

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA  
PREVENZIONE**

**XXIII Ciclo (2008-2011)**

**Studio di coorte prospettico dell'associazione tra l'esposizione  
prenatale a mercurio e acidi grassi polinsaturi attraverso il  
consumo di pesce materno e lo sviluppo neurologico del  
bambino in una popolazione costiera del Friuli Venezia Giulia**

**Coordinatore:**

**Chiar.mo Prof. Antonio Mutti**

**Tutor:**

**Chiar.mo Prof. Fabio Barbone**

**Dottoranda:**

**Marika Mariuz**

# Indice

<b>LISTA DELLE ABBREVIAZIONI</b> .....	1
<b>RIASSUNTO</b> .....	3
<b>PREMESSA</b> .....	5
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	6
1.1. Il mercurio .....	6
1.2. Il mercurio nell'ambiente .....	8
1.2.1. Sorgenti e rilascio del mercurio nell'ambiente .....	9
1.2.2. Il ciclo del mercurio .....	9
1.2.2.1. Il mercurio in atmosfera .....	9
1.2.2.2. Il mercurio nel suolo .....	11
1.2.2.3. Il mercurio negli ecosistemi d'acqua dolce .....	12
1.2.2.4. Il mercurio negli ecosistemi marini .....	13
1.3. Il mercurio nel Mediterraneo .....	17
1.4. Il mercurio nel Golfo di Trieste .....	19
<b>2. FONTI DI ESPOSIZIONE E MECCANISMI DI TOSSICITÀ DEL MERCURIO</b> ..	24
2.1. Mercurio elementare .....	24

2.1.1. Metabolismo e cinetica del mercurio elementare -----	25
2.2. Mercurio inorganico-----	26
2.2.1. Metabolismo e cinetica del mercurio inorganico-----	26
2.3. Metilmercurio -----	27
2.3.1. Metabolismo e cinetica del metilmercurio -----	29
2.4. Tossicità fetale del metilmercurio -----	32
<b>3. RISK ASSESSMENT -----</b>	<b>38</b>
<b>4. RILEVANZA ED OBIETTIVI DELLO STUDIO-----</b>	<b>40</b>
4.1. Rilevanza per la sanità pubblica -----	40
4.2. Obiettivi dello studio -----	42
<b>5. MATERIALI E METODI-----</b>	<b>43</b>
5.1. Popolazione-----	43
5.2. Disegno dello studio-----	43
5.3. Raccolta dei campioni biologici -----	46
5.4 Biomarkers di esposizione -----	50
5.5. Analisi chimiche -----	52

5.6. Matrici Progressive di Raven -----	55
5.7. Questionari-----	56
5.8. Rilevazione dello sviluppo neurologico -----	57
5.9. Analisi statistiche -----	60
<b>6. RISULTATI</b> -----	<b>63</b>
<b>7. DISCUSSIONE</b> -----	<b>78</b>
<b>8. CONCLUSIONI</b> -----	<b>84</b>
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b> -----	<b>85</b>
<b>ALLEGATO 1</b> -----	<b>107</b>
<b>ALLEGATO 2</b> -----	<b>111</b>

## Lista delle abbreviazioni

ALA: acido  $\alpha$ -linolenico

ARA: acido arachidonico

As: arsenico

BSID III: Bayley Scales of Infant and Toddler Development, Terza edizione

Cd: cadmio

Cu: rame

DGM: mercurio gassoso disciolto

DHA: acido docosaesaenoico

DMeHg: dimetilmercurio

DPA: acido docosapentaenoico

EPA: acido eicosapentaenoico

FFQ: Food Frequency Questionnaire

Glu: glutammato

GSH: glutatione

Hg: mercurio

Hg<sup>0</sup>: mercurio elementare

Hg<sup>2+</sup>: catione mercurico bivalente

HgCl<sub>2</sub>: bicloruro di mercurio

Hg<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: cloruro mercurioso

HgS: cinabro

IHg: mercurio inorganico

LA: acido linoleico

L-Cys: L-cisteina

MeHg: metilmercurio

Mn: manganese

NMDA: N-metil-D-aspartato

Pb: piombo

PCB's: policlorobifenili

PUFA's: acidi grassi polinsaturi

QI: quoziente di intelligenza

RGM: mercurio gassoso reattivo

Se: selenio

SH: gruppo sulfidrilico

THg: mercurio totale

TPM: mercurio atmosferico particolato totale

Zn: zinco

## Riassunto

**Background:** Il mercurio (Hg) è un potente neurotossico. Il sistema nervoso fetale in via di sviluppo risulta essere particolarmente reattivo all'azione del Hg e l'esposizione prenatale anche a basse concentrazioni può causare nel feto gravi danni neurologici rilevabili sia durante lo sviluppo embrionale che in età scolare. La principale fonte di esposizione al Hg è costituita dal consumo di pesce.

**Obiettivi:** Valutare l'associazione tra l'esposizione prenatale a basse dosi di Hg attraverso il consumo di pesce materno e lo sviluppo neurologico dei bambini in una popolazione costiera del Friuli Venezia Giulia, tenendo in considerazione gli effetti di diversi potenziali fattori di confondimento tra cui le concentrazioni di acidi grassi polinsaturi (PUFA's).

**Metodi:** Attraverso uno studio di coorte prospettico sono state arruolate 900 donne gravide. La concentrazione di Hg è stata misurata in diversi campioni biologici inclusi i capelli delle madri durante la gravidanza ed il sangue del cordone. La concentrazione di PUFA's è stata misurata nei campioni di siero venoso materni. Il consumo di pesce durante la gravidanza è stato stimato attraverso un questionario. La rilevazione dello sviluppo neurologico dei bambini è stata effettuata attraverso la somministrazione del Bayley Test Scales of Infant and Toddler Development®, Third Edition, (BSID III). Mediante analisi di regressione lineare sono state esaminate le misure di associazione tra le concentrazioni di Hg misurate nei campioni biologici ed i punteggi ottenuti dai bambini al BSID III.

**Risultati:** Durante la gravidanza le donne arruolate hanno consumato in media meno di due porzioni di pesce a settimana. Le concentrazioni di Hg misurate nei campioni biologici sono risultate abbastanza basse (la concentrazione media di Hg misurata nei capelli della madri era di 1061 ng/g) e moderatamente correlate con il consumo di pesce riferito dalle donne. La concentrazione di PUFA's omega-3 è risultata bassamente correlata con il consumo di pesce riferito dalle donne. Dopo aggiustamento per i potenziali fattori di confondimento non sono emerse evidenze che il Hg abbia effetti avversi sul neurosviluppo dei bambini. I punteggi ottenuti dai bambini al BSID III sono risultati significativamente correlati con i fattori socio-economici e con lo stile di vita della famiglia di appartenenza.

**Conclusioni:** In questa popolazione costiera del Friuli Venezia Giulia non sono emerse evidenze che l'esposizione prenatale a basse dosi di Hg attraverso il consumo di pesce materno rappresenti un rischio per lo sviluppo neurologico dei bambini. I fattori correlati all'ambiente sociale sembrano costituire l'elemento di influenza maggiore.

## Premessa

Lo studio oggetto del presente dottorato è stato sviluppato all'interno del progetto di ricerca PHIME ("Public health impact of long term low level mixed element exposure in susceptible population strata", [www.phime.org](http://www.phime.org)).

Il Progetto PHIME, finanziato dall'Unione Europea nell'ambito del 6° Programma Quadro per la Ricerca e lo Sviluppo Tecnologico, ha preso avvio nel 2006 ed ha indagato attraverso 37 progetti di ricerca in 20 paesi del mondo l'impatto dell'esposizione a basse dosi di mercurio (Hg), piombo (Pb), cadmio (Cd), arsenico (As), manganese (Mn), uranio (U), platino (Pt), palladio (Pd) e radio (Ra) sulla salute delle popolazioni sensibili quali i feti, i bambini, le donne e gli anziani.

Il Work Package 1:3 del Progetto PHIME, ovvero il progetto di ricerca coordinato dall'Istituto di Igiene ed Epidemiologia dell'Università di Udine in collaborazione con i ricercatori di Slovenia, Croazia e Grecia ha avuto come obiettivo principale quello di valutare la relazione tra l'esposizione prenatale alla forma organica del mercurio (MeHg) attraverso l'alimentazione materna ricca di pesce e lo sviluppo neurologico dei bambini. Tramite uno studio di coorte prospettico sono state arruolate e monitorate 1729 coppie madre-bambino residenti in aree costiere del Mediterraneo ed esposte attraverso il consumo di pesce al MeHg. Sono state reclutate quattro coorti in diverse aree del Mediterraneo (nella città di Trieste, nella città di Ljubljana in Slovenia, nella città di Rijeka in Croazia ed in quattro isole greche dell'Egeo).

Lo sviluppo neurologico e psicologico dei bambini è stato accertato attraverso la somministrazione del Bayley Test Scales of Infant and Toddler Development®, Third Edition, (BSID III) all'età di 18 mesi. I risultati ottenuti nel test di sviluppo neurologico sono stati messi in relazione con le abitudini alimentari e lo stile di vita materno, eventuali esposizioni ambientali e/o occupazionali e soprattutto con le concentrazioni dei contaminanti rilevate nei campioni biologici analizzati.

La partecipazione allo studio PHIME ha avuto un'importante ricaduta in termini di salute pubblica, poiché l'analisi dei dati raccolti in relazione alle abitudini alimentari, all'ambiente familiare ed alle esposizioni al MeHg attraverso il consumo di pesce ha permesso di orientare le future gestanti con informazioni precise e consigli mirati riguardanti l'alimentazione da adottare nel corso della gravidanza, evitando inutili allarmismi e fornendo maggiori garanzie per uno sviluppo adeguato dei loro bambini.

# 1. Introduzione

## 1.1. Il mercurio

Il mercurio è un metallo di transizione pesante di colore bianco argenteo caratterizzato da simbolo Hg e da numero atomico 80 ed è uno dei soli tre elementi liquidi a temperatura ambiente. Noto fin dall'antichità, il Hg è stato utilizzato a partire dal 1500 nei processi di estrazione dell'oro e dell'argento grazie alla sua predisposizione alla formazione di amalgame (Hylander and Meili 2003).

Raramente presente in natura come metallo nativo, si ritrova più spesso sotto forma di amalgame come ad esempio nella corderite, nella livingstonite e soprattutto nel cinabro (HgS) dal quale viene estratto previo arrostitimento in corrente d'aria e successiva condensazione del gas prodotto (Clarkson 1997).

Il Hg può essere presente nell'ambiente nelle forme chimiche di mercurio elementare, inorganico ed organico (NRC 2000).

Il mercurio elementare (Hg<sup>0</sup>) si presenta liquido e altamente volatile a temperatura ambiente. Presenta bassa viscosità, elevate densità e tensione superficiale, mentre la conducibilità termica ed elettrica, per quanto elevate, risultano notevolmente inferiori rispetto a quelle degli altri metalli.

Molto diffuso, soprattutto in passato, l'utilizzo del Hg<sup>0</sup> nei termometri e nei barometri. Inoltre, grazie alle sue speciali caratteristiche fisiche, è stato spesso impiegato in strumenti ed apparecchi elettrotecnici, come materiale catodico durante l'elettrolisi cloroalcalina per la produzione del cloro e come amalgama nelle leghe dentarie (Fitzgerald 1999).

Il Hg<sup>0</sup> viene emesso in atmosfera sotto forma di vapore da numerose fonti, sia antropiche che naturali, quali l'industria mineraria, l'industria chimica e siderurgica, l'industria della carta, i processi di combustione, gli inceneritori e le discariche, le emissioni vulcaniche e geotermiche e l'erosione della crosta terrestre ad opera dei venti (ATSDR 1999).

Le forme inorganiche del mercurio possono avere stato di ossidazione +1 e +2 e derivano dall'unione del Hg con elementi non metallici come il cloro (Cl), lo zolfo (S) e l'ossigeno (O). I composti corrispondenti allo stato di ossidazione +2 (composti mercurici) hanno natura prevalentemente covalente, volatilizzano con il calore, si riducono facilmente a composti mercuriosi e a Hg<sup>0</sup> e tendono a idrolizzarsi in soluzione acquosa. I composti corrispondenti allo

stato di ossidazione +1 (composti mercuriosi), nei quali due atomi di Hg sono legati da un legame covalente metallo-metallo a formare lo ione dimero  $\text{Hg}_2^{2+}$ , sono di tipo ionico, hanno una bassissima tendenza a formare composti la cui solubilità è molto bassa e tendono al disproportionamento  $\text{Hg}_2^{2+} \rightarrow \text{Hg} + \text{Hg}^{2+}$ . Nei comparti ambientali si ritrovano prevalentemente le forme inorganiche del Hg aventi stato di ossidazione +2 ovvero i cationi mercurici bivalenti  $\text{Hg}^{2+}$ .

