BOARD CANADA, **29**: 1691.
- Birdsall C.W., Grue C.E., Anderson A.,** (1986) “*Lead concentrations in bullfrog Rana catesbeiana and green frog R. clamitans tadpoles inhabiting highway drainages*”. ENVIRON. POLLUT., **40A**:233.
- Bishop C.W. e Surgenor D.M.** Eds., (1964) “*The red blood cell: a comprehensive treatise*”. ACADEMIC PRESS, New York, p. 110.
- Boggess W.R.** Ed., (1977) “*Lead in the environment*”. NATL. SCI. FOUND. REP.NSF/RA-770214. 272 pp. Avail. from U.S. Gov. Printing Office, Washington, D.C. 20402.
- Booth N.H., Mc Donald L.E.** (1982) Veterinary pharmacology and therapeutics. 5<sup>th</sup> edition Iowa State University Press Ames.
- Borgman R.F., Au B. e Chandra R.K.,** (1986) “*Immunopathology of chronic cadmium administration in mice*”. INT. J. IMMUNOPHARMACOL., **8**: 813

- Bottarelli F.**, (1993-a) *“Arsenico As”* in MANUALE DI TOSSICOLOGIA VETERINARIA ,T.P.E. veterinaria, pag 59-63.
- Bottarelli F.**, (1993-b) *“Mercurio Hg”* in MANUALE DI TOSSICOLOGIA VETERINARIA ,T.P.E. veterinaria, pag 59-63.
- Bottarelli F.**, (1993-c) *“Selenio, Se”* in MANUALE DI TOSSICOLOGIA VETERINARIA ,T.P.E. veterinaria, pag 368-370.
- Bottarelli F.**, (1993-d) *“Zinco Zn”* in MANUALE DI TOSSICOLOGIA VETERINARIA ,T.P.E. veterinaria, pag 427-429.
- Boudou A., Ribeyre F.**, (1983) *“Contamination of aquatic biocenoses by mercury compounds: an experimental toxicological approach”*. In J.O. Nriagu (ed.). AQUATIC TOXICOLOGY. John Wiley, New York, 73-116.
- Bowler K. e Duncan D.J.**, (1970). *“The effect of copper on membrane enzymes”*. BIOCHEM. BIOPHYS. ACTA., 196:116-119.
- Boyland E., Dukes C.E., Grover P.L., Mitchley B.C.V.**, (1962) *“The induction of renal tumors by feeding lead acetate to rats”*. BR. J. CANCER, **16**: 283.
- Boyne R. e Arthur J.R.**, (1981) *“Effects of selenium and copper deficiency on neutrophil function in cattle”* J.COMP.PATHOL 92: pp 271-276
- Brink M.F., Becker D.E., Terrill S.W. & Jensen A.H.** (1959) J.ANIMAL.SCI. 18 pp 836
- Brown D.R.**, (2001). *“Copper and prion disease”*. BRAIN RESEARCH BULLETIN, Vol.55, 2:165-173.
- Buck W.B.** (1978) *“Toxicity of inorganic and aliphatic organic arsenicals”* in TOXICITY OF HEAVYMETALS IN THE ENVIRONMENT Part.I 16: pp 357-374.
- Bunn C.R. e Matrone G.**, (1966) *“In vivo interactions of cadmium, copper, zinc, and iron in the mouse and rat”*. J. NUTR., **90**: 395.
- Burton J.L., Mallard B.A., Mowat D.N.**, (1993) *“Effects of supplemental chromium on immune responses of periparturient and early lactation dairy cows”*. J. ANIM. SCI., **71**: 1532.
- Cairns J., Pratt J.R.**, (1993)- *Trends in ecotoxicology. The Science of the Total Environment*, pp. 7-22.

- Canton J.H. e Slooff W.**, (1982) *"Toxicity and accumulation studies of cadmium (Cd<sup>2+</sup>) with freshwater organisms of different trophic levels"*. ECOTOXICOL. ENVIRON. SAFETY, **6**: 113
- Cardona E., Lessler M.A., Brierly G.P.**, (1971) *"Mitochondrial oxidative phosphorylation- inraction of lead with inorganic phosphate"*. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., **136**: 300.
- Carlomagno M.A. & McMurray D.N.**, (1983) *"chronic zinc deficiency in rats:its influenc on some parameters of humoral and cell-mediated immunity"* NUTR.RES. **3**: pp 69-78
- Chandra R.K., Heresi G.& Au B.**, (1980) *"serum thymic factor activity in deficiencies of calories, zinc, vitamin A and pyridoxine"*. CLIN.EXP.IMMUNOL. **42**: pp 332-335
- Chang X. e Mowat D.N.**, (1992) *"Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves"*. J. ANIM. SCI., **70**: 599.
- Chao S.H., Suzuki Y., Zysk J.R., Cheung W.Y.**, (1984) *" Activation of calmodulin by various metal cations as a function of ionic radius"*. MOL. PHARMACOL., **26**: 75
- Chapman G.A.**, (1978) *"Toxicities of cadmium, copper, and zinc to four juvenile stages of chinook salmon and steelhead"*. TRANS. AM. FISH. SOC., **107**: 841
- Chen Y.C. e Smith J.B.**, (1992) *"A putative lectin-binding receptor mediates cadmium-evoked calcium release"*. In TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **117**: 249
- Chennekatu P.P., Burek J.D. e van Zwieten M.J.**, (1986). *"Spontaneous nephropathies in rats"*. TOXICOL. PATHOL., **14**:91-100
- Cheung W.Y.**, (1984) *" Calmodulin: its potential role in cell proliferation and heavy metal toxicity"*. FED. PROC., **43**:2995
- Chiquoine A.D. e Suntzeff V.**, (1965) *"Sensitivity of mammals to cadmium necrosis in the testis"*. J. REPROD. FERTIL., **10**: 455
- Choie D.D. e Richter G.W**, (1972) *"Lead poisoning: rapid formation of intranuclear inclusions"*. Science, **117**: 1195.
- Chu R.C e Cox D.H.**. (1972). *"Zinc, iron, copper, calcium, cytochrome oxidase and phospholipids in rats of lactating mothers fed excess zinc"*. NUTR. REP. INT., **5**:61-66.

**Chvapil M., Ryan J.N. e Zukoski C.F.,** (1972). "*The effect of zinc and other metals on stability of lysosomes*". PROC. SOC. EXP. BIOL-MED., 140:642-644.

**Clarke E.G.C. & Clarke M.L.** (1975) "*Mineral or inorganic Substance- Arsenic*" in VETERINARY TOXICOLOGY, Bailliere Tindal, London pag 34-43.

**Clarkson T.W., Hamada R., Amin-Zaki L.,** (1984) "*Mercury*". In J. O. Nriagu (ed.). CHANGING METAL CYCLES AND HUMAN HEALTH. Springer-Verlag, Berlin, 285-309

**Combs G.F., Noguchi T. e Scott M.L.** (1975). FED. PROC. 34: 2090.

Connel D.W., 1990- *Bioaccumulation of xenobiotic compounds*. Boca Raton (FL) CRC Press , Inc., 219.

**Coogan T.P., Bare R.M., Waalkes M.P.,** (1992) "*cadmium-induced DNA damage: effects of zinc pre-treatment*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **113**: 227.

**Cooper W.C., Gaffey W.R.** (1975): "*Mortality of lead workers*". J OCCUP MED 17:100-107

**Corsolini S. ,Focardi S., Kannan K., Tanabe S, Tatsukawa R.,** (1995)- *Isomer Specific Analysis of polychlorinated biphenils and 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxin equivalents (TEQs) in red fox and human adipose tissue from central Italy*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 29: 61-68.

**Cottenie A.** (1979). "*Essential and non essential trace elements in the system soilwater-plant*". GLENT UNIVERSITY, p.171.

**Cox D.H. e Harris D.L.,** (1960). "*Effect of excess dietary zinc on iron and copper in the rat*". J. NUTR., 70:514-520.

**Cox J.L. e Harrison S.D. Jr,** (1983) "*Correlation of metal toxicity with in vitro calmodulin inhibition*". BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN., **115**: 106

**Crecelius E.A.,** (1974) in Thesis University of Washington, Seattle, Washington.

**Crowley C., Young J.D. e Tucker E.M. (1977).** *Bioch. Soc. Trans.*, 5: 1455.

**Das S.K., Sharma A., Talukder G.,** (1982) "*Effects of mercury on cellular systems in mammals - a review*". NUCLEUS (Calcutta), 25:193-230.

**Dawson D.A., Stebber E.E., Burks S.L. & Banale J.A.,** (1988) "*Evaluation of the developmental toxicity of metal-contaminated sediments using short-term fathead minnow and frog embryo-larval assays*". ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY 7, pp 2744

**Dayan A.D., Hertel R.F., Helseltine E., Kazantzis G., Smith E.M., Van der Venne M.T.,** (1990) *“Immunotoxicity of metals and immunotoxicology”*. PROCEEDINGS OF AN INTERNATIONAL WORKSHOP. New York: Plenum Press.

**de Bruin A.,** (1971) *“Certain biological effects of lead upon the animal organism”*. ARCH. ENVIRON. HEALTH, **23**: 249.

**De Marchi A.,** (1992)- *Ecologia funzionale*. Milano, Garzanti, 313.

**De Nardo P.** (2003). Animali come sentinelle di inquinamento ambientale. Epidemiol. Prev. 27: 26-31

**De Nardo P.** (2005). Studi di epidemiologia ambientale nelle aree oggetto di bonifica: il contributo degli animali sentinella. Rapporto ISTISAN 1:136-140

**Del Carratore R., Cundari E., Morganti C., Moretton J., Bauer C., Corsil C., Nieri R., Paolini M., Bronzetti G.,** (1984) *“Detection of mutagens in leather and tannery industry assay of 28 commercial mixtures”*. BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., **32**: 400.

**Delbeke K., Joiris C., Decadt G.,** (1984) *“Mercury contamination of the Belgian avifauna 1970-1981”*. ENVIRON. POLLUT., 7:205-221.

**Demayo A., Taylor M.C., Taylor K.W., Hodson P.V.,** (1982) *“Toxic effects of lead and lead compounds on human health, aquatic life, wildlife plants, and livestock”*. CRC CRIT . REV. ENVIRON. CONTROL, **12**: 257.