Fra i sali di Hg vanno ricordati: il bicloruro di mercurio ( $\text{HgCl}_2$ ) usato come battericida, il solfato mercurioso ( $\text{HgSO}_4$ ) usato come catalizzatore in molte sintesi organiche, il calomelano o cloruro mercurioso ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ ) impiegato negli psicometri e l'ossido di mercurio ( $\text{HgO}$ ) impiegato nella fabbricazione delle pile.

I composti inorganici del Hg vengono utilizzati in numerosi processi industriali, nell'industria delle vernici e come fungicidi. (EFSA 2008).

Esistono diversi composti organici del mercurio tra i quali il più pericoloso e diffuso è il monometilmercurio o metilmercurio (MeHg). Il MeHg non ha applicazioni industriali ma si origina dalla metilazione dei cationi  $\text{Hg}^{2+}$  ad opera di alcuni batteri anaerobi che vivono nel suolo e nei sedimenti marini, lacustri e fluviali. La maggior parte del MeHg presente nell'ambiente è un prodotto della respirazione dei batteri anaerobi zolfo-riducenti, (SRB, sulfate-reducing-bacteria), sebbene da studi effettuati in laboratorio sia emerso come numerosi altri tipi di batteri siano in grado di effettuare il processo di metilazione (Compeau and Bartha 1985).

Nella reazione di metilazione un atomo o un gruppo ionico di un composto del Hg (stato di ossidazione +2) è rimpiazzato da un gruppo metile ( $-\text{CH}_3$ ) originando il catione monometilmercurio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) (Honda et al. 2006). Il catione monometilmercurio si combina rapidamente con anioni quali lo ione cloruro ( $\text{Cl}^-$ ), lo ione idrossido ( $\text{OH}^-$ ), lo ione nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ed altri gruppi anionici tipicamente presenti negli acidi umici e fulvici del suolo e dei sedimenti.

In ambiente acquatico diverse specie di batteri giocano un ruolo importante nei processi di metilazione e demetilazione del Hg presente a livello dei sedimenti (Compeau and Bartha 1984; Baldi et al. 1989).

Condizione essenziale affinché la metilazione avvenga è la presenza di un ambiente ricco d'acqua, anossico e con abbondante sostanza organica disponibile come substrato per le popolazioni di microrganismi. Le condizioni migliori si ritrovano nei sedimenti fangosi lacustri o di palude ricchi di sostanza organica e poveri di ossigeno; il processo di metilazione avviene anche nei sedimenti sabbiosi, sia marini che lacustri e nei suoli anche se con cinetiche più lente e rendimenti minori. La massima intensità del processo di metilazione si verifica nei primi 10 cm

di sedimento inoltre l'aumentare della temperatura dovuto alla luce solare facilita ulteriormente l'attività batterica e di conseguenza il processo di metilazione. La sintesi e la stabilità del MeHg sono migliori in condizioni anaerobiche e di bassa salinità; al contrario la presenza di ossigeno e l'elevata salinità determinano una riduzione nei processi di sintesi del MeHg ed un aumento dei processi di demetilazione dello stesso alla forma di  $Hg^{2+}$  (Compeau and Bartha 1984; Compeau and Bartha 1987). Mentre il processo di metilazione avviene prevalentemente per via biologica, la demetilazione avviene comunemente mediante reazioni sia biotiche che abiotiche (Skylberg et al. 2006).

Il MeHg è un composto fortemente tossico e biodisponibile e una volta assorbito dai produttori primari tende a bioaccumularsi nel passaggio attraverso la catena alimentare acquatica concentrandosi nei tessuti dei consumatori all'apice della catena stessa. Il MeHg penetra all'interno della rete trofica acquatica attraverso il plancton (fitoplancton e zooplancton) e gli invertebrati, prosegue con i pesci di taglia più piccola accumulandosi sempre di più attraverso il processo di biomagnificazione e raggiungendo le concentrazioni maggiori all'interno dei pesci carnivori al vertice della catena alimentare.

I grandi pesci carnivori arrivano ad avere una concentrazione di MeHg da 10.000 a 100.000 volte maggiore rispetto a quella dell'acqua in cui vivono e costituiscono la fonte più importante di introduzione di MeHg nell'organismo umano.

I composti organici del Hg sono stati ampiamente utilizzati in passato come fungicidi nelle preparazioni cosmetiche e farmaceutiche, come disinfettanti (Mercurocromo) e nel controllo della crescita degli organismi microbici (Tiomerosal) (EFSA 2008).

## **1.2. Il mercurio nell'ambiente**

Il Hg è un metallo naturalmente presente nell'ambiente, è uno dei costituenti della crosta terrestre e si ritrova nell'aria, nell'acqua, nel suolo, nei sedimenti acquatici, nelle piante e negli animali (Davidson et al. 2004). Il Hg è uno degli inquinanti più tossici ed insidiosi per la salute dell'uomo, i suoi composti sono persistenti nell'ambiente e vengono rilasciati da un'ampia varietà di fonti sia naturali che antropiche.

### **1.2.1. Sorgenti e rilascio del mercurio nell'ambiente**

Le fonti di emissione naturali sono rappresentate dai vulcani, dagli incendi, dalla degradazione delle sostanze minerali, dall'erosione del suolo terrestre e dall'evaporazione dal suolo e dalle acque (Hedgecock 2006). Il rilascio di Hg dalle sorgenti naturali è rimasto pressoché invariato nel corso dei secoli; al contrario grande importanza rivestono le fonti di emissione antropiche, che a partire dalla rivoluzione industriale hanno dato un contributo significativo all'emissione del Hg nell'ambiente.

Tra le fonti di emissione antropica ritroviamo i processi di produzione di energia attraverso la combustione del petrolio e del carbone, l'industria della plastica dove viene utilizzato come catalizzatore nella sintesi di poliuretani e del cloruro di vinile, l'industria delle vernici e della carta dove viene utilizzato come antimuffa, gli impianti cloro-soda in cui viene utilizzato come catodo nell'elettrolisi del cloruro di sodio, la fabbricazione di dispositivi elettrici (lampade a vapori di mercurio, batterie, interruttori a mercurio), la produzione di calce e cemento, gli inceneritori, l'industria mineraria, i processi di amalgamatura per l'estrazione di oro e argento su piccola scala e la fabbricazione di termometri e barometri.

Negli ultimi decenni l'utilizzo industriale del Hg, a causa della contaminazione della catena alimentare, è stato notevolmente ridotto e si possono considerare obsoleti gli impieghi in agricoltura come antimuffa, nelle batterie, nelle apparecchiature elettriche, come antifungino e nelle amalgame dentali (EFSA 2008). La sua presenza nell'ambiente, tuttavia, è stazionaria per l'alta persistenza di questo elemento nelle precipitazioni atmosferiche e nei sedimenti marini.

### **1.2.2. Il ciclo del mercurio**

La diffusione del Hg è regolata da un complesso ciclo di carattere globale e transfrontaliero che coinvolge tutti i comparti naturali ovvero l'atmosfera, l'idrosfera e la geosfera.

#### **1.2.2.1. Il mercurio in atmosfera**

Il ciclo atmosferico del Hg è basato sulla conversione nel suolo e nell'acqua del  $\text{Hg}^{2+}$  a  $\text{Hg}^0$  e a dimetilmercurio ( $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ ) (DMeHg), forme volatili che quindi possono passare all'atmosfera; segue la riossidazione atmosferica del  $\text{Hg}^0$  che ricade sulle superfici acquatiche e terrestri attraverso le deposizioni secche e umide.

Le attività umane hanno introdotto un grosso elemento di squilibrio nel ciclo globale del Hg, attualmente si stima che circa i due terzi di tutto il Hg presente nell'ambiente siano stati prodotti nel corso del ventesimo secolo e che il carico di Hg immesso attualmente nell'ambiente sia il triplo rispetto a quello di inizio '900. Il comparto naturale maggiormente coinvolto dalle emissioni di Hg, siano esse naturali o antropogeniche, è quello atmosferico da cui successivamente il Hg diffonde anche agli altri comparti.

La principale fonte antropogenica di Hg in atmosfera è costituita dalle emissioni degli impianti termoelettrici alimentati a carbone; i processi di produzione di vari metalli, i cementifici, gli impianti cloro-soda, l'estrazione artigianale dell'oro ed il non corretto smaltimento dei rifiuti contenenti Hg costituiscono altre importanti sorgenti umane di Hg in atmosfera.

Le emissioni naturali di Hg gassoso (volatilizzazione dal suolo o dal corpo idrico) sono costituite interamente da  $\text{Hg}^0$ . Le emissioni antropogeniche gassose hanno invece sia una componente di  $\text{Hg}^0$  sia una componente aggiuntiva, costituita da Hg adsorbito su particolato (TPM Total Particulate Mercury) o da forme di Hg con caratteristiche di volatilità e reattività diverse, prevalentemente divalenti (Rinklebe et al. 2009). Quest'ultima componente è denominata Hg gassoso reattivo (RGM, reactive gaseous mercury) ed è costituita soprattutto da  $\text{HgCl}_2$  (Gibicar et al. 2009). Mentre il  $\text{Hg}^0$  entra facilmente a far parte del ciclo transfrontaliero, il RGM ed il TPM sono maggiormente soggetti a deposizione locale o regionale, provocando un innalzamento dei livelli di Hg nelle aree in prossimità ad importanti sorgenti di emissione.

Più del 90% del Hg presente in atmosfera è sotto forma di  $\text{Hg}^0$  gassoso (Fitgerald and Clarkson 1991; Zhang et al. 2009; Rinklebe et al. 2009) ed il tempo di permanenza medio in atmosfera del  $\text{Hg}^0$  è di circa un anno; questo tempo di permanenza relativamente lungo permette al Hg di percorrere ampie distanze, fino a 2500 Km in 72 ore, sfruttando le correnti dominanti (Gibicar et al. 2009). Il  $\text{Hg}^0$ , durante la permanenza in atmosfera, viene frequentemente ossidato alla forma  $\text{Hg}^{2+}$ . Il tempo di permanenza in atmosfera dei composti ossidati è pari ad alcuni giorni e dunque nettamente inferiore rispetto a quello del  $\text{Hg}^0$  (Ray and Selvakumar 2007). I composti ossidati ritornano alla superficie terrestre attraverso le deposizioni secche e umide e costituiscono il principale apporto di Hg al suolo ed ai sedimenti. I modelli di deposizione atmosferica del Hg uniti ai dati raccolti sul campo mostrano come zone caratterizzate da un clima umido presentino un tasso di deposizione maggiore rispetto alle zone con clima più arido (Grigal 2002).

### 1.2.2.2. Il mercurio nel suolo

La concentrazione di Hg nel suolo è fortemente variabile e dipende dalla distanza delle sorgenti di emissione oltre che dal tipo di rocce presenti, dal pH, dalla capacità di scambio cationico, dalla presenza di acqua, dai microrganismi presenti e dai processi di erosione. La concentrazione di Hg cresce significativamente negli strati superficiali del suolo, mentre decresce con la profondità; il suolo rappresenta il principale serbatoio di Hg nell'ambiente e costituisce la più importante fonte di questo metallo nel ciclo del sistema terrestre.

Nei suoli i composti di Hg sono soggetti a un'ampia serie di reazioni chimiche e biologiche. In questo comparto infatti le condizioni chimico-fisiche (temperatura, pH, contenuto di acidi umici) sono favorevoli alla formazione di composti inorganici semplici (ad esempio  $\text{HgCl}_2$ ) o complessati da leganti organici.

La maggior parte dei composti inorganici del Hg presenti nei suoli non contaminati è legato alla materia organica (soprattutto gli acidi umici e fulvici) principalmente in ragione dell'elevata affinità tra il  $\text{Hg}^{2+}$  e i suoi composti ed i gruppi funzionali contenenti zolfo presenti negli acidi organici del terreno. La complessazione riduce fortemente la mobilità del Hg, di conseguenza, una volta raggiunto questo comparto, il trasporto avviene principalmente tramite run-off della frazione legata al particolato e, in misura minore, in forma disciolta grazie alla complessazione con leganti organici in soluzione.

Complessivamente le quantità di Hg rimosse attraverso run-off del particolato oppure attraverso le acque di dilavamento rappresentano solamente una piccola frazione delle quantità totali di Hg contenute nei suoli.

A livello del suolo il Hg va incontro ad alcuni processi di trasformazione che ne consentono una seppur lenta rimobilizzazione:

- riduzione a  $\text{Hg}^0$ : questa reazione può essere mediata dagli acidi umici e dalla luce (Carpi and Lindberg 1997). In questa forma il Hg permea facilmente attraverso il terreno e viene riemesso in atmosfera;
- alchilazione a DMeHg da parte dei batteri anaerobi solfato-riduttori presenti nel terreno; il DMeHg a causa della sua notevole instabilità, in presenza di acqua viene rapidamente convertito in MeHg.

Questi processi avvengono in prossimità della superficie dove il suolo è costituito da una miscela di rocce, terra, acqua, aria e microrganismi.

Il 97-99% del Hg contenuto nei suoli non contaminati è sottoforma di complessi organici, una frazione pari all'1-3% è sottoforma di MeHg, mentre la percentuale di Hg presente nella forma  $Hg^0$ , data la sua elevata volatilità, è assolutamente trascurabile.

### **1.2.2.3. Il mercurio negli ecosistemi d'acqua dolce**

Le principali vie di penetrazione del Hg negli ecosistemi di acqua dolce sono costituite dalle deposizioni atmosferiche, dal dilavamento del suolo e dalla lisciviazione dei terreni ad opera delle acque di falda che comunicano con le acque superficiali.

Nelle acque dolci la concentrazione delle forme inorganiche del Hg è regolata dai seguenti processi:

- riemissione verso l'atmosfera dopo essere stato ridotto a  $Hg^0$ ;
- accumulo nei sedimenti e successiva trasformazione chimica in composti insolubili (solfuri);
- metilazione e successivo bioaccumulo nel biota.

Il  $Hg^0$  viene prodotto nelle acque dolci in seguito alla riduzione di composti contenenti  $Hg^{2+}$  mediata dagli acidi umici o per demetilazione del MeHg mediata dalla luce solare.

In condizioni di potenziale redox riducenti tutto il Hg presente nelle acque dolci si trova nella forma di  $Hg^0$  oppure nella forma relativamente insolubile di HgS. In condizioni di potenziale redox ossidanti tutto il Hg presente nell'acqua si trova prevalentemente sottoforma di  $Hg^{2+}$ , di  $Hg_2Cl_2$  (molto solubile) e di  $HgCl_2$  (solubile). La maggiore solubilità di  $Hg^{2+}$  lo rende più facilmente disponibile alla metilazione rispetto alla forma  $Hg^0$ .

Nelle acque dolci il processo di metilazione avviene prevalentemente ad opera di batteri solfato-riduttori che sono in grado di produrre, attraverso l'azione di enzimi intracellulari, MeHg e DMeHg a partire dal  $Hg^2$ . Il MeHg costituisce la principale specie di Hg organico presente nelle acque dolci mentre il DMeHg, che costituisce la principale specie di Hg organico rilevabile nelle acque oceaniche, si ritrova nelle acque dolci in concentrazioni al limite della rilevabilità (Horvat et al. 1999).

Sono responsabili della metilazione, sebbene in misura inferiore, anche altri microrganismi ed alcuni processi abiotici (reazioni con acidi umici e fulvici) (Nagase et al. 1982).

La reazione di metilazione, che avviene sia nella colonna d'acqua che nei sedimenti, è influenzata da tutte quelle variabili ambientali che regolano la disponibilità delle diverse forme chimiche del Hg quali il pH, la disponibilità di ossigeno e la temperatura. A livello dei sedimenti,

la massima intensità di tali processi si verifica nei primi 10 cm e nel primo centimetro tutto il Hg è presente in forma metilata. L'attività batterica aumenta all'aumentare della temperatura e della presenza di carbonio organico biodegradabile e di conseguenza la velocità di metilazione tende ad essere maggiore nello strato superficiale dei sedimenti, in cui si trova materiale organico depositato in tempi recenti. Il MeHg è un composto fortemente tossico e biodisponibile e una volta assorbito dai produttori primari tende a bioaccumularsi nel passaggio attraverso la catena alimentare acquatica concentrandosi nei tessuti muscolari dei pesci predatori posti ai livelli trofici più elevati (Winfey and Rudd 1990; Mason and Fitzgerald 1990; Gilmour and Henry 1991; Mason and Fitzgerald 1991). Anche se una piccola frazione del MeHg può provenire direttamente dall'atmosfera, la gran parte di quello che si ritrova nei pesci viene originato per metilazione nell'ambiente acquatico (Fitzgerald et al. 1991). Esiste anche il processo inverso, ovvero la demetilazione, con produzione di  $Hg^0$ ; anche questo processo è mediato da organismi batterici oltre che dalla radiazione ultravioletta e sembra dipendere dalle concentrazioni dei solfati e degli acidi fulvici e umici (Gilmour et al. 1992; Hudson et al. 1994).

#### **1.2.2.4. Il mercurio negli ecosistemi marini**

Il Hg presente nelle acque e nei sedimenti marini rappresenta una riserva rilevante del Hg totale presente nel pianeta. Come nelle acque dolci anche nelle acque e nei sedimenti marini il  $Hg^{2+}$  viene trasformato in MeHg attraverso reazioni sia biotiche che abiotiche (Jenses and Jernelov 1969; Shin and Krenkel 1976; Ikingura and Akagi 1999); anche nella catena trofica marina avvengono i processi di bioaccumulo e biomagnificazione. Poiché la principale via di esposizione umana al MeHg è costituita dal consumo di pesce marino (Rolfhus and Fitzgerald 1995) è estremamente importante, per predire il potenziale impatto di questo tossico sulla salute, analizzare il trasporto e le dinamiche di distribuzione del Hg negli ecosistemi marini. A tale scopo è necessario esaminare l'ambiente oceanico come un insieme costituito da tre differenti comparti: l'oceano aperto, le aree costiere e le zone di upwelling ovvero le zone a livello delle quali si ha il processo di risalita del Hg dai fondali oceanici (Rolfhus and Fitzgerald 1995).

L'oceano aperto costituisce circa il 90% dell'area esaminata, ma ha una scarsa importanza per quanto riguarda la produzione di pesce; le aree costiere e le zone di upwelling invece, pur costituendo solo il 10% del totale, costituiscono l'habitat di quasi tutta la fauna ittica.

Il principale input di Hg all'ambiente oceanico è costituito dalle deposizioni atmosferiche e dal processo di upwelling. All'interno della colonna d'acqua il  $Hg^{2+}$  può venire ridotto con conseguente formazione di specie chimiche volatili che vengono riemesse in atmosfera

(Fitzgerald et al. 1991). Le specie chimiche volatili disciolte nell'acqua sono indicate con l'acronimo di DGM (Dissolved Gaseous Mercury) e sono costituite prevalentemente da  $\text{Hg}^0$  (Hudson et al. 1994). L'importanza della formazione di DGM nel sistema acquatico deriva dal fatto che, da un punto di vista globale, l'emissione di Hg dalla superficie acquatica costituisce il 30% delle emissioni annue totali di questo metallo nell'atmosfera (Mason et al. 1994). Inoltre la formazione di DGM ed il processo di volatilizzazione del Hg sottraggono una parte di  $\text{Hg}^{2+}$  ai processi di metilazione e al successivo bioaccumulo lungo la catena trofica (Fitzgerald 1993). I meccanismi di riduzione del  $\text{Hg}^{2+}$  sono dovuti a reazioni di tipo foto-chimico (processi abiotici) e all'intervento di organismi procariotici ed eucariotici (processi biotici). Una parte del  $\text{Hg}^{2+}$  non viene ridotto alla forma elementare volatile ma si lega al particolato in soluzione e si deposita con questo sul fondale.

Diversi studi hanno dimostrato che il Hg organico si forma inizialmente nelle acque oceaniche profonde e solo successivamente attraverso il processo di upwelling viene trasportato nelle acque costiere prevalentemente nella forma di MeHg. Solo una minima parte del Hg organico presente nelle acque costiere origina da processi di metilazione che avvengono in loco (Mason et al. 1995; Cossa et al. 1996). Il principale apporto di Hg alle acque costiere è rappresentato dal Hg associato al materiale particolato trasportato dalle acque fluviali; la maggior parte di questo Hg non è reattivo e si deposita rapidamente nei sedimenti in prossimità della costa (Horvat et al. 1999). Solamente una piccola frazione del Hg trasportato dalle acque fluviali è nella forma  $\text{Hg}^{2+}$ , ovvero è immediatamente disponibile per le reazioni di metilazione e di riduzione (Cossa et al. 1996). Le concentrazioni di Hg rilevabili nelle acque oceaniche profonde sono molto basse, di solito al di sotto di 1 ng/l; una parte del Hg disciolto è sotto forma di cloro complessi mentre la rimanente è associata a particelle in sospensione; nelle acque di superficie altamente produttive il Hg può essere presente anche come  $\text{Hg}^0$ , mentre in quelle profonde si ritrovano esclusivamente le forme organiche MeHg e DMeHg (Mason et al. 1995; Cossa et al. 1994, 1996). Nelle acque oceaniche profonde, al di sotto del termoclino, si forma principalmente DMeHg; il DMeHg a causa della sua instabilità viene per la maggior parte demetilato a formare MeHg. Nell'ambiente oceanico il DMeHg costituisce la forma di Hg organico maggiormente presente e costituisce la fonte primaria di MeHg (Horvat et al. 1999).

La concentrazione di Hg nelle acque delle aree costiere tende ad essere maggiore rispetto a quella rilevata nelle acque aperte e questo è dovuto essenzialmente alla presenza di abbondante materiale particolato (Cossa et al. 1996). La concentrazione del Hg associato al particolato varia da 0,05 a 1  $\mu\text{g/g}$  nelle aree non contaminate mentre raggiunge i diversi  $\mu\text{g/g}$  nelle aree costiere

contaminate (Horvat 1996); la concentrazione del Hg disciolto invece è piuttosto bassa con concentrazioni comprese tra 0,3 a 1,6 ng/l. La quantità di Hg associato al particolato è direttamente proporzionale al contenuto in materia organica di quest'ultimo, soprattutto in zone ricche di fitoplancton. Nelle acque costiere il DMeHg è presente in concentrazioni estremamente basse mentre il MeHg si ritrova essenzialmente legato al particolato (Cossa et al. 1996); il MeHg può costituire fino al 3% del Hg totale associato al particolato. (Coquery and Cossa 1995; Coquery et al. 1995; Cossa et al. 1996). Nelle zone costiere (comprese le zone di estuario) la reazione di metilazione avviene sia nella colonna d'acqua che nei sedimenti.

Il MeHg che si forma nelle zone costiere è da un punto di vista quantitativo molto importante, essendo circa 10 volte superiore a quello trasportato in mare dai fiumi. La produzione di MeHg nelle zone di upwelling invece è estremamente bassa.

I sedimenti oceanici costituiscono un'importante serbatoio per il Hg associato al particolato oltre che essere sede del processo di metilazione del  $\text{Hg}^{2+}$  a MeHg e DMeHg. Nei sedimenti la produzione del MeHg è influenzata dalla concentrazione di solfuri; all'aumentare della concentrazione dei solfuri il MeHg viene perso a causa di una reazione di dismutazione, un processo attraverso il quale il MeHg viene trasformato in DMeHg e HgS attraverso la decomposizione del dimetilmercurio solfuro. Tali reazioni possono anche generare  $\text{Hg}^0$  a causa della riduzione di  $\text{Hg}^{2+}$  (Craig and Moreton 1986; Winfrey and Rudd 1990). Sia il DMeHg che il  $\text{Hg}^0$  sono in forma gassosa e volatilizzano dai sedimenti; il MeHg associato al particolato presente nei sedimenti costituisce circa l'1% del Hg totale ed origina prevalentemente da processi di metilazione che avvengono in loco. La diffusione del MeHg e del  $\text{Hg}^{2+}$  dai sedimenti alla colonna d'acqua soprastante è piuttosto bassa ed è regolata dai processi di diffusione molecolare e dal trasferimento biologico a livelli trofici superiori (Covelli et al. 1999).

In Figura 1 è riportato il ciclo marino del mercurio.