**Depasquale-jardieu P. & Fraker P.J. ,** (1979) *“The role of corticosterone in the loss of immune function in the zinc-deficient A/J mouse”*. J.IMMUNOL.. 109: pp 1847- 1855

**Der R., Fahim Z., Yousef M., Fahim M.,** (1977) *“Effects of cadmium on growth, sexual development and metabolism in female rats”*. RES. COMMUN. CHEM. PATHOL. PAHRMACOL., **16**: 485

**Descostes J., Verdier F., Brouland J.P. & Pulce C.,** (1989) *“Immunotoxicity of lead, cadmium and arsenic:experimental data and their relevance to man”* in IMMUNOTOXICITY OF METALS AND IMMUNOTOXICOLOGY di Dayan A., Hertel R.F., Helseltine E., Kazantzis G., Smith E.M. & Van der Venne M.T. Plenum Press New York, pp 209-213

- Descotes J.**, (1992) *“Immunotoxicology of cadmium”*. In: Nordberg G.F., herber R.F.M., Alessio L. Eds. CADMIUM IN THE HUMAN ENVIRONMENT. TOXICITY AND CARCINOGENICITY. INTL. AGENCY RES. CANCER, Lyon, France, p. 385
- Descotes J.**, (1999) *“Immunotoxicology of drugs and chemicals: experimental and clinical perspectives”*, 3<sup>rd</sup> edition. New York, Elsevier.
- Descotes J., Evreux J.C., Laschi-Loquerie a., Tachon P.**, (1984) *“Comparative effects of various lead salts on delayed hypersensitivity in mice”*. J. APPL. TOXICOL., **4**: 265
- DG ENVIRONMENT** (2000) *“Ambient air pollution by As Cd, Ni compounds”* POSITION PAPER, Working group on Arsenic, Cadmium and Nickel Compounds, DG EnviomentalEuropean Commision
- Dieter M.P.**, (1979) *“Blood delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) to monitor lead contamination in canvasback ducks (Aythya valisineria)”*. Pages 177-191 in NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. ANIMALS AS MONITORS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS. Washington, D.C.
- Dingwall-Fordyce I. & Lane R.E.** (1963): *“A folow-up study of lead workers”*. BRITISH JOURNAL OF INDUSTRIAL MEDICINE,20:313-315.
- Donnelly T.E.**, (1978) *“ Effects of zinc chloride on the hydrolysis of cyclic GMP and cyclic AMP by the activator-dependent cuclic nucleotide phosphodiesterase from bovine heart”*. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, **522**: 151
- Dudley R.E., Gammal L.M., Klaassen C.D.**, (1985) *“Cadmium-induced hepatic and renal injury in chronically exposed rats: likely role of hepatic cadmium-metallothionein in nephrotoxicity”*. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **77**: 414
- Dwivedi C.**, (1983) *“Cadmium-induced sterility: possible involvement of the cholinergic system”*. ARCH. ENVIRON. CONTAM.TOXICOL., **12**: 151
- Eaton J.G.**, (1974) *“Chronic cadmium toxicity to the bluegill (Lepomis macrochirus Rafinesque)”*. TRANS. AM. FISH. SOC., **103**: 729
- Ecological Analysts, Inc.**, (1981) *“The sources, chemistry, fate, and effects of chromium in aquatic environments”*. AVAIL. FROM AMERICAN PETROLEUM INSTITUTE, 2101 L St., N.W., Washington, DC 20037. 207 pp.

- Eisler R.**, (1985-a) *“Cadmium hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review”*. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 2.
- Eisler R.**, (1986) *“Chromium hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review”*. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 6.
- Eisler R.**, (1987) *“Mercury hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review”*. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 10.
- Eisler R.**, (1988-a) *“Arsenic hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review”*. Patuxent Wildlife Research Center, Biological Report n. 12.
- Eisler R.**, (1988-b) *“Lead hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review”*. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 14.
- Eisler R.**, (1993) *“Zinc hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review”*. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT n. 26
- Eisler R.**, (1985-b). *“Selenium hazard to fish, wildlife and intervertebrates: a synoptic review”*. PATUXENT WILDLIFE RESEARCH CENTER, BIOLOGICAL REPORT, n.5.
- Elhassani S.B.**, (1983) *“The many faces of methylmercury poisoning”*. J. TOXICOL., 19:875-906.
- Elinder C.G.**, (1986) *“Zinc”* in L.Friberg, G.E. Nordberg & Vouk V.B. editors HANDBOOK ON THE TOXICOLOGY OF METALS II ED., Volume II: specific metals. Elsevier, New York pp. 664-679
- Elinder C.G., Kjellström T., Hogstedt C., Anderson K., Spang G.**, (1985) *“Cancer mortality of cadmium workers”*. BR. J. IND. MED., **42**: 651
- Ensley S.**, (2003) *“Lead-Metals and Minerals”*in CLINICAL VETERINARY TOXICOLOGY di Plumlee K.H.,Mosby, 22, pp 204-210
- EPA**, (1980-a), *“Ambient water quality criteria for arsenic”* in US.ENVIRON.PROTECTION AGENCY REP. 440/5-80-021 pp 205.

**EPA**, (1980-b) *“Ambient water quality criteria for cadmium”*. U.S. ENVIRON. PROTECTION AGENCY REP. 440/5-80-025.

**EPA**, (1980-d)- *“Ambient water quality criteria for lead”*. U.S. ENVIRON. PROTECTION AGENCY REP., 440/5-80-057.

**EPA**, (1980-e)- *Ambient water quality criteria for polynuclear aromatic hydrocarbons*. U.S. Environ. Protection Agency. Rep., 440/5-80-069.

**EPA**, (1985), *“Ambient water quality criteria for arsenic”* in US.ENVIRON.PROTECTION AGENCY REP. 440/5-84-033 pp 66

**EPA**,(1980-c), *“Ambient water quality criteria for chromium”* in US.ENVIRON.PROTECTION AGENCY REP. 440/5-80-057 pp 205

**Eskew M.L., Scholz R.W., Reddy C.C., Todhunter D.A. e Zarkower A.**, (1985) *“Effects of vitamin E and selenium deficiencies on rat immune function”* IMMUNOLOGY 54, pp 173-180.

**Essink K., Romeyn K.**, (1994)- *Estuarine Nematodes as indicators of organic pollution; an example from the Ems estuary (The Netherland)*. Neth. J. Aquatic Ecol, 28: 213-219.

**Evans G.W.**, (1989) *“The effect of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans”*. INT. J. BIOSOC. MED. RES., 11: 163.

**Faccin C., Grisostolo A., Lionetti C., Mauri L., Melgrati E., Turri F., Vitaliti S.** (2004). *Api e miele: bioindicatori ambientali nel confronto tra un'area ad alta urbanizzazione ed un'area con insediamento aeroportuale*. Il Progresso Veterinario anno LIX (3): 100-102.

**Fahim M.S., Webb M., Hildebrand D.C., Russel R.L.**, (1972) *“Effect of lead acetate on male reproduction”*. FED. PROC., 31: 272.

**Ferard J. F., J. M. Jouany, R. Truhaut, and P. Vasseur.** (1983). *“Accumulation of cadmium in a freshwater food chain experimental model”*. ECOTOXICOL. ENVIRON. SAFETY 7:43-52.

**Ferm V.H. e Carpenter S.J.**, (1968) *“The relationship of cadmium and zinc in experimental mammalian teratogenesis”*. LAB. INVEST., 18: 429.

**Ferm V.H. e Layton W.M. Jr.**, (1981) *“Teratogenic and mutagenic effects of cadmium”*. in J. O. Nriagu (ed.). CADMIUM IN THE ENVIRONMENT. Part 2, Health effects. John Wiley, New York Pag. 743-756

- Ferriera R.M. C.d.C., Maquiegui I.M. & Elizaga I.V.,** (1989) “ *Teratogenicity of zinc deficiency in the rat: study of the fetal skeleton*”. TERATOLOGY 39, pp 181-194.
- Fordyee F.M., Williams T.M., Paijilpapapon & Charoenchaisci P.,** (1995) in BRITISH GEOL. SURVEY. Keyworth
- Forni A., Cambiaghi G., Sechi G.C.,**(1976) “*Initial occupational exposure to lead. Chromosome and biochemical findings*”. ARCH. ENVIRON. HEALTH, **27**: 73.
- Forsen S., Thulin E., Lilja H.,** (1979) “*<sup>113</sup>Cd NMR in the study of calcium binding proteins: troponin*” C. FEBS LETT., **104**: 123
- Fort D.J., James B.L. & Banale J.A.,** (1989) “*Evaluation of the developmental toxicity of five compounds with the frog embryo teratogenesis assay. Xenopus (FETAX) and a metabolic activation system*”. JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY 9 pp 377-388.
- Foulkes E.C.,** (1978) “*Renal tubular transport of cadmium-metallothionein*”. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **45**: 505.
- Fox M.R.S. e Fry B.E.Jr,** (1970) “*Cadmium toxicity decreased by dietary ascorbic acid supplements*”. SCIENCE, **169**: 989
- Fox M.R.S., Fry B.E., Harland B.F., Schertel M.E. Weeks C.E.,** (1971) “*Effect of ascorbic acid on cadmium toxicity in the young coturnix*”. J. NUTR., **101**: 1295
- Franchini I, Mutti A.,** (1988) “*Selected toxicological aspects of chromium (VI) compounds*”. SCI. TOTAL ENVIRON, **71**: 379.
- Frank D.S., Mora M.A., Sericano J.L., Blanhenship A.L., Kannan K., Giesy J.P.,** (2001)- *Persistent organochlorine pollutants in eggs of colonial watherbirds from Galveston Bay and east Texas, USA*. Environ. Toxicol. Chem., 20: 608-616.
- Freeland J.H. e Cousins R.J.,** (1973) “*Effect of dietary cadmium on anemia and iron absorption*”. FED. PROC., **32 (3)**: 924
- Friberg L., Kjellström T., Nordberg G.F.,** (1986) „*Cadmium*“. In: Frieberg L., Nordber G.F., vouk V.B. Eds., HANDBOOK ON THE TOXICOLOGY OF METALS, Vol. 2, 2<sup>nd</sup> ed. Elsevier, New York, p.130
- Frøslie A., Sivertsen T. e Lochmiller R.,** (2001). „*Perissodactyla and Artiodactyla*. In: *Ecotoxicology of Wild Mammals*” (EDITED BY R.F.SHORE AND B.A.RATTNER), JOHN WILEY & SONS LTD., pp. 510-538

- Fry D.M.** (1995). Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environ. Health perspect.* 103. Suppl.7:165-171.
- Fujimaki H., Shimizu F., Kawamura R., Kubota K.**, (1983) "*Inhibition of delayed hypersensitivity reaction in mice by cadmium*". *TOXICOL. LETT.*, **19**: 241
- Gabor S., Anca Z., Bordas E.**, (1978) "*Cadmium-induced lipid peroxidation in kidney and testes: effect of zinc and copper*". *REV. ROUM. BIOCHIM.*, **15**: 113.
- Gale T.F.** (1978). "*Embryotoxic effects of chromium trioxide in hamsters*". *ENVIRON. RES.* 16:101-109.
- Ganther H.E.** (1968). *Biochemistry*, 7: 2898.
- Gardiner J.** (1974) "*The chemistry of cadmium in natural water-II. The adsorption of cadmium on river muds and naturally occurring solids*". *WATER RES.* 8:157-164.
- Gennaro S.M. & Nebbia C.** (1984). "*Selenio*". In *TOSSICOLOGIA VETERINARIA*. A cura di C. Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 180-188.
- Gennaro S.M., Nebbia C., Valenza F., Cagnasso A. e Guglielmino R.** (1983). *Arch. Vet. Ital.* 34: 65.
- Ghiasuddin S.M., Matsumura F.** (1979). Ca<sup>2+</sup> regulation by Ca-ATPase in relation to DDT's action on the lobster nerve. *Comp. Biochem. Physiol. C.* 64(1): 29-36.
- Giavini E., Prati M., Vismara C.**, (1980) "*Effects of cadmium, lead and copper on rat preimplantation embryos*". *BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL.*, **25**: 702.
- Gilani S.H. e Marano M.**, (1979) "*Chromium poisoning and chick embryogenesis*". *ENVIRON. RES.* **19**: 427
- Girod C. e Chauvineau A.**, (1964) « *Nouvelles observations concernano l'influence du chlorure de cadmium sur le testicule du Singe Macacus irus* ». *F. CUV. C. R. SOC. BIOL. (Paris)*, **158** : 2113
- Glaser U., Hochrainer D., Otto F.J., Oldiges H.**, (1990) "*Carcinogenicity and toxicity of four cadmium compounds inhaled by rats*". *CHEM.. ENVIRON. TOXICOL.*, **27**: 153
- Godley B.J., Thompson D.R. e Furness R.W.** (1999). "*Do heavy metal concentrations pose a threat to marine turtles from the Mediterranean Sea?*" *MARINE POLLUTION BULLETTIN*, 38(6): 497-502.

**Goering P.L., Waalkes M.P., Klaassen C.D.,** (1995) *“Toxicology of cadmium”*. In: TOXICOLOGY OF METALS, BIOCHEMICAL ASPECTS. Goyer R.A. e Cherian M.G. Eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcellona, Budapest, p. 189

**Gonsebatt M.E., Vega L., Montero R., Garcia-Vargas G., Del Razo L.M., Albores A., Cebrian M.E. & P. Ostrosky-Wegman** (1994) *“Lymphocyte replicating ability in individuals exposed to arsenic via drinking water”* in MUTA.RES. 313 (2-3): pp 293-299

**Goyer R.A. and Clarkson T.W.** (2001): *“Toxic Effects Of Metals”*, in: TOXICOLOGY OF POISONS (ed. Klaassen, C.D.); McGraw-Hill, New York, 811-868.

**Goyer R.A. e Cherian M.G.,** (1992) *“Role of methallothionein in human placenta and rats exposed to cadmium”*. In: Nordberg G.F., Herber R.F.M., Alessio L. Eds. CADMIUM IN THE HUMAN ENVIRONMENT. IARC, Lyon, p.239.

**Goyer R.A.,** (1968) *“The renal tubule in lead poisoning: 1. Mitochondrial swelling and amino aciduria”*. LAB. INVEST., **19**: 71.

**Goyer R.A.,** (1989). *“Mechanisms of lead and cadmium nephrotoxicity”*. TOXICOL.LETT., 46:153.

**Goyer R.A.,** (1990) *“Environmentally related diseases of the urinary tract”*. ENVIRON. MED., **74**: 377

**Goyer R.A.,** (1996). *“Toxic effects of metals”*. In: Casarett&Doull’s Toxicology; THE BASIC SCIENCE OF POISONS, 5<sup>th</sup> edn., Klaassen C.D. (Ed.), McGraw-Hill, New York, pp.691-736.

**Grant-Frost D.R. e Underwood E.J.,** (1958). *„Zinc toxicity in the rat and his relation with copper”*. AUST. J. EXP. BIOL., 36:339-346.

**Greener Y., Kochen J.A.,** (1983) *“Methyl mercury toxicity in the chick embryo”*. TERATOLOGY, 28:23-28.

**Grimmet R.E.R., McIntosh I.C, Wall E.M. & Hopkirk C.S.M.** (1937) N.Z.J.AGRIC. , 54 PP. 216

**Gumbleton M. e Nichols P.J,** (1988) *“Dose-response and time-response biochemical and histological study of potassium dichromate-induced nephrotoxicity in the rat”*. FOOD CHEM. TOXICOL., **26**: 37

- Gunn S.A., Gould T.C e Anderson W.A.D.**, (1968-a)- *"Specificity in protection against lethality and testicular toxicity from cadmium"*. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., **128**: 591
- Gunn S.A., Gould T.C, Anderson W.A.D.**, (1963) *"Cadmium-induced interstitial cell tumors in rats and mice and their prevention by zinc"*. J. NATL. CANCER INST., **31**: 745.
- Gunn S.A., Gould T.C, Anderson W.A.D.**, (1964) *"Effect of zinc on cancerogenesis by cadmium"*. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., **115**: 653.
- Gunn S.A., Gould T.C., Anderson W.A.D.**, (1968b) *"Mechanism of zinc, cysteine and selenium protection against cadmium-induced vascular injury to mouse testis"*. J. REPROD. FERT., **15**: 65.
- Habermann E., Crowell K.,Janicki P.**, (1983) *"Lead and other metals can substitute for Ca<sup>2+</sup> in calmodulin"*. ARCH. TOXICOL., **54**:61.
- Haddow A. e Horning E.S.**,(1960). *"On the carcinogenicity of an iron-dextran complex"*. J. NATL. CANCER INST., 24:109.
- Haddow A., Roe F.J.C., Dukes C.E., Mitchley B.C.V.**, (1964) *"Cadmium neoplasia: sarcomas at the site of injection of cadmium sulphate in rats and mice"*. BR. J. CANCER, **18**: 667
- Hansen L.G., Tuinstra M.T., Kan C.A., Strik T.W., Koeman J.H.**, (1983). *Accumulation of chlorobiphenyls in chicken fat and liver after feeding Aroclor 1254 directly or fat from swine fed Aroclor 1254*. J. Agric. Food Chem., 31:254-260.
- Harr J.R.**, (1978) *"Biological effects of selenium"* in TOXICITY OF HEAVY METALS IN THE ENVIRONMENT ed: Frederick W.Oehme part 2 cap.18: pp 393-426
- Harvey J.W, French T.W, Meyer D. J.** (1982). *"Chronic iron deficiency anemia in dogs"*. J. AMER. ANIM. HOSP. ASSOC., 18: 946-960.
- Hatch R.C.** (1982). Poisons causing respiratory insufficiency, in "Veterinary Pharmacology and Therapeutics", 5<sup>th</sup> edition ed. by N.H. Booth and L.E. McDonald, Iowa State University Press. Ames. P. 965.
- Hatherill J.R.**, (1981) *"A review of the mutagenicity of chromium"*. DRUG CHEM. TOXICOL., **4**: 185.

**Heath J.C., Daniel M.R., Dingle J.T., Webb M.,** (1962) "*Cadmium as a carcinogen*". *Nature*, **193**: 592.

**Heinrich U., Peters I., Ernst H., Rittinghausen S., Dasenbrock C., König H.,** (1989) "*Investigation on the carcinogenic effects of various compounds after inhalation in hamster and mice*". *EXP. PATHOL.*, **37**: 253.

**Heinz G.H., Swineford D.M., Katsma D.E.,** (1984)- *High PCB residues in Environ. Monitor. Assess. birds from the Sheboygan River, Wisconsin*, **4**:155-161.

**Hemminki K. e Lindbohm M.L.,** (1986) "*Reproductive effects of welding fumes: experimental and epidemiological studies with special reference to chromium and nickel compounds*". In: *HEALTH HAZARD AND BIOLOGICAL EFFECTS OF WELDING FUMES AND GASES*, R.M. Stern, A. Berlin, A.C. Fletcher and J, Jarvisalo Eds. p. 291, Excerpta Med. Congr. Ser. 676, Elsevier, Amsterdam

**Hilderbrand D., Olds M., Der R., Fahim M.S.,** (1972) "*Effect of lead acetate on reproduction*". *AM. J. OBSTET. GYNECOL.*, **115**: 1058.

**Hoffman G.R.,** (1991) "*Genetic toxicology*" in Amdur M.O., Doull J., Klaassen C.D. Eds. *CASARETT AND DOULL'S TOXICOLOGY, THE BASIC SCIENCE OF POISONS*, 4<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill Pergamon, New York, p 201-205.

**Hood R.D. & Bishop S.L.,** (1972) "*Teratogenic Effects os Sodium Arsenate in mice*" in *ARCH ENVIRON. HEALTH* **24**: pp 62-65

**IARC,** (1976) "*Cadium, nickel, some epoxides, miscellaneous industrial chemicals and general considerations on volatile anesthetics*". *INTL. AGENCY RES. CANCER*, Vol 11. Lyon, France, p. 39.

**IARC,** (1980) *IARC mongraphos on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some metals and metallic compounds. . Intl. Agency Res. Cancer*, vol. 28. Lyon, France, p. 205

**IARC,** (1987) "*Monograph on the evaluations of carcinogenicity: an update of IARC Monographs*". *WORLD HEALTH ORGANIZATION, INTL. AGENCY RES. CANCER*, Vols. 1-42, Suppl. 7. Lyon, France.