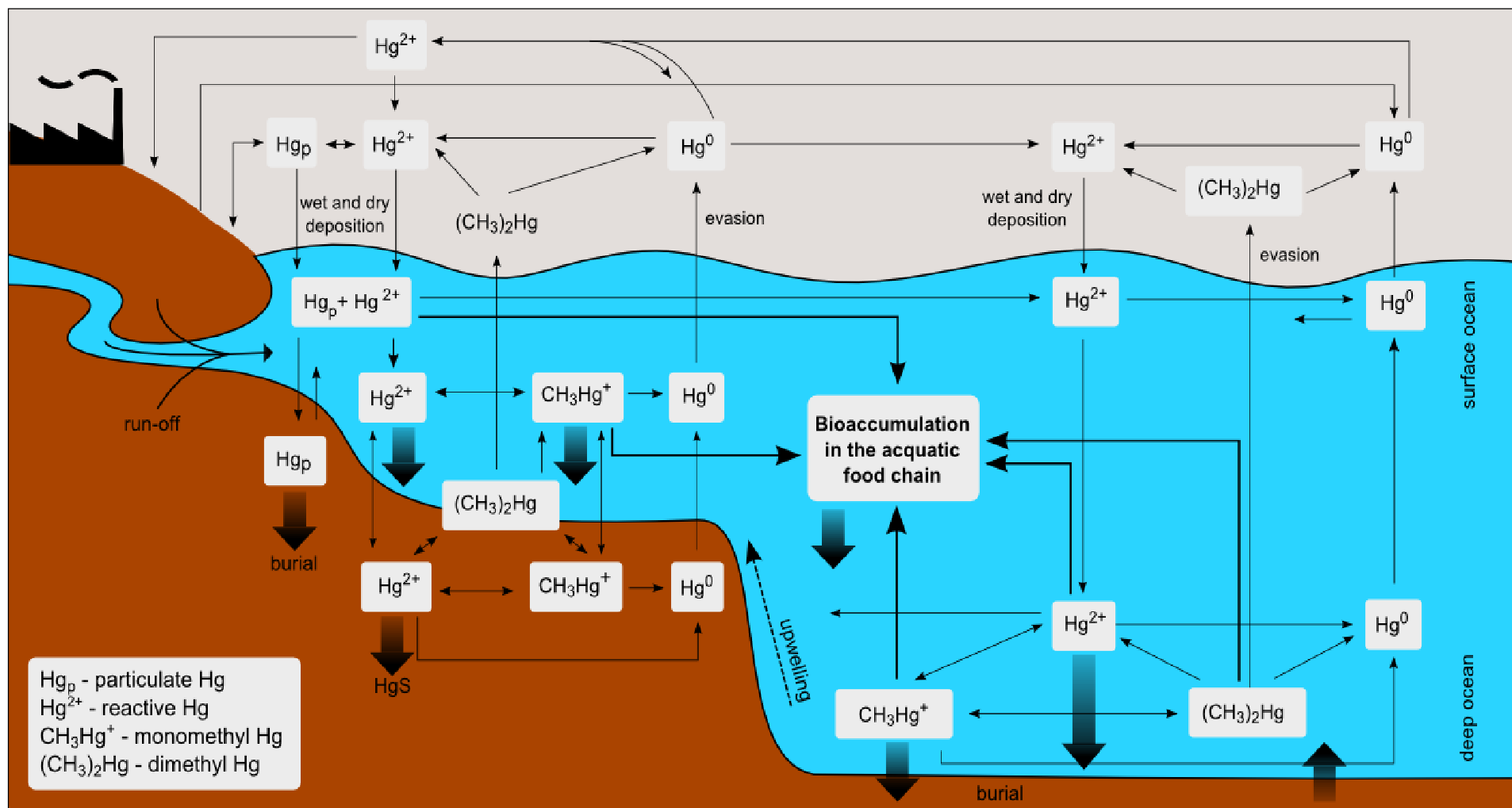


Figura 1. Ciclo marino del mercurio (Horvat et al. 1999).

### 1.3. Il mercurio nel Mediterraneo

Il bacino del Mediterraneo è un bacino intercontinentale semichiuso situato tra Europa, Africa e Asia, occupato nella sua parte centrale dal Mar Mediterraneo e caratterizzato da un'intensa attività geotermica e dalla presenza di estesi depositi di HgS (Renzoni et al. 1998; Storelli et al. 2005). Dal HgS si estrae il Hg previo arrostitimento in corrente d'aria e successiva condensazione del gas prodotto (Clarkson 1997). In natura il Hg è raramente presente come metallo nativo ma si ritrova generalmente nel HgS, nella corderite, nella livingstonite ed in altri minerali; HgS è il più comune di questi ed è l'unico sfruttato con buon rendimento per l'estrazione del mercurio.

Circa il 60% dei depositi di Hg di tutto il mondo è localizzato nel bacino del Mediterraneo (Ferrara et al. 1997); nell'area Mediterranea sono inoltre presenti diverse fonti naturali di Hg<sup>0</sup> quali alcuni vulcani attivi e numerose sorgenti di energia geotermica. I dati riguardanti le emissioni di Hg nell'atmosfera da parte dei vulcani Stromboli, Vulcano ed Etna indicano che questi rappresentano una sorgente importante di Hg per il Mediterraneo (Siegel and Siegel 1984). Le particolari caratteristiche geologiche sommate allo scarso ricambio idrico del Mar Mediterraneo, all'elevata intensità della radiazione solare e alle alte temperature ambientali che caratterizzano quest'area per molti mesi dell'anno, favoriscono i meccanismi biologici, fotochimici e fisici responsabili della formazione e dell'emissione dai suoli e dalle acque di Hg<sup>0</sup> (Ferrara et al. 1997). Studi condotti hanno stimato che l'emissione di Hg<sup>0</sup> dalla superficie acquatica del Mar Mediterraneo ammonta a circa 60 tonnellate all'anno, rappresentando la principale sorgente naturale di questo metallo per l'intera atmosfera (Ferrara et al. 2000).

Notevole importanza riveste inoltre il flusso di Hg derivante dagli impianti minerari di lavorazione del HgS: le miniere del complesso minerario spagnolo di Almadèn, le miniere di Idrija (Slovenia) e le miniere del complesso minerario del Monte Amiata in Italia che hanno prodotto la quasi totalità del Hg estratto in Europa nel corso dell'ultimo secolo (22). Almadèn, centro minerario della Spagna centrale è attualmente il principale fornitore mondiale di mercurio mentre in Italia, tra il 1905 ed il 1974 la miniera toscana di Abbadia (Le Lame, Monte Amiata) ha prodotto circa 50.000 tonnellate di Hg metallico; nel 1982 l'Eni ha sospeso definitivamente le attività di estrazione dalla miniera italiana. Anche Idrija, città della Slovenia a pochi chilometri dal confine italiano, possiede dei ricchi giacimenti di HgS che sono stati sfruttati a partire dal 1500 con una produzione media annua di oltre 500 tonnellate di Hg. La miniera di Idrija è stata chiusa definitivamente nel 1996.

Gli scarichi antropici e le acque dei fiumi provenienti da aree industrializzate costituiscono una fonte importante di contaminazione a livello delle zone costiere; anche le deposizioni secche e umide di  $\text{Hg}^{2+}$  rappresentano un apporto rilevante di Hg alle acque del Mediterraneo. Il  $\text{Hg}^{2+}$  apportato dalle deposizioni può essere ridotto alla forma  $\text{Hg}^0$  ed essere emesso dalla superficie acquatica oppure può legarsi al materiale particolato in soluzione e depositarsi con questo a livello dei sedimenti. In particolare i sedimenti in prossimità di aree costiere ad elevato carico antropico costituiscono una vera e propria sorgente di Hg a partire dalla quale questo tossico può essere mobilizzato verso i circostanti ecosistemi attraverso processi biologici e fisico-chimici (Covelli et al. 2001; Fitzgerald and Lamborg 2005). La concentrazione di Hg rilevata nei sedimenti acquatici varia da 0.01 a 500 mg/kg. Valori al di sotto di 0.1 mg/kg si ritrovano in aree naturali e prive di influenze antropiche, mentre valori di concentrazione superiori a 1 mg/kg sono generalmente presenti in aree contaminate (Camargo 2002). I sedimenti al largo del Mar Mediterraneo presentano una concentrazione media di 0.1 mg/kg (Baldi et al. 1983) che corrisponde al doppio della concentrazione mondiale di background (Nelson et al. 1975). Queste concentrazioni elevate sono connesse alla presenza dei depositi di HgS ed all'intensa attività geotermica e vulcanica sottomarina presente nel Mediterraneo (Bernhard and Buffoni 1982). Va evidenziato come la maggior parte degli studi più recenti relativi alle concentrazioni di Hg nei sedimenti mediterranei sono stati effettuati in aree situate nelle immediate vicinanze di attività estrattive minerarie (Barghigiani et al. 1996; Horvat et al. 1999; Covelli et al. 2001; Covelli et al. 2008; Emili et al. 2011; Covelli et al. 2011), mentre la distribuzione spaziale e temporale del Hg nei sedimenti in mare aperto rimane poco documentata e necessita di essere approfondita (Di Leonardo et al. 2006).

Diversi autori hanno riportato che la contaminazione da Hg delle specie ittiche del Mar Mediterraneo risulta nettamente superiore rispetto a quella rilevabile in pesci, crostacei e molluschi dell'Oceano Atlantico, appartenenti alle stesse specie o a specie con abitudini alimentari simili, con concentrazioni di Hg fino a 4 volte più elevate (Peterson et al. 1973; Renzoni et al. 1975; Baldi et al. 1978; Renzoni 1978; Stoepler et al. 1979; Bernhard and Renzoni 1977; Bernhard and Buffoni 1982; Bernhard et al. 1984; Bernhard 1988; Andre et al. 1991; Hornung et al. 1993; Renzoni et al. 1998; Perugini et al. 2009).

Le elevate concentrazioni di Hg nelle acque del Mediterraneo sembrano essere primariamente connesse alla presenza di estese formazioni geologiche ricche di Hg (Cossa et al. 2009). Gli scarichi antropici e le acque dei fiumi dei territori con componenti geologiche metallifere inoltre costituiscono una sorgente importante di contaminazione dei prodotti ittici nella vicinanza dalle

coste (Cinquina et al. 1995). Le caratteristiche geologiche sommate allo scarso ricambio idrico e alle condizioni oligotrofiche di questo mare sono particolarmente favorevoli alla produzione di MeHg che viene prontamente assimilato dagli organismi acquatici appartenenti sia ai livelli trofici più elevati quali il tonno (*Thunnus thynnus*), che ai livelli trofici inferiori quali le sardine (*Sardina pilchardus*) e le alici (*Engraulis encrasicolus*) (Baldi et al. 1978; Ghidini et al. 2000; Cossa et al. 2009). Nei pesci del Mediterraneo si rilevano concentrazioni di MeHg significativamente elevate anche nei pesci, nei crostacei e nei molluschi bentonici, appartenenti ai livelli trofici più bassi, che vivono in stretto contatto con gli strati superficiali dei sedimenti dove avvengono i processi di metilazione (Hornung 1986); gli organismi bentonici costituiscono l'alimentazione dei pesci appartenenti ai livelli trofici superiori e questo sembrerebbe essere il motivo delle maggiori concentrazioni di MeHg riscontrate nei pesci del Mediterraneo rispetto a quelli dell'Oceano Atlantico (Bernhard and Renzoni 1977; Bernhard and Buffoni 1982).

#### **1.4. Il mercurio nel Golfo di Trieste**

Numerosi studi hanno evidenziato concentrazioni di Hg piuttosto elevate nei sedimenti del Mar Adriatico ed il Golfo di Trieste risulta essere una delle aree maggiormente soggette ad inquinamento da Hg dell'intero Mediterraneo (Ferrara and Maserti 1992; Covelli et al. 1999; Covelli et al. 2001; Ogrinc et al. 2007; Covelli et al. 2011; Emili et al. 2011).

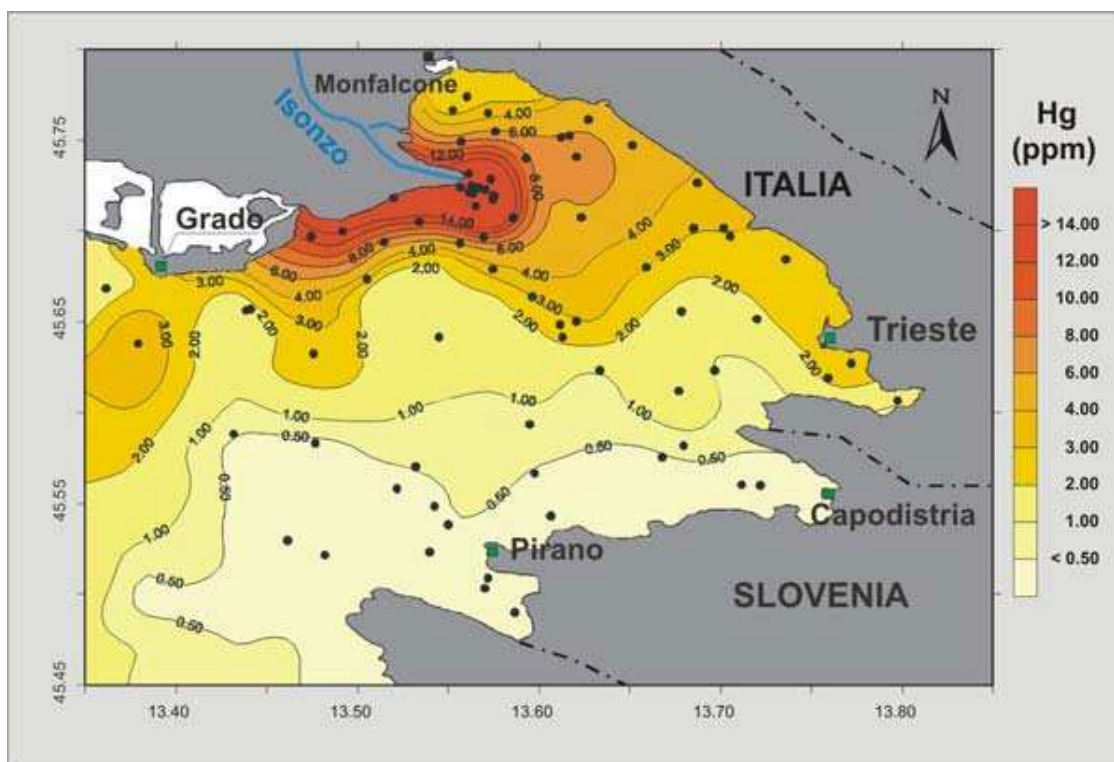
Le cause di questa contaminazione sono da attribuirsi alle numerose attività industriali presenti nel Golfo e soprattutto alla presenza dei giacimenti minerari di HgS situati nell'entroterra, nella vicina città slovena di Idrija, da cui è stato estratto Hg a partire dal 1500.