**IARC,** (1993) "*Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. Intl. Agency Res. Cancer*, vol. 58. Lyon, France, p119.

- Iwata H., Tanabe S., Sakai N., Tatsukawa R.,** (1993)- *Distribution of persistent organochlorines in the oceanic air and surface seawater and the role of the ocean on their global transport and fate*, Environ. Sci. Echnol., 27:1080-1098.
- Iwata T., Incefy G.S., Tanaka T., Fernandes G., Mendez-Botet C.J., Pih K. & Good R.A.,** (1979) "Circulating thymic hormone levels in zinc deficiency." CELL.IMMUNOL. 47: pp 100-105.
- Izatt R., Christensen J., Rytting J.,** (1971) "Sites and thermodynamic quantities with proton and metal ion interactions with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid and their constituent bases, nucleosides and nucleotides". CHEM. REV., 71: 439.
- J. Wiemeyer S.N., Lamont T.G., Bunck C.M., Sindelar C.R., Gramlich F.J., Fraser D., Byrd M.A.,** (1984) *Organochlorine pesticide, polychlorobiphenyl, and mercury residues in bald eagle eggs -1966-1979- and their relationships to shell thinning and reproduction*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 13:529-549.
- Jacobs R.M., Fox M.R.S., Fry B.E., Harland B.F.,** (1974) "Effect of a two-day exposure of dietary cadmium on the concentration of elements in the duodenal tissue of Japanese quail". In: TRACE ELEMENT METABOLISM IN ANIMALS (W.G. Hoekstra, J.W. Suttie, H.E. Ganther e W. Mertz Eds.), University Park Press, Baltimore, p. 684.
- Jacobson-Kram D. & Montalbano D.,** (1985) in ENVIRON. MUTAGE. 7: 787
- Jahn W.** (1976). Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 89. 50.
- James B. R. e Bartlett R.J.,** (1983a) "Behavior of chromium in soils: V. Fate of organically complexed Cr (III) added to soil". J. ENVIRON. QUAL. 12: 169
- James B. R. e Bartlett R.J.,** (1983b) "Behavior of chromium in soils. VI. Interactions between oxidation-reduction and organic complexation". J. ENVIRON. QUAL. 12: 173
- Jenkins D.W.** (1980) "Biological monitoring of toxic trace metals. Volume 2. Toxic trace metals in plants and animals of the world. Part II. Mercury". U.S. ENVIRON. PROTECTION AGENCY REP. 600/3-80-091:779-982.
- Jerlonov A.** (1969). Chemical fallout. Ed by C.C. Thomas. p.42.
- Jin P e Ringertz N.,** (1990) "Cadmium induces transcription of protooncogenes c-jun and c-myc in rat L6 myoblasts". J. BIOL. CHEM., 265: 14061

- Johnson F.A. e Stonehill R.B.**,(1961). "*Chemical pneumonites from inhalation of zinc chloride*".DIS. CHEST., 40:619-624.
- Kägi J.H.R. e Hapke H.J.**, (1984) "*Biochemical interaction of mercury, cadmium and lead*". In: Nriagu J.O. Ed. CHANGING METAL CYCLES AND HUMAN HEALTH. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 237
- Kakin H.W.** (1973). ADV. CHEM. SERV., 123. 96
- Kanisawa M. e Schroeder H.A.**, (1969) "*Renal arterial changes in hypersensitive rats given cadmium in drinking water*" EXP. MOL. PATHOL., **10**:81
- Kao R.L.C. e Forbes R.M.**, (1973) "*Effects of lead on heme-syntesising enzymes and urinary aminolevulinic acid in the rat*". PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., **143**: 234
- Kawanishi S., Inoue S., Sano S**, (1986) "*Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate (VI) in the presence of hydrogen peroxide*". J. BIOL. CHEM., **261**: 5952.
- Khalid R.A., Gambrell R.P., Patrick W.H. Jr**, (1981) "*Chemical availability of cadmium in Mississippi River sediment*". J. ENVIRON. QUAL. **10**: 523.
- Kim J.P., Fitzgerald W.F.**, (1986) "*Sea-air partitioning of mercury in the equatorial Pacific Ocean*". SCIENCE 231:1131-1133
- Klaassen C.D.**, (1990) "*Heavy metals and heavy-metal antagonists*". In: Gilman A.G., Rall T.W., Nies A.S., Taylor P. Eds. GOODMAN AND GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS. McGraw-Hill, New York, p 1152
- Koelsch F.**, 1959- Bleivergiftung and Zahn Ausfall. Zbl. Anheitsmed, **9**: 114.
- Koller L.D. e Kovacic S.**, (1974) "*Decreased antibody formation in mice exposed to lead*". NATURE, **250**: 148.
- Koller L.D. e Roan J.G.**, (1977) "*Effects of lead and cadmium on mouse peritoneal macrophages*". J. RETOCULOENDOTHEL. SOC., **21**: 7.
- Koller L.D., Exon J.H., Talcott P.A., Osvorne C.A. e Henningsen G.M.**, (1986) "*Immune response in rats supplemented with selenium*" CLIN.EXP.IMMUNOL. 63, pp 570-576.

- Kornegay E.T., van Heugten P.H.G., Lindemann M.D., Blodgett D.J.,** 1989. "Effect of biotin and high copper levels on performance and immune response of weanling pigs". J. ANIM. SCI., 67:1471-1477.
- Kotsonis F.N. e Klaassen C.D.,** (1977) "Toxicity and distribution of cadmium administered to rats at sublethal doses". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **41**: 667.
- Krishnaja A.P. e Rege M. S.,** (1982) "Induction of chromosomal aberrations in fish *Boleophthalmus dussumieri* after exposure in vivo to mitomycin C and heavy metals mercury, selenium and chromium". MUTAT. RES., **102**: 71
- Kumada H., Kimura S., Yokote M.,** (1980) "Accumulation and biological effects of cadmium in rainbow trout". BULL. JPN. SOC. SCI. FISH., **46**: 97
- Kumada H., Kimura S., Yokote M., Matida Y.,** (1973) "Acute and chronic toxicity, uptake and retention of cadmium in freshwater organisms". BULL. FRESHWATER FISH. RES. LAB. (Tokyo), **22**: 157.
- Kurts D.A.,** (1990) *Long Range Transport of Pesticides*. Chelsea, MI, Lewis Publishers, 440.
- Laj S., Jain V.K., Tandon S. K.,** (1984) "Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium IV: biochemical changes in blood and liver of rat". J. ENVIRON. BIOL. **5**: 29.
- Lampert P., Garro F., Pentschew A.,** (1967) "Lead encephalopathy in suckling rats". In: BRAIN EDEMA, I Klatzo e F. Seitelberger Eds., Springer Verlag, New York, p. 207.
- Langård S. e Norseth T.,** (1979) «Chromium». In: HANDBOOK ON THE TOXICOLOGY OF METALS. L. Friberg, G. Nordberg e V.B. Vouk Eds., Elsevier, Amsterdam, p.383
- Langård S.,** (1990) "One hundred years of chromium and cancer: a review of epidemiological evidence and selected case reports". AM. J. IND. MED., **17**: 189
- Laschi-Loquerie A., Descotes J., Tachon P., Evreux J.C.,** (1984) "Influence of lead acetate on hypersensitivity. Experimental study". J. IMMUNOPHARMACOL., **6**: 87.

**Laschi-Loquerie A., Eyraud A., Morisset D., Sanou A. Tachon P., Veysseyre C., Descotes J.**, (1987) *"Influence of heavy metals on the resistance of mice toward infection. Immunopharmacol"*. IMMUNOTOXICOL., **9**: 235.

**Latimer K.S., Jain A.V., Inglesby H.B., Clarkson W.D., & Johnson G.B.**, (1989) *"Zinc-induced hemolytic anemia caused by ingestion of pennies by a pup"*. JOURNAL OF THE AMERICAN VETERINARY ASSOCIATION 195, pp 77-80

**Lawrence D.A.**, (1981) *"In vivo and in vitro effects of lead on humoral and cell-mediated immunity"*. INFECT. IMMUNOL., **31**: 136.

**Le Boeuf R.A. & Hoekstra W.G.** (1983). *J. Nutr.* 113: 845

**Lee D. e Matrone G.**, (1969). *"Iron and copper effects on ceruloplasmin activity of rats with zinc-induced copper deficiency"*. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 130:1190-1193.

**Lee-Feldstein A.**, (1986) in *J.OCCUP.MED.* 28: 296

**Leonard A. & Gerber G.B.**, (1989) *"Zinc toxicit: does it exist?"*. JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF TOXICOLOGY 8, pp 1285-1290.

**Leonard A. e Lauwerys R.R.**, (1980-a) in *MUTAT RES.* 75: 873

**Leonard A. e Lauwerys R.R.**, (1980-b) *"Carcinogenicity and mutagenicity of chromium"*. *MUTAT. RES.* **76**: 227

**Lessler M.A. e Walters M.I.**, (1973) *"Erythrocyte osmotic fragility in the presence of lead or mercury"*. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., **142**. 548.

**Levander O.A., Morris V.C., Higgs D.J., Feretti R.J.**, (1975) *"Lead poisoning in vitamin E deficient rats »*. *J. NUTR.*, **105**. 1481.

**Lilis** (1981): *"Long-term occupational lead exposure: Chronic nephropathy and renal cancer: A case report"*. *AM J IND MED* 2:293-297.

**Lindsay R.C., Dimmick R.W.**, (1983) *Mercury residues in wood ducks and wood duck foods in eastern Tennessee.* *J. Wildl. Dis.*, 19:114-117.

**Loeb L., Sirover M., Wymouth L., Dube D., Seal G., Agarwal S., Katz E.**, (1977) *"Infidelity of DAN synthesis as related to mutagenesis and carcinogenesis"*. *J. TOXICOL. ENVIRON HEALTH*, **2**. 1297.

**Lohiya N.K., Arya M., Shivapuri V.S.**, (1976) *"The effects of cadmium chloride on the testis and epididymis of the Indian hanuman lanugr, Presbytis entellus entellus Dufresne"*. *ACTA EUR. FERTIL.*, **7**: 339

- Lotti G., Galoppini C. e Lo Moro A.** (1966). ATTI SOC. TOSC. SC. NAT., MEM, 52:490.
- Lucisano A.** (1994-a) *“Arsenico”* in TOSSICOLOGIA VETERINARIA. A cura di C.Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp 140-145.
- Lucisano A.** (1994-b) *“Cadmio”* in TOSSICOLOGIA VETERINARIA. A cura di C.Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, pp 167-170
- Lucisano A.,** (1994-c) *“Mercurio”*. In TOSSICOLOGIA VETERINARIA. A cura di Beretta C., Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 150-156.
- Luecke R.W., Simonel C:E: & Fraker P.J.,** (1978) *“The effect of restricted dietary intake on the antibody mediated response of the zinc deficient A/J mouse”*. J.NUTR. 108: pp 881-887
- Luster M.I., Faith R.E., kimmel C.A.** (1978). Depression of humoral immunity in rats following chronic developmental lead exposure. J. Environ. Pathol. Toxicol. 1(4): 397-402.
- Magee A.C e Matrone G.,** (1960). *“Studies on growth, copper metabolism, and iron metabolism of rats fed high levels of zinc”*. J. NUTR., 72:233-242.
- Malavè I e DeRuffino D.T.,** (1984) *“Altered immune response durino admium administration in mice”*. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **74**: 46.
- Malcom D.,** (1971) *“Potential carcinogenic effect of cadmium in animals”*. ANN. OCCUP. HYG., **15**: 33.
- Mandal B.K. & Suzuki K.T.,** (2002) *“Arsenic round the world: a review”* in TALANTA 58: pp 201-235.
- Marcato P.S.** (2002): PATOLOGIA SISTEMATICA VETERINARIA, Edagricole Ed., pag.856, 1179-1180
- March B.E., Poon R., Chu s.** (1983). The dynamics of ingested methylmercury in growing and laying chickens. Poltry science 62(6): 1000-1009.
- Markert B.,** (1993) *Plants as biomonitors –Indicators for Heavy metals in the terrestrial environment*. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 644.
- Markovac J e Goldstein G.W.,** (1988) *“Lead activates protein kinase C in immature rat brain microvessel”*. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **96**: 14.
- Marsili L., Gaggi G., Bortolotto A., Stanzani L., Franchi A., Renzoni A., Bacci E.,** (1995) *Recalcitrant organochlorine compounds in captive Bottlenose dolphins*

*(Tursiops Truncatus): biomagnification or bioaccumulation?* Chemosphere, 31: 3919-3932.

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

**May T.W. e McKinney G.L.**, (1981) "Cadmium, lead, mercury, arsenic, and selenium concentrations in freshwater fish, 1976-77- National Pesticide Monitoring Program". PESTIC. MONITOR. J., 15: 14.

**Mayer L. M., Schick L.L., Rossi P.M., Patterson H.H., Chang C.A., Bause D.E., Fink L.K. Jr.**, (1981) "Analysis, distribution, and interactions of chromium in the aquatic environment". UNIV. MAINE AT ORONO, LAND AND WATER RES. CENT., COMPL. REP. PROJ. B-016-ME. 58 pp.

**McLane M.A.R., Hughes D.L.**, (1980)- *Reproductive success of screech owls fed Aroclor® 1248*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 9:661-665.

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

**Menzie C.M.**, (1978) *Metabolism of pesticides, update II*. U.S. Fish Wildl. Serv. Spec. Sci. Rep.-Wildl., 212:206-218.

**Merian E.**, (1991). "Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis and biological relevance". VHC, Weinheim 1991.

**Mertz W. e Roginski E.E.**, (1971) "Chromium metabolism: the glucose tolerance factor". In: Mertz W., Cornatzer W.E. Eds. NEWER TRACE ELEMENTS IN NUTRITION. Dekker, New York, p. 123.

**Mertz W.**, (1969) "Chromium occurrence and function in biological systems". PHYSIOL. REV., 49: 163

**Metz E.N. e Sagone A.L. Jr.**, (1972). "The effect of copper on erythrocyte exose monophosphate shunt pathway". J. LAB. CLIN. MED., 80:405-413.

**Miller G.T.**, (1994) *Living in the environment. Principles, Connections, and solutions*. Eight edition, Belmont (CA), Wadsworth Publishing Company, 701.

- Miller J.K., Perry S.C., Chandler P.T., Cragle R.G.**, (1967) *“Evaluation of radio cerium as a non-absorbed reference material for determining gastrointestinal sites of nutrient absorption and excretion in cattle”*. J. DAIRY SCI., **50**: 355
- Miller Publishing Company**, (1975) FEED ADDITIVE COMPENDIUM vol 13, Minneapolis
- Mills C.F. e Dalgarno A.C.**, (1972) *“Copper and zinc status of ewes and lambs increased dietary concentrations of cadmium”*. NATURE, **239**: 171
- Mills J.S., Johnson J.D.**, (1985) *“ Metal ions as allosteric regulators of calmodulin”*. J. BIOL. CHEM., **260**: 15100
- Mital V.P., Wahal D.K.e Bansal O.P.**, (1966). *“A study of erythrocyte glutathione in acute copper sulfating poisoning”*. INDIAN. J. PATHOL. BACT., 9:156-162.
- Moonsie-Shageer S. e Mowat D.N.**, (1993) *“Effect of level of supplemental chromium on performance, serum constituents and immune status of stressed feeder calves”*. J. ANIM. SCI., **71**: 232.

**Morris, J. G., W. S. Cripe, H. L. Chapman, Jr., D. F. Walker, J. B. Armstrong, J. D. Alexander, Jr., R. Miranda, A. Sanchez, Jr., B. Sanchez, J. R. Blair-West, and D. A. Denton.** (1984). "*Selenium deficiency in cattle associated with Heinz bodies and anemia*". SCIENCE 223:491-493.

**Mossop R.T.,** (1983) "*Effect of chromium (III) on fasting glucose, cholesterol and cholesterol HDL levels in diabetics*". CENT. AFR. J. MED., **29**: 80.

**Mudge G.P.** (1983). The incidence and significance of ingested lead pellets poisoning in british waterfowl. Biological Conservation 27: 333-372.

**Müller S., Gillert K.E., Krause C., Gross U., Age-Shehr J.L., Diamantstein T.,** (1977) "*Suppression of delayed type hypersensitivity of mice by lead*". EXPERIENTIA, **33**: 667.

**Müller S., Gillert K.E., Krause C., Jautzke G., Gross U., Diamantstein T.,** (1979) "*Effects of cadmium on the immune system of mice*". EXPERIENTIA, **35**: 909.

**Murthy L., Klevan L.M. e Petering H.G.,** (1974). "*Interrelationships of zinc and copper nutriture in the rat*". J. NUTR., 104:1458-1465.

**Nakashima K., Wakisaka T., Fujiki Y.,** (1988) "*Dose-response relationship of cadmium embriotoxicity in cultured mouse embryos*". REPROD. TOXICOL., **1**: 293.

**Nam D.H., Lee D.P.,** (2006). Monitoring for Pb and Cd pollution using feral pigeons in rural, urban, and industrial environments of Korea. Science of the Total Environment 357:288-295.

**NAS,** (1977) "*Arsenic*" in NATL. ACAD. SCI. Washington D.C. pp 332

**NAS,** (1978) "*An assessment of mercury in the environment*". NATL. ACAD. SCI., Washington, DC, 185

**NAS,** (1979) "*Zinc*" UNITED STATES NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL RESEARCH COUNCIL SUBCOMMITTEE ON ZINC. University Park Press, baltimore Md.471 pp.

**NAS,** (1979)- *Polychlorinated biphenyls*. Rep.Comm. Assess. PCBs in Environ., Environ. Stud. Bd., Comm. Nat. Resour., Nat. Res. Coun., Nat. Acad. Sci., Washington DC, 182.

- Nath I., Sood S.K. e Nayak N.C.**, (1972). "*Experimental siderosis and liver injury in the rhesus monkey*". J. PATHOL., 106:103-111.
- Neethling L.P., Brown J.J.M. e De Wet P.J.** (1968). *J.S. Afr. Med. Ass.* 30: 25.
- Nelson A.A., Fitzburg O.G. and Calvery H.O.** (1943) Liver tumors following cirrhosis caused by selenium in rat. *Cancer Res.* 3:230-236.
- Nieboer E., Yassi A., Haines a.T., Jusys A.A.**, (1984) "*Effects of chromium compounds on human health*". OCCUPATIONAL HEALTH AND SAFETY DIVISION, Ontario Ministry of Labour, Toronto, Canada.
- Nolan C.V. e Shaikh Z.A.**, (1992). "*Lead nephrotoxicity and associated disorders: biochemical mechanisms*". TOXICOLOGY, 73:127-146.
- Nomiyama K.**, (1982) "*Carcinogenicity of cadmium*". JPN. J. IND. HEALTH, **24**: 13.
- Nordberg G.F. & Anderson O.**, (1981) in ENVIRON. HEALTH PROSPECT 40: 65
- Nordberg G.F.**, (1971) "*Effects of acute and chronic cadmium exposure on the testicles of mice*". ENVIRON. PHYSIOL., **1**: 171.
- Nordenson I & Backman L.**,(1991) in HUM.HERED. 41: 71
- Nordstrom S., Beckman L., Norderson I.**, (1978) HEREDITAS 88: 43
- Nordstrom S., Beckman L., Norderson I.**, (1979a) HEREDITAS 90: 297
- Norin H., Vahter M., Christakopoulos A. e Sandstrom M.** (1985). "*Concentration of inorganic and total arsenic in fish from industrially polluted water*". CHEMOSPHERE 14: 1125-334.
- Norseth T.** (1981). "*The carcinogenicity of chromium*". ENVIRON. HEALTH PERSPECT., **40**:121.
- Nowak F.**, (1995). „*Blei und Cadmium in Leber und Nieren von Wildtieren aus Wien*“. MASTER'S THESIS, Vienna University, Vienna, Austria.
- NRC**, (1980). "*Mineral tolerance of animals*". NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES-NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Washington DC.
- NRC**, (1991) "*Animal as Sentines of Environmental Health Hazards*". NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES-NATIONAL RESEARCH COUNCIL, Washington DC.
- NRCC** (1978) "*Effects of arsenic in the Canadian enviroment*" NATL.RES.COUN. Canada Publ. No.NRCC 15391,pp. 349