Per anni le acque del torrente Idrijca, che attraversa la città di Idrija, hanno drenato i suoli mercuriferi del distretto minerario confluendo poi nel fiume Isonzo, il quale ha trasportato i sedimenti contaminati fino alla propria foce nel Golfo di Trieste. Il fiume Isonzo costituisce il principale apporto di acqua dolce al golfo di Trieste ed il sistema Isonzo-Idrijca rappresenta l'anello di congiunzione tra la fonte di contaminazione e le sedi di accumulo parziale, ovvero l'area centrale del Golfo di Trieste, e finale, ovvero la Laguna di Grado e Marano (Faganeli et al. 2003; Kotnik et al. 2005). L'attività estrattiva della seconda più importante miniera di Hg al mondo si è protratta per circa 500 anni riducendosi gradualmente fino alla definitiva chiusura nel 1996. Complessivamente sono state scavate più di 5 milioni di tonnellate di roccia mineralizzata a Hg, essenzialmente HgS ma anche Hg nativo (Mlakar 1974). Sebbene la provenienza del Hg

nell'area di Idrija sia legata al giacimento, la maggior parte del metallo rinvenibile nei suoli, nei sedimenti superficiali e lungo le sponde del fiume Isonzo e del suo affluente Idrijca è Hg rimobilizzato dall'attività mineraria, rilasciato nell'atmosfera dai condotti di ventilazione della miniera, dai camini dell'impianto di "arrostimento" della roccia mineralizzata e successivamente ricaduto al suolo con le precipitazioni. Gli stessi residui di lavorazione del minerale sono stati abbandonati in prossimità degli impianti lungo le sponde del corso d'acqua. Si stima che solo il 73% delle complessive 144.000 tonnellate di metallo estratto sia stato recuperato (Gosar et al. 1997), mentre la restante parte sia stata dissipata nell'ambiente circostante.

In Figura 2 è riportata la distribuzione delle concentrazioni di Hg nei sedimenti del Golfo di Trieste. Le concentrazioni sono espresse in ppm. Concentrazioni fino a 25-30  $\mu\text{g}/\text{l}$ , due ordini di grandezza superiori al background naturale per l'area mediterranea (0.1 $\mu\text{g}/\text{l}$ ), sono state riscontrate alla foce dell'Isonzo evidenziando un decremento esponenziale in funzione della distanza dalla bocca fluviale verso il mare aperto (Covelli et al. 2001).

Gli apporti isontini, dispersi prevalentemente verso occidente a causa del sistema di circolazione antiorario delle correnti che caratterizzano l'Adriatico settentrionale, hanno contribuito ad incrementare le concentrazioni di Hg non solo nei sedimenti ma anche nella componente biotica delle adiacenti lagune di Marano e Grado (Brambati 1997). In aggiunta, lo sversamento di Hg nel fiume Aussa immissario della Laguna di Marano, determinato dall'impianto cloro-soda del complesso industriale di Torviscosa (UD), è iniziato nel 1949 e si è protratto fino al 1984 quando sono stati adottati metodi di recupero e depurazione adeguati (Daris et al. 1993). Per tali ragioni, l'ambiente lagunare risulta aver subito una duplice contaminazione con modalità e tempi differenti in relazione alle due sorgenti menzionate. Le ricerche condotte nel Golfo di Trieste (Covelli 1998, Covelli et al. 1999; Horvat et al. 1999; Covelli et al. 2001, Faganeli et al. 2003) sono state rivolte alla speciazione del Hg, ovvero alle diverse forme chimiche del metallo rilevabili nell'ambiente acquatico, alla loro interazione ed alla loro biodisponibilità. In particolare, è stato evidenziato che nei sedimenti marini il Hg è accumulato fino a circa un metro di profondità in prossimità della foce dell'Isonzo.



**Figura 2.** Distribuzione di Hg nei sedimenti del Golfo di Trieste (Covelli et al. 2001).

Le variazioni delle concentrazioni con la profondità correlano molto bene con i dati relativi all'attività estrattiva ad Idria. Il Hg è presente in forma detritica, prevalentemente HgS, nei sedimenti siltoso-sabbiosi in prossimità della foce fluviale isontina e nei lidi costieri ad essa adiacenti (Biester et al. 2000). Nell'area centrale del golfo il Hg è invece associato alle particelle più fini, probabilmente assorbito sulla superficie dei minerali argillosi e/o parzialmente complessato dai colloidali e dalla sostanza organica. Nella colonna d'acqua i valori del coefficiente di distribuzione indicano che il Hg è prevalentemente associato al particolato in sospensione mentre il Hg disciolto è invece reattivo e quindi potenzialmente riciclabile e coinvolgibile nei processi biogeochimici prima fra tutti la metilazione batterica.

Le concentrazioni più elevate di MeHg nella colonna d'acqua e nei sedimenti sono state riscontrate nelle aree più distanti dalla foce fluviale isontina. Da esperimenti sui flussi benthici all'interfaccia acqua-sedimento eseguiti sul fondale del golfo, è stato stimato che almeno il 50% del MeHg rilasciato nella colonna d'acqua è prodotto in situ dalla metilazione batterica. La mobilità biogeochimica del Hg nei sedimenti del Golfo di Trieste è indubbiamente limitata ai primi centimetri ovvero i più superficiali.

Il rischio di rimobilizzazione delle specie mercurifere appare più elevato nei periodi autunnale ed invernale in relazione al passaggio da una condizione di rapida solfato-riduzione estiva ad una

condizione caratterizzata da un'attività batterica ridotta dovuta all'abbassarsi della temperatura; questa condizione risulta adatta alla trasformazione del Hg, al suo accumulo nelle acque interstiziali ed al suo successivo rilascio nell'interfaccia acqua-sedimento. I sedimenti del settore centrale del Golfo di Trieste possono pertanto essere considerati un'importante sorgente secondaria di forme chimiche di Hg mobili nell'ambiente marino (Covelli et al. 1999).

Attualmente, nonostante le attività di estrazione siano state sospese nel 1996, l'apporto di Hg nel golfo, nell'arco dell'anno, avviene proprio grazie all'ingente contributo di metallo associato al particolato in sospensione durante gli eventi di piena; al contrario nei periodi di regime normale o di magra gli apporti risultano essere modesti (Covelli et al. 2004). I sedimenti della Laguna di Marano e Grado evidenziano un decremento progressivo di Hg da 10 a 1 ppm spostandosi da est verso ovest; la presenza di Hg è stata inoltre accertata sino ad una profondità di circa 30-40 cm. Questo gradiente emerge anche dalle analisi effettuate sugli organismi e sulle piante acquatiche lagunari dell'intera catena trofica (Brambati 1997). La variabilità delle concentrazioni di Hg riscontrata nelle specie acquatiche analizzate è, tuttavia, da porre in relazione alle loro caratteristiche: i mitili (*Mytilus*) e le vongole (*Tapes*), organismi filtratori, sono caratterizzati da basse concentrazioni (200 e 350 ppb in media, rispettivamente). Tenori più elevati (200-1900 ppb) sono stati determinati nel gamberetto (*Palaemon*), mentre valori molto elevati (media 0.5-0.7 ppm; max 2-3 ppm) sono stati osservati nel guatto (*Gobius niger*) e nel latterino (*Atherina boyeri*). Valori anomali (fino a circa 5 ppm) simili a questi sono stati determinati nelle specie ittiche allevate nelle valli da pesca interne alla laguna (ad esempio nell'orata (*Sparus aurata*) e nella spigola (*Dicentrarchus labrax*) rispetto ai medesimi esemplari pescati in mare aperto. I valori più alti riscontrati nella spigola e nell'orata sono legati alle loro esigenze trofiche che ne fanno, accanto all'anguilla, i consumatori finali di tutta la catena trofica lagunare, a meno che non intervenga la predazione da parte degli uccelli marini o da parte dell'uomo (Brambati 1997).

In uno studio effettuato nel 2000 sono stati messi a confronto i livelli di Hg misurati nei pesci provenienti dall'Alto Adriatico con l'obiettivo di indagare la distribuzione di questo metallo tossico in funzione delle categorie tassonomiche, del livello trofico e delle abitudini di vita dei pesci. I risultati sono stati suddivisi in gruppi sulla base delle abitudini alimentari e l'analisi statistica ha messo in evidenza concentrazioni significativamente più elevate per i pesci bentonici piuttosto che per i predatori finali diversamente da quanto si potesse prevedere sulla base dell'incremento di accumulo dovuto alla biomagnificazione. In questo caso i pesci bentonici, con comportamento più stanziale rispetto ai predatori finali, riflettono l'elevata disponibilità locale di Hg nei sedimenti (Ghidini et al. 2000). Uno studio del 2008 ha confermato

la presenza di elevata contaminazione da Hg negli organismi acquatici dell'Adriatico; anche in questo caso le concentrazioni maggiori sono state rilevate nei pesci (0.07–1.56 µg/g), seguiti dai molluschi (0.10–0.55 µg/g) e dai crostacei (0.27–0.33 µg/g) (Storelli 2008).

Sebbene attualmente l'attività estrattiva della miniera di Idria si sia arrestata e nonostante una tendenza al graduale decremento sia indicata in particolare dai profili all'interno della successione sedimentaria del Golfo di Trieste, a causa del protrarsi e dell'estensione della contaminazione nell'intero bacino fluviale, non è ipotizzabile, almeno a breve termine, una drastica riduzione degli apporti di Hg negli ambienti costieri dell'area.

L'ipotesi di un processo naturale di recupero di aree marine contaminate potrebbe essere rappresentato dal seppellimento degli strati di sedimento contaminati ad opera di nuovi contributi terrigeni incontaminati. Nel caso del Golfo di Trieste e, conseguentemente della Laguna di Marano e Grado, tale ipotesi sarebbe da scartare e la notevole quantità di Hg attualmente accumulato nei sedimenti insieme a probabili nuovi apporti manterranno le aree del golfo e lagunare esposte al potenziale impatto del metallo sull'ecosistema marino.

## 2. Fonti di esposizione e meccanismi di tossicità del mercurio

Il Hg è un inquinante estremamente pericoloso per la salute umana e la sua tossicità si differenzia in funzione della forma chimica di assunzione pur rimanendo il sistema nervoso centrale ed il rene i due principali organi bersaglio. Tra le diverse forme chimiche quella organica è senza dubbio la più tossica e pericolosa.

### 2.1. Mercurio elementare

Escludendo le esposizioni di tipo professionale, la principale fonte di esposizione umana al  $\text{Hg}^0$  è rappresentata dai vapori rilasciati dall'amalgama delle otturazioni dentali; l'amalgama è costituita per il 50% da Hg e per il 50% da argento (Ag), rame (Cu), zinco (Zn) e stagno (Sn) ed è stata utilizzata per le otturazioni dentali a partire dal 1800. Diversi studi effettuati sia sull'uomo che sugli animali hanno evidenziato come le amalgame dentali contribuiscano in maniera significativa all'accumulo corporeo di Hg (IPCS 1991; US DHHS 1993; Weiner and Nylander 1995). Dalle otturazioni dentali vengono rilasciati vapori di  $\text{Hg}^0$  e ioni metallici; i vapori di  $\text{Hg}^0$  vengono in parte esalati, in parte inalati nei polmoni ed assorbiti dal torrente circolatorio ed in parte trattenuti a livello salivare ed inghiottiti. Solo una minima parte del  $\text{Hg}^0$  inghiottito viene assorbita dal sistema gastrointestinale (0,04%). Il bruxismo e la continua masticazione di chewing-gum possono aumentare il rilascio di  $\text{Hg}^0$  dalle otturazioni e di conseguenza l'esposizione.

Il  $\text{Hg}^0$  grazie alla sua elevata tensione di vapore, viene assorbito facilmente per inalazione nel tratto respiratorio; passato al torrente circolatorio grazie alla sua elevata liposolubilità ed alla mancanza di carica elettrica è in grado di attraversare facilmente le membrane cellulari inclusa quella emato-encefalica ed accumularsi nel sistema nervoso centrale dove espleta la sua tossicità (Clarkson 1994).