- Nriagu J.O.**, (1979) *"The biogeochemistry of mercury in the environment"*. ELSEVIER/NORTH-HOLLAND BIOMEDICAL PRESS, New York, 696.
- O'Flaherty E.J.**, (1995) *"Chromium toxicokinetics"*. In: TOXICOLOGY OF METALS, BIOCHEMICAL ASPECTS. Goyer R.A. e Cherian M.G. Eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcellona, Budapest, p. 215
- Oberdörster G.**, (1986) *"Airborne cadmium and carcinogenesis of the respiratory tract"*. SCAND. J. WORK ENVIRON. HEALTH, **12**: 523
- Oberdörster G., Cox C.**, (1990) *"Carcinogenicity of cadmium in animals. What is the significance for man?"* CHEM. ENVIRON. TOXICOL., **27**: 181
- Ochi T., Ishiguro T., Ohsawa M.**, (1983) *"Participation of active oxygen species in the induction of DNA single-strand scissions by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells"*. MUTAT. RES., **122**:169.
- Ogden L., Edwards W.C., & Nail N.A.**, (1988). *"Zinc Intoxication in a dog from ingestion of copper clad zinc pennies"* VETERINARY AND HUMAN TOXICOLOGY **30**, pp 577-578
- Okui T. & Fujiwara Y.**, (1986) MUTAT.RES. **172**: 69
- Oldiges H., Hochrainer D., Glaser U.**, (1989) *"Preliminary results from a long-term inhalation study with four cadmium compounds"*. TOXICOL. ENVIRON. CHEM., **23**: 35.
- Onkelinx, C.** (1977). *"Compartment analysis of metabolism of chromium (III) in rats of various ages"*. AM. J. PHYSIOL. **232**:E478-E484.
- Parizek J. e Zahox Z.**, (1956) *"effect of cadmium salt on testicular tissue"*. NATURE, **177**: 1036
- Parizek J., Oskadolova I., Bemes I., Pitha J.**, (1968) *"The effect of a subcutaneous injection of cadmium salts on the ovaries of adult rat in persistent oestrus"*. J. REPROD. FERTIL., **17**: 559
- Parizek, J.**, (1957) *"The destructive effect of cadmium ion on testicular tissue and its prevention by zinc"*. J. ENDOCRINOL., **15**: 56.
- Parnham M.J., Winkelmann J. e Leyck S.**, (1983) *"Macrophage, lymphocyte, and chronic inflammatory response in selenium deficient rodents: association with"*

*decreased glutathione peroxidase activity*" INT.J.IMMUNOPHARMACOL 5, pp 455-461

**Perry H.M. e Schroeder H.A.**, (1955) "Concentration of trace metals in urine of treated and untreated hypersensitive patients compared with normal subjects". J. LAB. CLIN. MED., **45**: 936.

**Pershagen G. & Vahter M.**, (1979) "Arsenic-a toxicological and epidemiological appraisal" in NATURVARDsverket RAPP. SNV PM 1128, Liber Tryck, Stockholm pp 265

**Peters R.H.**, (1991) *A Critique for Ecology*. Cambridge (UK), Cambridge Universitypress, 366-385.

**Peterson P.J. & Butler G.W.** (1962). "Aust. Journal Biol. Sci". 15: 126.

**Petrilli F.L. e DeFlora S.**, (1988) "Metabolic reduction of chromium ad a threshold mechanism limiting its in vivo activity". SCI. TOTAL ENVIRON., **71**: 357

**Pickering, Q. H. e M. Gast.**, (1972). „Acute and chronic toxicity of cadmium to the fathead minnow (*Pimephales promelas*)". J. FISH. RES. BOARD CANADA, **29**: 1099.

**Piscator M.**, (1962) "Proteinuria in chronic cadmium poisoning. I. An electrophoretic and chemical study of urinary and serum proteins from workers with chronic cadmium poisoning". ARCH. ENVIRON. HEALTH, **4**: 607.

**Pompa G.**, (1994) *Pesticidi organoclorurati*. In *Tossicologia veterinaria*. A cura di Beretta C., Casa Editrice Ambrosiana, Milano, 264-272.

**Pond W.G., Chapman P., Walker E.**, (1966) "Influence of dietary zinc, corn oil, and cadmium on certain blood components, weight gain, and parakeratosis in young pigs". J. ANIM. SCI., **25**: 122

**Popper H., Thomas L.B., Telles N.C., Falk H. & Selikoff I.J.**, (1978). "development of hematic angiosarcoma in man induced by vinyl chloride thorotrast and arsenic". American journal of

**Post M. A. e P. G. Campbell.**, (1980) "Lead chromate pigments—a literature survey on environmental and toxic effects". U.S. DEP. COMM. NAT. BUR. STAND. REP. NBSIR 80-1974. 38 pp.

- Powell G.W., Miller W.J., Morton J.D., Clifton C.M.**, (1964) *"Influence of dietary cadmium level and supplemental zinc on cadmium toxicity in the bovine"*. J. NUTR., **84**:205
- Preston A.M., Dowdy R.P., Preston M.A., Freeman J.N.**, (1976) *"Effect of dietary chromium on glucose tolerance and serum cholesterol in guinea pigs"*. J. NUTR., **106**: 1391
- Ray N.R. & Ray A.K.** (1975). *Indian Veterinary Journal*, 2:1455.
- Rehm S., Waalkes M.P.**, (1988) *"Cadmium-induced ovarian toxicity in hamsters, mice and rats"*. FUND. APPL. TOXICOL., **10**: 635
- Reissman K.R. e Coleman T.J.**, (1955). *"Acute intestinal intoxication of iron"*. II, BLOOD, 10:46.
- Rhian M. e Moxon A.L.** (1943) *"Interaction of arsenic and selenium"* in JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPY 78: pp 249-264
- Rhyne B.C. e Goyer R.A.**, (1971) *"Cytochrome content of kidney mitochondria in experimental lead poisoning."* EXP. MOL. PATHOL., **14**: 386.
- Riales R. e Albrink M.J.**, (1981) *"Effect of chromium chloride supplementation on glucose tolerance and serum lipids including high density lipoprotein of adult men"*. AM. J. CLIN. NUTR., **34**: 2670.
- Richard G., Federolf G., Habermann E.**, (1985) *"The interaction of aluminum and other metal ions with calcium-calmodulin-dependent phosphodiesterase"*. ARCH. TOXICOL., **57**: 257
- Richmond H.G.**, (1959). *"Induction of sarcoma in the rat by iron-dextran complex"*. BR. MED. J., 1959, 1:947.
- Ridgeway L. P. e Karnofsky D. A.**, (1952) *"The effects of metals on the chick embryo: toxicity and production of abnormalities in development"*. ANN. N.Y. ACAD. SCI., **55**: 203.
- Rinzky A., Perry A.S.**, (1983) *Postnatal development of the mixed function oxidase system in nestling barn owls and baby chicks and induction of this system in the mature forms by Aroclor 1254*. Comp. Biochem. Physiol., 75C:51-55.
- Rivera O.E., Belmonte N., Herkovits J.**, (1990) *Zinc protection against cadmium effect on estrual cycle of Wistar rat*. Biological Trace Element Research, 25:35-38.

- Roberts J.R., Rodgers D.W., Bailey J.R., Rorke M.A.,** (1978) *Polychlorinated biphenyls: biological criteria for an assessment of their effects on environmental quality*. Nat. Res. Coun. Canada, Rep.16077,172.
- Robertson J.L.,** (1986). „*Spontaneous renal disease in dogs*”. TOXICOL. PATHOL., 14:101-108..
- Robinson J.B., Touvinen O.H.,** (1984) “*Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analysis*”. MICROBIOL. REV., 48:95-124.
- Robinson J.B., Touvinen O.H.,** (1984) *Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercury compounds: physiological, biochemical and genetic analysis*. Microbiol. Rev., 48:95-124.
- Roels H.A., Djugang J., Buchet J.P., Bernard A., Lauwerys R.,** (1982) “*Evolution of cadmium-induced renal dysfunction in workers removed from exposure*”. SCAND. J. WORK ENVIRON. HEALTH, **8**: 191
- Rohrer T.K., Forney J.C., Hartig J.H.,** (1982) *Organochlorine and heavy metal residues in standard fillets of coho and chinook salmon of the Great Lakes*. J. Great Lakes Res., 8:623-634.
- Rom W.N.,** (1976) “*Effects of lead on the female and reproduction: a review*”. MONT SINAI J. MED., **43**: 542.
- Rosenfeld I & Beath O.A.,** (1946) WYOMING AGRC.EXP.STM.BULL. n. 275
- Rosenfeld, I., & O. A. Beath.** (1964). “*Selenium*”. GEOBOTANY, BIOCHEMISTRY, TOXICITY, AND NUTRITION. Academic Press, New York. 411 pp.
- Rossi S.C. e Wetterhahn K.E.,** (1989) “*Chromium (V) is produced upon reduction of chromate by mitochondrial electron transport chain complexes*”. CARCINOGENESIS, **10**: 913.
- Rossouw J., Offermeier J., van Rooyen J.M.,** (1987) “*Apparent central neurotransmitter receptor changes induced by low-level lead exposure during different developmental phases in the rat*”. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **91**: 132.

**Safe S., Hutzinger O.**, (1987) *Polychlorinated biphenyls (PCBs). Mammalian and environmental toxicology*. Environmental Toxin Series vol.1, Heidelberg, Springer-Verlag, 49-75.

**Saffiotti U., Cefis F. e Kolb L.H.**, (1968). "A new method for experimental induction of bronchogenic carcinoma", *CANCER RES.*, 28:104.

**Sakai H., Saeki K., Ichiashi H., Kamezki N., Tanabe S. & Tatsukawa R.** (2000) "Growth-related changes in heavy metal accumulation in green turtle (*Chelonia mydas*) from Yaeyama Islands, Okinawa, Japan" in *ARCHIVE OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY* 39, pp 378-385

**Samanta L., Chainy G.B.** (1997) Comparison of hexachlorocyclohexane-induced oxidative stress in the testis of immature and adult rats. *Comp. Biochem. Physiol C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 118(3): 319-327.

**Samarawickrama G.P.**, (1979) "Biological effects of cadmium in mammals". In: Webb M. Ed. *THE CHEMISTRY, BIOCHEMISTRY AND BIOLOGY OF CADMIUM*. Elsevier/North-Holland, New York, p. 341

**Scharpf L.G., Hill I.D., Wright P.L., Plank J.B., Keplinger M.L., Calandra J.C.**, (1972) "Effect of nitroacetate on toxicity, teratogenicity and distribution of cadmium". *NATURE*, 239: 231

**Schildernam P.a.e.I., hoogewerff J.A., van schooten F.J., Mass L.M., Moonen E.J.c., van Os B.J.H., van Wijnene J.H., Kleinjans J.C.S.** (1997). Possible relevance of pigeons as an indicator species for monitoring air pollution. *Environmental Health perspectives* vol. 105(3):322-330.

**Schlick E. e Friedberg K.D.**, (1981) "The influence of low lead doses on the reticulo-endothelial system and leukocytes of mice". *ARCH. TOXICOL.*, 47: 197.

**Schmitt C.J., Dwyer F.J., Finger S.E.**, (1984) "Bioavailability of Pb and Zn from mine tailings as indicated by erythrocyte d-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) activity in suckers (*Pisces: Catostomidae*)". *CAN. J. FISH. AQUAT. SCI.*, 41: 1030.

**Schmitt C.J., Zajicek J.L., Ribick M.A.**, (1985) *National Pesticide Monitoring Program: residues of organochlorine chemicals in freshwater fish, 1980-81*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 14:225-260.

- Schroeder H.A. & Mitchner M.**, (1972) "*Selenium and tellurium in mice*" in ARCH. ENVIRON. HEALTH 24, pp 66-71
- Schroeder H.A. e Mitchner M.**, (1971) "*Scandium chromium, gallium yttrium, rhodium, palladium and indium in mice: effects on growth and life span*". J. NUTR., **101**: 1431.
- Schroeder H.A.**, (1965) "*Cadmium as a factor in hypertension*". J. CHRON. DIS., **18**: 647.
- Schroeder H.A.**, (1966) "*Municipal drinking water and cardiovascular death rates*". J.A.M.A., **195**: 81
- Schroeder H.A., Balassa J.J., Tipton I.H.**, (1962) "*Abnormal trace metals in man—chromium*". J. CHRON. DIS., **15**: 941.
- Schroeder H.A., Balassa J.J., Vinton W.H.**, (1965) "*Chromium, cadmium and lead in rats. Effects on life span, tumors and tissue levels*". J. NUTR., **86**: 51.
- Schwaezenbach R.P., Gschwend P.M., Imboden D.M.**, (1993) *Environmental organic chemistry*. New York (NY), J. Wiley & Sons, 681.
- Serfass R.E. e Ganther H.E.**, (1975) "*Defective microbicidal activity in glutathione peroxidase deficient neutrophils of Se deficient rats*" NATURE 225, pp 640-641
- Settlemyre C.T e Matrone G.**, (1967a). "*In vivo interference of zinc with ferritin iron in the rat*". J. NUTR., 92:153-158.
- Settlemyre C.T e Matrone G.**, (1967b). "*In vivo effect of zinc on iron turnover in rats and life span of the erythrocyte*". J. NUTR., 92:159-164
- Shackelford J. e Martin J.**, (1980) "*Antibody response of mature male mice after drinking water supplemented with selenium*" FED.PROC. 39, pp 339-342.
- Shamberger R.J.**, (1983) "*Biochemistry of Selenium*" PLENUM PRESS, New York, p 243
- Shannon R.L. & Stayer D.S.**, (1989) HUM.TOXICOL 8: 198.
- Shearer R.G.**, (1994) *Global significance of the transport and accumulation of polychlorinated hydrocarbons in the Arctic*. N.Y., Plenum Press, 182-196.
- Sheehan P.J., Miller D.R., Butler G.C.**, (1984) *Effects of Pollutants at The Ecosystem level*. Chichester, John Wiley & Sons, 443.
- Sheffy B.E. e Schultz R.D.**, (1979) "*Influence of vitamin E and selenium on immune response mechanism*" FED.PROC. 38, pp 2139-2143.

**Shortridge E.H., O'Hara P.J. & Marshall P.M.,** (1971) "*Acute selenium poisoning in cattle*" N.Z.VET.J. 19: 47.

**Shuster C.N. Jr. e Pringle B.H.,** (1969) "*Trace metal accumulation by the American Oyster, Crassostrea virginica*". 1968 PROC. NAT. SHELLFISH. ASSOC., **59**: 91.

**Silbergeld E.K., Waalkes M. and Rice J.M.** (2000): "*Lead as a carcinogen: Experimental evidence and mechanisms of action*". AM. J. INDUST. MED. 38:316-323.

**Skerfving S., Ahlgren L., Christoffersson J.O., Haeger-Arosen B., Mattson S., Schutz A., Lindberg G.,** (1985) "*Metabolism of inorganic lead in man*". NUTR. RES. SUPPL., **1**: 601.

**Smedly P.L., Edmunds W.M. & Pelig-Ba K.B.,** (1996) in Appleton J.D., Fuge R. & McCall G.J.H. (Ed.) ENVIRONMENTAL GEOCHEMISTRY AND HEALTH Geological Society special publication, London, 113: pp 153

**Smith J.B., Dwyer S.D., Smith L.,** (1989) "*Cadmium evokes inositol polyphosphate formation and calcium mobilization. Evidence for a cell surface receptor that cadmium stimulates and zinc antagonizes*". J. BIOL. CHEM., **264**: 7115

**Soli N.E.,**1980. "*Chronic copper poisoning in sheep*". NORD. VET. MED., 32:75-89.

**Spallhoz J.E., Martin J.L., Gerlach M.L. e Heinzerling R.H.,** (1973) "*Immunologic response of mice fed diets supplemented with selenium*" PROC.SOC.EXP.BIOL.MED. 143, pp 685-689.

**Spallhoz J.E., Martin J.L., Gerlach M.L. e Heinzerling R.H.,** (1973). Immunologic response of mice fed diets supplemented with selenium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 143, p. 685-689.

**Sporn A., Dinu I., Stoenescu L., Cirstea A.,** (1969) „*Beitrage zur Ermittlung der Wechselwirkungen zwischen Cadmium und Zink*“. NAHRUNG, **13**: 461.

**Squibb K.S., Pritchard J.B., Fowler B.A.,** (1984) „*Cadmium metallothionein nephropathy: ultrastructural/biochemical alterations and intracellular cadmium binding*“. J. PHARMACOL. EXP. Ther., **229**: 311

- Stacey N.H., Cantilena L.R. Jr, Klaasen C.D.,** (1980) *“Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes”*. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **53**: 470
- Stern R.,** (1982) *“Chromium compounds: production and occupational exposure. In: Biologica and Environmental aspects of chromium”*. S. Langård Ed., Elsevier, Amsterdam, p.5.
- Steven J.D., Davies L.J., Stanley E.K., Abbott R.A., Ihnat M., Bidstrup L., Jaworski J.F.,** (1976) *„Effects of chromium in the Canadian environment“*. NAT. RES. COUN. Canada, NRCC No. 15017. 168 pp. Avail. from Publications, NRCC/CNRC, Ottawa, Canada, K1A OR6.
- Stevens D. G. e Chapman G.A.,** (1984) *“Toxicity of trivalent chromium to early life stages of steelhead trout”*. ENVIRON. TOXICOL. CHEM., **3**: 125.
- Stickel W.H., Stickel L.F., Dyrland R.A., Hughes D.L.,** (1984) *Aroclor 1254® residues in birds: lethal levels and loss rates*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 13:7-13.
- Stoecker B.,** (1999) *“Essentials of chromium bioavailability”*. OFFICE OF DIETARY SUPPLEMENTS, CHROMIUM AND DIABETES WORKSHOP SUMMARY, 4 nov. 1999, Natcher Conference Center, National Institute of Health.
- Stoeppler M.,** (1991) *“Cadmium”*. In: Merian E. Ed., METALS AND THEIR COMPOUNDS IN THE ENVIRONMENT. VCH, New York, p.803.
- Stokinger H.E. e Coffin D.L.,** (1968). *“Biological effects of air pollutants”*. In: AIR POLLUTION.. Academic Press, New York
- Stoll R., White J., Miya T., Bousquet W.,** (1976) *“Effects of cadmium on nucleic acid and protein synthesis in rat liver”*. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **37**: 61
- Storelli M.M. & Marcotrigiano G.O.** (2000). *“Total organic and inorganic arsenic from marine turtles (Caretta caretta) beached along the Italian coast (South Adriatic Sea)”*. BULLETTIN OF ENVIRONMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY, 65: 732-739.
- Storelli M.M. & Marcotrigiano G.O.** (2003). *“Heavy metal residues in tissues of marine turtles”*. MARINE POLLUTION BULLETTIN, 46: 397-400.
- Storelli M.M., Marcotrigiano G.O. & Ceci E.** (1998) *“Distribution of heavy metal residues in some tissues of Caretta caretta (Linneus) specimen beached along the*

*Adriatic Sea (Italy)* in BULLETTIN OF ENVIROMENTAL CONTAMINATION AND TOXICOLOGY 60, pp 546-552

**Strand O, Espelien IS e Skogland T.**, (1995). "*Metaller og radioaktivitet i villrein fra Rondane*". NINA Fragapport 05, NINA-NIKU, Trondheim.

**Suedel B.C., Boraczek J.A., Peddicord R.K., Clifford P.A., Dillon T.M.**, (1994) *Tropic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems*. Rev Environ. Contam.Toxicol., 136 : 21-89.

**Sunderman F.W. Jr**, (1978) "*Carcinogenic effects of metals*". FED. PROC., **37**: 40.

**Swiergosz R., Zakrzewska M., Sawicka-Kapusta K., Bacia K. e Janowska I.**, (1998). "*Accumulation of cadmium and its effect on bank vole tissues after chronic exposure*". ECOTOXICOL. ENVIRON. SAFETY, 41:130-136.

**Takenaka S., Oldiges H., König H., hochrainer D., Oberdörster G.**, (1983) "*Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in Wistar rats*". J. NATL. CANCER INST., **70**: 367

**Tam P.E. e Hinsdill R.D.**, (1984) "*Evaluation of immunomodulatory chemicals: alteration of macrophage function in vitro*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **76**: 183.

**Tandon S.K., Saxena D.K., Gaur J.S., Chandra S.V.**, (1978) "*Comparative toxicity of trivalent and hexavalent chromium. Alterations in blood and liver*". ENVIRON. RES., **15**: 90.