All'interno dei globuli rossi il  $\text{Hg}^0$  viene ossidato a  $\text{Hg}^{2+}$  dall'enzima catalasi ed in questa forma si accumula nei reni danneggiandoli (Halbach and Clarkson 1978; Honda et al. 2006).

Una parte del  $\text{Hg}^0$  viene ossidato alla forma inorganica  $\text{Hg}^{2+}$  anche all'interno del cervello. Il sistema nervoso centrale è l'organo critico per l'esposizione ai vapori di  $\text{Hg}^0$  e studi effettuati

post-mortem hanno rilevato la presenza di elevate concentrazioni di Hg all'interno del cervello di alcuni ex-minatori di Hg anche diversi anni dopo l'esposizione. Le maggiori concentrazioni di Hg sono state rilevate all'interno dell'ippocampo, della corteccia cerebellare, nel nucleo dentato e nelle ghiandole pituitaria e pineale (Byrne et al. 1995; Falnoga et al. 2000).

Gli effetti neurotossici causati dall'esposizione al Hg<sup>0</sup> sono stati riscontrati prevalentemente in persone esposte professionalmente per lunghi periodi di tempo ai vapori di Hg<sup>0</sup> e comprendono sintomi quali: irritabilità, depressione, introversione, ansia, apprensione e scarsa fiducia in se stessi (WHO 1976, 1991, 2003; Hribernik 1950; Kobal et al. 2006). Grazie all'elevata liposolubilità il Hg<sup>0</sup> è in grado di attraversare la barriera placentare (Clarkson 1989), mentre viene escreto solamente in minima quantità nel latte materno (Pitkin et al. 1976; Grandjean et al. 1995 a, b).

### **2.1.1. Metabolismo e cinetica del mercurio elementare**

Studi effettuati sull'uomo hanno mostrato che il 70-80% del Hg<sup>0</sup> inalato viene assorbito dai polmoni e passa nel torrente circolatorio per essere distribuito in tutto il corpo (Hursh et al. 1976; Sandborgh-Englund et al. 1998); il Hg<sup>0</sup> viene assorbito molto poco attraverso il tratto gastrointestinale (0,04%) (Geijersstam et al. 2001) probabilmente a causa della sua rapida trasformazione a livello gastrico in Hg<sup>2+</sup> e successivo legame con i gruppi sulfidrilici (SH) delle proteine (Clarkson et al. 1961; Berlin and Gibson 1963). Anche l'assorbimento cutaneo è trascurabile (assorbimento pari al 2% dell'assorbimento polmonare) (Hursh et al. 1989). Penetrato nell'organismo il Hg<sup>0</sup> viene rapidamente ossidato a Hg<sup>2+</sup> ad opera dell'enzima catalasi e si accumula in questa forma in diversi tessuti primi tra tutti i reni. Il Hg<sup>0</sup> inalato, prima di essere ossidato, è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e la barriera placentare andando ad accumularsi nel cervello (Berlin et al. 1969) e nel feto (Khayat and Dencker 1982). Diversi studi hanno rilevato la presenza di depositi di Hg nel cervello fetale in seguito ad esposizione ad Hg<sup>0</sup> (Vimy et al. 1990) anche se la maggior parte del Hg accumulato nei feti si ritrova a livello del fegato (Khayat and Dencker 1982; Vimi et al. 1990; Takahashi et al. 2001). In seguito ad esposizione il tempo di dimezzamento della concentrazione del Hg<sup>0</sup> nel sangue va dai 3 ai 18 giorni; il Hg<sup>0</sup> viene escreto prevalentemente attraverso l'aria esalata.

## 2.2. Mercurio inorganico

Gli effetti tossici dovuti all'esposizione sia al  $\text{Hg}^0$  che al  $\text{Hg}^{2+}$  sono stati associati principalmente ad esposizioni di tipo lavorativo mentre nella popolazione generale la principale fonte di esposizione al mercurio inorganico (IHg) è costituita dai vapori di  $\text{Hg}^0$  rilasciati dalle otturazioni dentali (WHO 1991). Anche l'utilizzo di creme e saponi sbiancanti, contenenti sali di Hg, costituisce una fonte di esposizione al IHg così come l'utilizzo del Hg liquido nei rituali religiosi tipici di alcune culture.

In minima parte l'esposizione al IHg può avvenire anche attraverso il consumo di cibo contaminato anche se gli ioni di Hg inorganici  $\text{Hg}^+$  ed  $\text{Hg}^{2+}$  vengono assorbiti solo parzialmente (<10%) dal tratto gastrointestinale. Il  $\text{Hg}^{2+}$  una volta penetrato nell'organismo manifesta la sua tossicità essenzialmente in sede renale (WHO 1991; Clarkson 1997). Il  $\text{Hg}^{2+}$  si lega ai gruppi SH delle proteine e può interferire con le funzioni di enzimi e proteine di struttura delle cellule; l'esposizione prolungata al  $\text{Hg}^{2+}$  sembra inoltre essere causa di danni ai microtubuli del citoscheletro cellulare (Pendergrass et al. 1997) oltre che di stress ossidativo (Olivieri et al. 2000).

Il  $\text{Hg}^{2+}$  a causa della sua scarsa solubilità lipidica non è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e la placenta se non in minima percentuale (Clarkson 1989); al contrario il  $\text{Hg}^{2+}$  si accumula nel fegato e nei reni molto rapidamente (Nielsen and Adersen 1990) ed è in grado di passare nel latte materno (Pitkin et al. 1976; Grandjean et al. 1995 a, b).

### 2.2.1. Metabolismo e cinetica del mercurio inorganico

Meno del 10% del IHg assunto con la dieta è assorbito dal tratto gastrointestinale, anche se l'assorbimento nei bambini sembra essere maggiore. A livello del sangue il  $\text{Hg}^{2+}$  è trasportato per più del 50% a livello plasmatico ed il tempo di dimezzamento del  $\text{Hg}^{2+}$  nel sangue corrisponde a circa 28 giorni.

$\text{Hg}^{2+}$  non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica (Berlin et al. 1969) o la placenta (Khayat and Dencker 1982; Urbach et al. 1992). L'escrezione del  $\text{Hg}^{2+}$  avviene prevalentemente attraverso le feci e le urine; in caso di esposizione elevata il  $\text{Hg}^{2+}$  viene

eliminato soprattutto attraverso le urine. Il  $\text{Hg}^{2+}$  viene escreto nel latte materno legato alle albumine ed alle caseine sieriche (Sundberg et al. 1999).

### 2.3. Metilmercurio

La principale fonte di esposizione umana al MeHg è costituita dal consumo di pesce, frutti di mare e mammiferi marini (Kjellstrom 1986; Davidson 1995; Sorensen and Murata 1999; Bellanger 2000; Sanzo 2001; Hightower 2003; Mahaffey et al. 2004). Il MeHg è un composto fortemente tossico e biodisponibile e una volta assorbito dai produttori primari tende a bioaccumularsi nel passaggio attraverso la catena alimentare acquatica concentrandosi nei tessuti degli organismi posti al vertice della catena stessa, la maggior parte dei quali vengono consumati dall'uomo. I grandi pesci predatori che occupano i vertici della catena alimentare acquatica risultano essere la fonte più importante di introduzione di MeHg nell'organismo umano (WHO 1990). La concentrazione di Hg nel pesce di mare può raggiungere i 5  $\mu\text{g/g}$ , con una media di 0.2-0.5  $\mu\text{g/g}$ . In acque contaminate il pesce può accumulare fino a 40  $\mu\text{g/g}$  di Hg mentre in acque non contaminate le concentrazioni sono inferiori a 0.20  $\mu\text{g/g}$  nel pesce ed inferiori a 0.10  $\mu\text{g/g}$  nei molluschi e nei crostacei. Nei pesci il MeHg, solubile in acqua, penetra sia attraverso l'alimentazione sia attraverso le branchie accumulandosi nei muscoli assiali (Ferrara and Funari 2004). La penetrazione del MeHg all'interno dei tessuti è mediata dalla formazione di complessi tra il MeHg e la L-cisteina (L-Cys) che vengono trasportati all'interno delle cellule da dei carriers aminoacidici (Pinheiro et al. 2009). I livelli di Hg nei pesci generalmente aumentano con l'età, le dimensioni ed il peso (Clarkson et al. 2003); l'accumulo varia significativamente tra le specie e si assume sia correlato alla dieta, in quanto è maggiore nei pesci aventi livelli trofici più elevati quali ad esempio il tonno (*Thunnus thynnus*), il pesce spada (*Xiphias gladius*), il pesce san Pietro (*Zeus faber*), il merluzzo (*Gadus morhua*) e la verdesca (*Prionace glauca*) tra i pesci marini ed il luccio (*Esox lucius*), la trota (*Salmo trutta*) ed il pesce persico (*Perca fluviatilis*) tra i pesci d'acqua dolce (EPA 1997, 2003; UNEP 2002; Miklavcic et al. 2011a). Il fattore di bioconcentrazione ovvero il rapporto tra la concentrazione di MeHg nei tessuti dei pesci e la concentrazione di MeHg nell'acqua è generalmente compreso tra 10.000 e 100.000.

Il MeHg costituisce fino all'80-100% del mercurio totale (THg) presente nei muscoli assiali dei pesci appartenenti ai livelli trofici più elevati (Storelli et al. 2001; Honda et al. 2006) e

nessun metodo di cottura è in grado di rimuovere il MeHg dal pesce (Morgan et al. 1997; Chicourel et al. 2001).

Nei muscoli assiali dei pesci che occupano livelli inferiori della catena alimentare il MeHg costituisce fino al 54% del THg presente (Storelli et al. 2005; Agah et al. 2007; Magalhaes et al. 2007).

All'interno dello stesso livello trofico, pesci diversi possono differire notevolmente nel contenuto di Hg e la concentrazione di Hg in un pesce non può essere stimata in modo affidabile sulla base delle concentrazioni determinate nelle altre matrici ambientali quali ad esempio l'acqua ed i sedimenti. L'accumulo di MeHg nei muscoli assiali dei pesci potrebbe costituire un meccanismo di difesa, inteso come la compartimentazione di una sostanza tossica all'interno di un sistema capace di risentire in misura inferiore della tossicità, al fine di ridurre il contatto con organi o sistemi più sensibili. L'elevata lipofilità del MeHg oltre a consentirne l'attraversamento delle membrane cellulari anche in corrispondenza di barriere come quella emato-cerebrale o placentare, è la caratteristica che ne riduce la possibilità di escrezione. I tempi di dimezzamento del MeHg, se gli organismi acquatici esposti vengono spostati in aree non contaminate, vanno da 6 mesi per i mitili (*Mytilus*) a 2 anni per il luccio (*Esox lucius*), (Majori et al. 1967). Le popolazioni la cui dieta prevede tradizionalmente un elevato consumo di pesce fresco risultano potenzialmente esposte alla tossicità del MeHg. Facilmente assimilabile attraverso il tratto gastrointestinale il MeHg provoca danni ingenti al fegato, al rene e soprattutto al cervello; sia il cervello dell'adulto che quello del feto risultano estremamente sensibili alla tossicità del MeHg anche se il sistema nervoso fetale in via di sviluppo risulta essere particolarmente reattivo all'azione di questo tossico (NRC 2000; Myers et al. 2000). I neonati ed i bambini inoltre possono essere esposti al MeHg anche attraverso il latte materno.

La neurotossicità del MeHg è nota soprattutto in seguito ad alcune vicende di intossicazione collettiva del secolo scorso, prima fra tutte quella che interessò negli anni '50-'60 la Baia di Minamata in Giappone, dove l'assunzione di pesce contaminato dal Hg rilasciato nelle acque della baia da un complesso industriale per la produzione dell'acetaldeide interessò con gravi o gravissime conseguenze oltre 12.000 persone (Tsubaki and Irukayama 1977). Le persone intossicate manifestarono disordini neurologici caratterizzati da atassia, parestesia, indebolimento del campo visivo, perdita dell'udito, difficoltà ad articolare le parole, disordine mentale e nei casi più gravi paresi e morte (Clarkson and Strain 2004). I bambini nati da donne che avevano consumato pesce contaminato presentarono alla nascita marcate anomalie neurologiche, ritardo mentale e paralisi cerebrale (Gochfeld 2003) anche in assenza di effetti

tossici rilevabili nelle madri. I livelli di Hg misurati nei capelli dei bambini erano compresi tra 10 e 100 ppm, mentre non erano disponibili misurazioni su quelli materni (Gochfeld 2003).