**Tang N. e Enger D.**, (1992) "*Cadmium's action on NRK-49F cells to produce responses induced also by TGF $\beta$  production or activation*". TOXICOLOGY, **71**: 161

**Tang S.**, (1985) in HUANJING KEXUE 6: pp 2

**Tang S.**, (1987) in ACTA SCI. CIRCUMSTANTIAE 7: pp 245

**Tataruch F.**, (1993). „*Vergleichende Untersuchungen zur Schwellmetallbelastung von Rot-, Reh- und Gamswild*“. ZEITSCHRIFT FUER JAGDWISSENSCHAFT, 39, 3:190-200.

**Thienes C.H. & Haley T.J.** (1972) "*Poisons with symptoms referable to the digestive Tract- Arsenic*" in CLINICAL TOXICOLOGY cp 20, pag 171-175.

- Thomas P.T., Ratajczak H.V., Aranyi C., Gibbons R. e Fenters J.D., (1985)** *"Evaluation of host resistance and immune function in cadmium-exposed mice"*. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **80**:446.
- Thompson E.D., McDermott J.A., Zerkle T.B., Skare J.A., Evans B.L.B. & Cody D.B., (1989)** *"Genotoxicity of zinc in 4 short-term mutagenicity says"* MUTATION RESEARCH 223, pp 267-272.
- Todd J.R. e Thompson R.H., (1963).** *"Studies on chronic poisoning.II. Biochemical studies on blood of sheep during hemolytic crisis"*. BR. VET. J., 119:161-173.
- Tohyama C., Sugihira N. e Saito H. (1987).** Critical concentrations of cadmium for renal toxicity in rats. J. Environ. Health, 22: 255-259.
- Tori G.M., Peterle T.J., (1983)** *Effects of PCBs on mourning dove courtship behavior.* Bull. Environ. Contam. Toxicol., 30:44-49.
- Towill L.E., Shriner C.R., Drury J.S., Hammons A.S., Holleman J.W., (1978)** *"Reviews of the environmental effects of pollutants: III chromium"*. U.S. ENVIRON. PROTECTION AGENCY REP. 600/1-78-023. 287 pp.
- Toyama I. & Kolmer J.A., (1918)** *"The influence of arsphenamine and mercuric chloride upon complement and antibody production"* in J. IMMUNOL. 3: pp 301.
- Trelease S.F., Di Somma A.A. e Jacobs A.L. (1960).** *Science*, 132. 618.
- Tscherkes L.A., Volgarev M.N., Aptekar S.G. (1963).** Selenium-caused tumors. Acta unio Int. contro. Cancrum 19: 632-633.
- Uriu-Hare J.Y., Stem J.S. e Keen C.L., (1989)** *"Influence of maternal dietary Zn intake on expression of diabetes-induced teratogenicity in rats"*. DIABETES 38, pp 1282-1290.
- Uyeki E.M. e Nishio A., (1983)** *"Antiproliferative and genotoxic effects of chromium on cultured mammalian cells"*. J. TOXICOL. ENVIRON. HEALTH, **11**: 227
- Vallee B.L. e Falchuck K.H., (1993).** *"The biochemical basis of zinc physiology"*. PHYSIOL. REV., 73:79-118.
- Vallee B.L. e Glades A., (1974)** *"The metallobiochemistry of zinc enzymes"*. ADV. ENZYMOL., **56**: 283

- Vallee B.L. e Ulmer D.D.**, (1972) "*Biochemical effects of mercury, cadmium and lead*". ANNU. REV. BIOCHEM., **41**: 91.
- Van Camper D.R e Scafe P.V.**, (1967). "*Zinc interference with copper absorption in rats*". J. NUTR., 91:473-476.
- Venugopal B. e Luckey T.D.**, (1978). "*Chemical toxicity of metals and metalloids*". METAL TOXICITY IN MAMMALS 2 Plenum Press, New York and London, pp. 24-32, 69-86, 185-195, 248-253, 275-283
- Vighi M., Bacci E.** (1998) Ecotossicologia. Editrice UTET, Torino.
- Virupaksha T.K. & Shrift A.** (1965). "*Biochim. Biophys*". Acta. 107: 69.
- Volgarev, M.N. and L.A. Tscherkas.** (1967). Further studies in tissue changes associated with sodium selenate. In: Selenium in Biomedicine, O.H. Muth, ed., First Int. Symp., Oregon State University, 1966. Avi Publ. Co., Inc., Westport CT. p. 179-184.
- Waalkes M.P., Coogan T.P. e Barter R.A.**, (1993) "*Toxicological principle of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium*". CRIT. REV. TOXICOL., **22**: 175
- Waalkes M.P., Oberdörster G.**, (1990) "*Cadmium carcinogenesis*". In: Foulkes E.C. Ed. BIOLOGICAL EFFECTS OF HEAVY METALS, vol II: metal carcinogenesis. CRC Press, Boca Raton. FL, p. 129.
- Waalkes M.P., Poirier L.A.**, (1984) "*In vitro cadmium-DNA interactions: cooperativity of cadmium binding and competitive antagonism by calcium, magnesium and zinc*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **75**: 539
- Waalkes M.P., Rhem S., Riggs C.W., Bare R.M., Devor D.E., Poirier L.A. Wenk M.L., Henneman J.R.**, (1989) "*Cadmium carcinogenesis in the male Wistar [CrI:WI]BR rats: dose response analysis of effects of zinc on tumor induction in the prostate, in the testes and at the injection site*". CANCER RES., **48**: 4656
- Wacker W.E.C. e Vallee B.L.**, (1959) "*Nucleic acids and metals. Chromium, manganese, nickel, iron and other metals in ribonucleic acid from diverse biological sources*". J. BIOL. CHEM., **234**: 3257.
- Wahba Z. e Waalkes M.P.**, (1990) "*Effect on in vivo low-dose cadmium pretreatment on the in vitro interactions of cadmium with isolated interstitial cells of the rat testes*". FUND. APPL. TOXICOL., **15**: 641.

- Waldron H.A.**, (1966) *"Anaemia of lead poisoning: a review"*. BR. J. IND. MED., **23**: 83
- Wang M.M., Fox E.A., Stoecker B.J., Menendez C.E., Chan S.B.**, (1989) *"Serum cholesterol of adults supplemented with brewer's yeast or chromium chloride"*. NUTR. RES., **9**: 989.
- Wania F., Mackay D.**, (1996) *Tracking the distribution of Persistent Organic Pollutants*. Environ. Sci. Technol., **30**: 390-396.
- Wayland M.** (2000): *Metals as threats to wildlife* in Short course on wildlife toxicology. Canadian Cooperativew Wildlife Centre. Saskatoon, 1-3 March 2000.
- Webb M.**, (1979) *"The chemistry, biochemistry and biology of cadmium"*. ELSEVIER/NORTH HOLLAND BIOCHEMICAL, New York
- Weiser M.G., O'Grady M.**, (1983). *"Erythrocyte volume distribution analysis and hematologic changes in dogs with iron deficiency anemia"*. VET PATHOL., **20**:230-241.
- Wetterhahn K.E. e Hamilton J.W.**, (1989) *"Molecular basis of hexavalent chromium carcinogenicity : effect on gene expression"*. SCI. TOTAL ENVIRON., **86**: 113.
- Whanger P.D.**, (1973) *"Effect of dietary cadmium on intracellular distribution of hepatic iron in rats"*. RES. COMMUN. CHEM. PATHOL. PHARMACOL., **5**: 733
- Whitaere R.W. & Pearson C.S.**, (1972) *"Arsenic and the Environment"* in MINERAL INDUSTRIES BULLETIN Colorado,School of Mines
- White D.H. e Finley M.T.**, (1978) *"Uptake and retention of dietary cadmium in mallard ducks"*. Environ. Res., **17**: 53.
- WHO** (1981) *"Arsenic"*in ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 12 World Health Organisation
- WHO**, (1996) *"Guidelines for drinking water qualità, raccomandations"* , 2°ed, 2° vol, World Health Organisation, Genere.
- WHO**, (2001) *"Arsenic Compounds"* in ENVIRONMENTAL HEALTH CRITERIA 2nd ed. World Health Organization 224
- Witzleben C.L. e Chaffey N.J.**, (1966). *"Acute ferrous sulfate poisoning"*. ARCH. PATHOL., **82**:454.
- Wobeser G.A.**, (1981) *Diseases of wild waterfowl*. Plenum Press, New York, 163.

**Wolkers H., Wensing T., Groot Bruinderink G.W.T.A.,** (1994). "*Heavy metal contaminations in organs of red deer (Cervus elaphus) and wild boar (Sus scrofa) and the effect on some trace elements*". THE SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT, 144:191-199.

**Wong K.L. e Klaassen C.D.,** (1980) "*Age differenca in the susceptibility to cadmium induced testicular damage in rats*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., **55**: 456.

**Woolson EA.** (1975) "*Arsenical pesticides*" da AMERICAN CHEM. SOC. SYMP., Ser.7 pag 176

**Worker N.A. e Migicovsky B.B.,** (1961) "*Effects of vitamin D on the utilization of zinc*". J. NUTR., 75: 222

**Wren C.D.**(1986) "*A review of metal accumulation and toxicity in wild mammals. 1 Mercury*" ENVIROMENTAL RESEARCH 40(1) PP 210-240

**Wright D.A., Welbourn P.,** (2002) *Environmental toxicology*. Cambridge University Press. Cambridge, U.K..120-154.

**www.zoomedia.it**

**Zarogian G.E. e Cheer S.,** (1976) "*Cadmium accumulation by the American oyster, Crassostrea virginica*". NATURE, 261: 408.

**Zarogian G.E.,** (1979). "*Studies on the depuration of cadmium and copper by the American oyster Crassostrea virginica*". BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., 23: 117.

**Zeya H.I e Spitznagel J.K,** (1968). „*Arginine-rich proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes: Antimicrobial specificity and biochemical heterogeneity*". J. EXP. MED., 127:927.

**Zollinger H.W.,** (1953) "*Kidney adenomas and carcinomas in rats caused by chronic lead poisoning and their relationship to corresponding human neoplasm*"a. VIRCHOWS ARCH. PATH. ANAT., 323, 694.