Un altro episodio di intossicazione dovuta al MeHg avvenne in Iraq tra il 1971 ed il 1972. L'esposizione in questo caso avvenne attraverso il consumo di pane preparato utilizzando sementi trattate con il MeHg come fungicida. Le indicazioni riportate sui sacchi di sementi, che ne indicavano la contaminazione, non vennero comprese dalla popolazione locale poiché scritte in spagnolo e le sementi vennero macinate per produrre la farina con cui preparare il pane (Bakir et al. 1973; Myers et al. 2000). L'intossicazione interessò più di 6000 persone e causò 400 vittime. Come nell'intossicazione di Minamata, anche in questo caso i principali sintomi riscontrati furono di tipo neurologico: parestesia, atassia, amaurosi, disartria, ipoacusia e sordità. Si osservarono anche tremori, ipostenia, riflessi anormali ed ipotonia muscolare. Anche in questo caso i bambini esposti in utero al MeHg (in particolare durante il terzo trimestre di gestazione) mostrarono la più alta sensibilità manifestando grave ritardo mentale, ipotonia muscolare e ariflessia. In entrambi gli episodi di intossicazione si riscontrò un periodo di latenza (16-38 giorni in Iraq e diversi anni in Giappone) tra l'esposizione al MeHg e la manifestazione dei sintomi neurotossici (Amin-Zaki et al. 1974; Harada 1995).

### **2.3.1. Metabolismo e cinetica del metilmercurio**

Nell'uomo il 95% del MeHg ingerito attraverso il cibo è assorbito dal tratto gastrointestinale (Aberg et al. 1969; Miettinen 1973), da qui passa al sistema circolatorio e viene distribuito all'intero organismo in 1-2 giorni (Clarkson 1997). A livello del sistema circolatorio il MeHg viene trasportato per il 90% all'interno dei globuli rossi grazie ai legami con i gruppi SH dell'emoglobina e per il 10% nel plasma. Il MeHg è in grado di attraversare facilmente la barriera emato-encefalica (Vahter et al. 1995) e la barriera placentare attraverso dei carriers aminoacidici (Kerper et al. 1992; Kaijwara et al. 1996).

Nel corpo quasi tutto il MeHg si trova legato all'albumina, al glutatione (GSH) o alla L-Cys e la formazione di questi complessi sembra essere alla base del maggiore o minore assorbimento del MeHg all'interno dei diversi organi. Diversi studi in vitro e su animali hanno dimostrato che il trasporto del MeHg all'interno del fegato e soprattutto del cervello risulta più efficiente in seguito alla formazione dei complessi MeHg-L-Cys (Aschner et al. 1989; Kerper et al. 1992; Roos et al. 2010). La formazione di complessi con la D-cisteina (D-Cys) al contrario ostacola la

penetrazione del MeHg all'interno delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali mentre la formazione di complessi con la L-metionina (L-Met) la abolisce totalmente (Aschner 2002).

Come visto precedentemente, nei tessuti dei pesci il MeHg si ritrova prevalentemente proprio sottoforma di complessi MeHg-L-Cys, aumentando in questo modo il rischio di contaminazione attraverso il consumo di pesce (Pinheiro et al. 2009).

Una parte del MeHg penetrato nel cervello viene rapidamente demetilato alla forma inorganica  $Hg^{2+}$ ; i meccanismi con i quali il MeHg esercita la propria neurotossicità non sono stati ancora del tutto compresi (Roos et al. 2010), ma sembrano essere correlati alla capacità del catione  $Hg^{2+}$  di legarsi ai gruppi SH di enzimi, canali ionici e recettori di membrana causando l'inibizione dei più importanti sistemi antiossidanti cellulari quali l'N-acetil-L-cisteina (NAC), l'acido alfa-lipoico (ALA) e il GSH oltre che di determinare la produzione di radicali liberi (Mozzafarian and Rimm 2008).

Una volta all'interno del sistema nervoso centrale il MeHg si accumula all'interno degli astrociti con tempi di dimezzamento estremamente lunghi e causando intense disfunzioni neurologiche (Davis et al. 1994; Aschner 1996; Clarckson 1997; Pedersen et al. 1999).

L'eccitotossicità è un fenomeno di tossicità neuronale conseguente all'esposizione ad elevate concentrazioni di glutammato (Glu), il principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale. I recettori ionotropici postsinaptici del Glu sono regolati dal N-metil-D-aspartato (NMDA) e una volta attivati dal proprio ligando o da altri fattori lasciano fluire ioni  $Na^+$  e  $Ca^{2+}$  all'interno del neurone e ioni  $K^+$  al suo esterno.

L'eccitotossicità è una delle cause principali delle neurotossicità del MeHg ed esiste una correlazione molto forte tra le aree del cervello caratterizzate da elevata incidenza di danni neuronali indotti dal Hg e le aree con la maggior densità di recettori NMDA. Ad esempio le cellule cerebellari molecolari e del Purkinje, che vengono risparmiate in condizioni di avvelenamento cronico da Hg, hanno una scarsissima popolazione di recettori NMDA. Al contrario le cellule granulari cerebellari, che sono un bersaglio primario nella neurodegenerazione indotta dal Hg, esprimono un'elevata densità di recettori NMDA. Un'elevata densità di recettori NMDA è presente anche nella corteccia visiva primaria un sito particolarmente coinvolto nel danno indotto dal MeHg.

Il MeHg inibisce la penetrazione del Glu negli astrociti determinando un'eccessiva concentrazione di aminoacidi eccitatori nel liquido extracellulare con conseguente iperstimolazione del neurone post-sinaptico e distruzione del dendrite o dell'intero neurone per mezzo di processi di necrosi e apoptosi.

In presenza di MeHg la capacità degli astrociti di assorbire e rimuovere il Glu in eccesso si deteriora, determinando un aumento di eccitotossicità mediata dai recettori NMDA. In particolare il sistema di neutralizzazione del Glu da parte degli astrociti è altamente sensibile al  $Hg^{2+}$ ; il catione  $Hg^{2+}$  interagisce con alcuni gruppi SH critici situati a livello di specifici siti della membrana cellulare dell'astrocita inattivando i sistemi cellulari alla base dell'assorbimento dell'inattivazione e dello smaltimento del Glu in eccesso (Aschner et al. 2000; Allen et al. 2002).

Il MeHg inoltre è in grado di alterare la corretta omeostasi dei mitocondri attraverso l'interazione con i gruppi SH di specifiche proteine coinvolte nella produzione/detossificazione dei radicali liberi (Aschner et al. 2007; Yin et al. 2007; Yin et al. 2008).

Il legame tra MeHg ed residui proteici interferisce con l'attività degli enzimi, rallentando l'ingresso del glucosio nella cellula e l'attività dell'ATP di membrana, inibendo importanti trasformazioni a livello del metabolismo di base e riducendo gli scambi sodio-potassio essenziali per il corretto funzionamento del sistema nervoso. I danni rilevabili sono atrofia del cervello e del cervelletto con riduzione del numero dei neuroni e aumento del tessuto interstiziale a livello del sistema nervoso centrale ed alterazioni della guaina mielinica dei nervi a livello del sistema nervoso periferico.

L'esposizione a dosi elevate di MeHg determina disturbi sensoriali, costrizione del campo visivo, atassia, diminuzione cognitiva e morte (Davidson et al. 2004); le aree del cervello maggiormente colpite risultano la corteccia visiva primaria e il cerebellum. L'esposizione a basse dosi è connessa a ipoestesia, atassia, disartria, disturbi sensitivi ed indebolimento della capacità uditiva e visiva; diversi studi inoltre hanno dimostrato che l'esposizione a basse concentrazioni di MeHg è in grado di aumentare i ripiegamenti anomali della proteina  $\alpha$ -sinucleina, componente principale delle placche fibrillari che caratterizzano il morbo di Parkinson ed aumentare la secrezione della proteina  $\beta$ -amiloide 1-40 e 1-42 coinvolta nell'eziopatogenesi del Morbo di Alzheimer (Uvensky et al. 2001; Olivieri et al. 2002).

L'inibizione dei sistemi antiossidanti cellulari associata alla produzione di radicali liberi sembra essere connessa anche ad un aumento del rischio di malattie cardio e cerebro-vascolari (Wiggers et al. 2008).

Il tempo di dimezzamento del MeHg nel sangue è pari a 70 giorni negli individui adulti, a 90 giorni nei bambini e a 46 giorni nelle donne che allattano (Swartout and Rice 2000).

Il MeHg viene escreto per il 90% attraverso le feci ed in minima parte attraverso le urine ed il sudore (Hightower and Moore 2003). L'escrezione del MeHg inoltre segue il ciclo entero-

epatico, previa demetilazione a livello intestinale, rallentando in questo modo il processo di eliminazione.

Diversi studi sia negli animali che nell'uomo hanno confermato l'escrezione del MeHg nel latte materno (Sundberg et al. 1991; Grandjean et al. 1994; Nordenhall et al. 1998; Ask Björnberg et al. 2005); sia il MeHg che il  $\text{Hg}^{2+}$  vengono trasportati dal plasma al latte legati alle albumine sieriche e il  $\text{Hg}^{2+}$  anche legato alle caseine (Sundberg et al. 1999). L'escrezione del Hg nel latte è influenzata dalla concentrazione nel plasma materno; circa il 65% di  $\text{Hg}^{2+}$  e solo il 10% di MeHg contenuto nel sangue intero è presente nel plasma (Kershaw et al. 1980) e quindi disponibile all'escrezione nel latte.

## **2.4. Tossicità fetale del metilmercurio**

I casi di avvelenamento accorsi in Giappone ed in Iraq fornirono molte informazioni riguardo alla neurotossicità del MeHg evidenziando in particolar modo la sensibilità del cervello fetale in via di sviluppo all'azione di questo tossico.

Il MeHg assunto dalla donna in gravidanza attraverso la dieta può causare danni persistenti al sistema nervoso centrale del feto anche in assenza di effetti tossici nelle madri, con danni rilevabili sia durante lo sviluppo embrionale che in età scolare.

La vulnerabilità del cervello in via di sviluppo è connessa alla capacità del MeHg di attraversare la placenta grazie a dei carriers aminoacidici; inoltre la barriera emato-encefalica non è completamente sviluppata fino alla fine del primo anno di vita e quindi il MeHg può penetrare ed accumularsi con estrema facilità nel cervello del feto.

Il MeHg è in grado di determinare nel cervello fetale in via di sviluppo un'errata differenziazione, divisione e migrazione neuronale attraverso il legame con i gruppi SH delle tubuline, le principali proteine che costituiscono i microtubuli neuronali (Choi et al. 1978; Clarkson 1992; Myers et al. 2003; Farhana et al. 2005; Zahir et al. 2005). Il MeHg sembra anche essere coinvolto nella formazione di radicali liberi che causano stress ossidativo (Castoldi et al. 2000); lo stress ossidativo a sua volta sembrerebbe essere coinvolto nel danneggiamento di DNA, lipidi e proteine con conseguente alterazione delle funzioni cellulari. Gli effetti neurologici del MeHg sono persistenti (Kurland et al. 1959; Igata 1993; Davis et al. 1994; Grandjean et al. 1997). La sensibilità del cervello fetale in via di sviluppo è da 2 a 5 volte maggiore rispetto a quella dell'adulto (Snyder, 1971); inoltre la concentrazione di MeHg nel

sangue fetale è circa il doppio rispetto a quella rilevabile nel sangue materno a causa del trasporto attivo del MeHg attraverso la placenta (Honda et al. 2006). I feti quindi costituiscono una fascia della popolazione particolarmente reattiva alla tossicità del MeHg e sono sensibili a concentrazioni nettamente inferiori rispetto a quelle tollerate dagli adulti. Nell'utero, durante la gestazione, il sistema respiratorio, gastrointestinale, endocrino, immunitario e riproduttivo e la funzionalità renale sono immaturi ed evolvono verso la piena maturazione a differenti velocità. Questi fattori sono in grado di condizionare sia l'entità dell'esposizione che la cinetica degli xenobiotici pervenuti nell'organismo fetale e possono comportare effetti sulla salute più gravi rispetto a quelli riscontrabili negli adulti.

Lo studio effettuato in seguito all'intossicazione irachena evidenziò per la prima volta una relazione dose-risposta (Cox et al. 1989; WHO 1990). La concentrazione di Hg rilevata nei capelli materni fu utilizzata per stimare l'esposizione dei feti nell'utero: concentrazioni di THg nei capelli materni comprese tra 10 e 20 ppm furono associate a rilevanti danni neurologici nei bambini (Cox et al. 1989; Davidson et al. 2004) e negli anni seguenti i dati ottenuti da questo studio costituirono il parametro di riferimento per determinare l'intake giornaliero di MeHg esente da rischi neurologici.

Tuttavia, lo studio effettuato in Iraq presentava numerosi limiti. L'intossicazione era stata causata dal consumo di semi trattati con il MeHg e si era verificata all'interno di una comunità desertica sottanutrita. Le donne erano state intervistate relativamente allo sviluppo neurologico dei propri figli quando i bambini avevano all'incirca 30 mesi. Le interviste erano state effettuate attraverso un interprete. Non si conoscevano le date di nascita esatte dei bambini esaminati. Non erano stati presi in considerazione possibili fattori confondenti quali lo stato socio-economico delle famiglie. Il numero di bambini che avevano manifestato danni neurologici era troppo basso per permettere una generalizzazione dei risultati. Inoltre, dato che la principale fonte di esposizione umana al MeHg era costituita dal consumo di pesce, la popolazione generale risultava più facilmente interessata da basse esposizioni di lunga durata piuttosto che da intossicazioni dovute ad elevati livelli di esposizione e nei capelli degli individui con elevato consumo di pesce venivano frequentemente rilevate concentrazioni di Hg pari a 10 ppm o superiori (Myers et al. 2000).

Vennero pertanto intrapresi diversi studi con lo scopo di valutare gli effetti sul neurosviluppo dell'esposizione cronica prenatale a basse o moderate dosi di MeHg attraverso l'alimentazione materna ricca di pesce; i risultati di questi studi furono inconsistenti (Shoeman et al. 2009).

Ad esempio nel 1986 iniziò uno studio prospettico su una coorte di 1022 bambini nati nelle isole Faroe in Danimarca tra il 1986 ed il 1987. In questa popolazione la principale fonte di esposizione al MeHg era costituita dal consumo di pesce e di carne di balena pilota (*Globicephala melas*). Le balene pilota presentano generalmente concentrazioni di MeHg più elevate rispetto al pesce oceanico e spesso contengono elevate concentrazioni di policlorobifenili (PCB's). Come principale indicatore di esposizione prenatale venne considerata la concentrazione di MeHg misurata nel sangue del cordone ombelicale; vennero anche determinate le concentrazioni di Hg nei capelli materni prelevati al momento del parto (Grandjean et al. 1997; Debes et al. 2006). Il 15% dei campioni di capelli analizzati presentò concentrazioni di MeHg superiori a 10 µg/g mentre nel sangue del cordone la concentrazione media di Hg fu di 22.8 µg/l; nel sangue del cordone tutto il Hg misurato era in forma di MeHg (Grandjean et al. 1992). La frequenza del consumo di pesce durante la gravidanza venne rilevata attraverso l'uso di un questionario somministrato alle donne immediatamente dopo il parto.

All'età di 7 e 14 anni i bambini vennero sottoposti a visita generale con accurato esame neurologico, vennero inoltre somministrati test neurofisiologici (valutazione dei potenziali evocati uditivi e visivi e variazione dell'intervallo R-R nell'ECG per la valutazione del sistema nervoso autonomo) e una batteria di test neuropsicologici selezionati in modo da includere le funzionalità coinvolte dalle anomalie neuropatologiche descritte nei casi di avvelenamento intrauterino (Takeuchi et al. 1962; Matsumoto et al. 1965; Choi 1989; Eto et al. 1992; Igata 1993) oltre che i deficit funzionali osservati nei bambini esposti al MeHg durante la prima infanzia (Kjellstrom et al. 1989; White et al. 1994).

Un altro studio prospettico di coorte sulla tossicità fetale dell'esposizione a basse dosi di MeHg iniziò nel 1989 alle isole Seychelles su una coorte di 779 bambini nati tra il 1989 ed il 1990 (Davidson et al. 1998). In questa popolazione la principale fonte di esposizione al MeHg era costituita dall'elevato consumo giornaliero di pesce. L'esposizione prenatale venne determinata attraverso la misurazione della concentrazione di THg nei capelli delle madri; i campioni di capelli vennero raccolti in occasione del parto. L'esposizione postatale venne determinata attraverso la misurazione della concentrazione di THg nei capelli dei bambini. I livelli di Hg misurati nei capelli materni mostrarono un valore mediano di 5.9 ppm con un range compreso tra 0.5 e 26.7 ppm.

I bambini vennero valutati 5 volte nel corso di 11 anni (a 6.5, 19, 26, 66 e 107 mesi); in ciascuna occasione i bambini vennero sottoposti ad un esame neurologico comprensivo di tests per la valutazione dello sviluppo psicologico neurocomportamentale e cognitivo (Myers et al.

2000; Shamlaye et al. 2004); anche in questo caso i tests utilizzati furono selezionati in modo da includere le funzionalità coinvolte dalle anomalie neuropatologiche descritte nei casi di avvelenamento intrauterino da MeHg (Takeuchi et al. 1962; Matsumoto et al. 1965; Choi 1989; Eto et al. 1992; Igata 1993). La frequenza del consumo di pesce durante la gravidanza venne rilevata attraverso l'utilizzo di un questionario somministrato alle donne in occasione della visita di valutazione neurologica dei bambini.

L'associazione tra esposizione prenatale al Hg, alterazioni all'esame neurologico e ritardo nel raggiungimento di alcune tappe dello sviluppo (inizio della marcia e della parola) (Harada 1995) osservati in Iraq non vennero confermati in questi due studi su popolazioni con elevati consumi di pesce. Tuttavia nelle isole Faroe l'esposizione prenatale al MeHg risultò associata, sia a 7 che a 14 anni, a peggiori risultati nei test neuropsicologici somministrati (attenzione, linguaggio, funzioni motorie, memoria verbale e percezione visiva dello spazio) e ad alterazioni neurofisiologiche (ritardo dei potenziali evocati uditivi) (Grandjean and Wheile 1993; Grandjean et al. 1997; Grandjean et al. 2003; Murata et al. 2004; Debes et al. 2006).

Secondo i ricercatori danesi questi risultati erano compatibili con la conclusione che l'esposizione prenatale al MeHg avesse effetti generalizzati sulla funzionalità cerebrale (Grandjean et al. 1997); inoltre i ricercatori danesi ritennero che la neurotossicità del MeHg potesse essere stata potenziata dall'esposizione ai PCB's, attraverso il consumo di carne di balena pilota, sebbene i dati riportati abbiano mostrato la presenza di effetti avversi dovuti al MeHg anche dopo correzione per le concentrazioni di PCB's rilevate (Budtz-Jorgensen et al. 1999; Grandjean et al. 2001).

Nello studio delle Faroe i valori di concentrazione di MeHg misurati nel sangue del cordone risultarono fortemente associati alla concentrazione di THg misurata nei capelli delle donne.

Nello studio delle Seychelles si evidenziarono solo deboli associazioni (alcune positive ed altre negative) tra il consumo di pesce ed i risultati ottenuti dai bambini ai tests di sviluppo neurologico (Davidson et al. 1995; Myers et al. 1995; Myers et al. 1997; Davidson et al. 1998; Davidson et al. 2000; Myers et al. 2000; Myers et al. 2003; Davidson et al. 2008).

Le ragioni dei diversi risultati ottenuti possono essere molteplici e sono tuttora materia di dibattito. Nei due studi sono stati utilizzati differenti tests per la rilevazione dell'outcome oltre che differenti biomarkers per la misurazione dell'esposizione prenatale (sangue del cordone e capelli materni). Le due popolazioni in esame avevano caratteristiche molto diverse. Nei due studi sono stati presi in considerazione potenziali fattori confondenti diversi. Infine, l'abbondante consumo di pesce debolmente contaminato può produrre effetti diversi rispetto al moderato

consumo di pesce e carne di balena pilota altamente contaminati, nonostante i risultanti valori di esposizione media siano simili (Davidson et al. 1998; Raymond and Ralston 2004).

L'esposizione al MeHg attraverso il consumo di pesce differisce notevolmente dall'avvelenamento da MeHg. Attraverso il consumo di pesce l'organismo umano è esposto a concentrazioni estremamente basse di MeHg per periodi di tempo estremamente lunghi. Il pesce può essere inoltre contaminato anche da quantità variabili di PCB's, di pesticidi organoclorurati, di idrocarburi aromatici, di diossine, di furani oltre che da cadmio (Cd), arsenico (As) e piombo (Pb). Il fegato non è in grado di detossificare grandi quantità di MeHg mentre sembrerebbe essere in grado di espellere o detossificare piccole quantità di questo tossico (Clarkson 1995).

Non bisogna inoltre dimenticare che il pesce offre alcuni nutrienti essenziali per la crescita e lo sviluppo del cervello del feto, primi tra tutti gli acidi grassi polinsaturi (PUFA's) omega-3 ed omega-6 (Marszalek and Lodish 2005; Koletzko et al. 2008), ma anche proteine con aminoacidi essenziali, macroelementi quali il calcio (Ca), il fosforo (P), il fluoro (F) e lo iodio (I), microelementi quali lo zinco (Zn) ed il selenio (Se) e vitamine. In diversi studi l'elevato consumo di pesce in gravidanza è stato associato con un migliore sviluppo cognitivo dei bambini (Daniels et al. 2004; Oken et al. 2005; Hibbeln et al. 2007; Oken et al. 2008). Grazie al suo elevato contenuto di PUFA's omega-3 quali l'acido docosaesaenoico (DHA, C22:6  $\omega$ -3), l'acido docosapentaenoico (DPA, C22:5  $\omega$ -6) e l'acido eicosapentanoico (EPA, C20:5,  $\omega$ -3), il consumo di pesce è considerato estremamente importante per lo sviluppo prenatale del sistema nervoso umano. I DHA in particolare si accumulano rapidamente a livello del sistema nervoso in via di sviluppo nel corso dell'ultimo trimestre di gravidanza e nei primi 2 anni di vita del bambino, concentrandosi nella materia grigia e nelle membrane retiniche (Lewin et al. 2005). I bambini possono ricevere i DHA dalla madre o possono sintetizzarli a partire dagli acidi grassi precursori LA (precursore della famiglia dei PUFA's omega-6) ed ALA (precursore della famiglia dei PUFA's omega-3); al momento non esistono studi in grado di confermare che, in assenza di apporto materno di DHA, i DHA sintetizzati dai bambini siano adeguati a garantire uno sviluppo ottimale del sistema nervoso (Sakamoto et al. 2004; McCann and Ames 2005). Il consumo di pesce inoltre è correlato ad effetti benefici sul sistema nervoso umano anche ad età più avanzate (Myers et al. 2000) oltre che ad effetti protettivi per il sistema cardiovascolare (Mozaffarian and Rimm 2006). I PUFA's presenti nel pesce potrebbero essere in grado di diminuire o contrastare la tossicità del MeHg tanto da non far emergere gli effetti avversi dovuti all'esposizione a questo tossico (Clarkson 1995).

L'esposizione al MeHg in concomitanza con gli altri nutrienti contenuti nel pesce quali il Se e gli aminoacidi essenziali potrebbe influenzarne la potenziale tossicità. Il Se ad esempio potrebbe essere in grado di diminuire l'effetto tossico del MeHg mentre gli aminoacidi essenziali potrebbero competere con il MeHg per il trasporto all'interno del cervello (Clarkson 1995; WHO 1990). In particolare il Se, microelemento essenziale tossico a concentrazioni elevate, è necessario per il corretto funzionamento di numerosi enzimi Se-dipendenti nell'uomo e negli animali (Miklavcic et al. 2011a). Il Hg reagisce con il Se a formare selenito di mercurio ( $\text{HgSeO}_3$ ) un sale metabolicamente inattivo con bassa solubilità; diversi studi hanno dimostrato che la supplementazione attraverso la dieta di Se contrasta l'effetto negativo dell'esposizione a MeHg in tutte le specie di mammiferi, uccelli e pesci presi in considerazione (Beijer and Jernelov 1987; Culvin-Aralar and Furness 1991), mentre sono ancora limitate le conoscenze relative ai potenziali effetti protettivi contro la tossicità del MeHg nell'uomo (National Research Council 2000).

### 3. Risk Assessment

Sebbene i diversi studi effettuati non abbiano portato a risultati univoci relativi ai possibili effetti neurologici causati dall'esposizione a basse dosi di MeHg, le agenzie internazionali per la salute hanno utilizzato i dati derivanti dallo studio iracheno, dallo studio delle isole Faroe, dallo studio delle isole Seychelles e da un altro studio di coorte neozelandese in cui si erano ottenuti risultati simili a quelli delle isole Faroe (Kjellstrom et al. 1986), per determinare il rischio nella popolazione generale dovuto all'assunzione di MeHg.

L'Agenzia per la protezione dell'ambiente americana (EPA) ha stabilito per il MeHg un valore di assunzione massimo quotidiano pari a 0.1 µg/kg di peso corporeo (EPA 1997), mentre il Joint FAO/WHO Expert Committee on food Additives (JEFCA) ha stabilito un valore provvisorio di assunzione massimo settimanale (PTWI) pari a 1.6 µg/kg di peso corporeo (corrispondente a 0.23 µg/kg al giorno) (WHO 2004). La differenza tra i valori di assunzione tollerabili riflette differenti presupposti nella valutazione del rischio, oltre che metodologie diverse nell'analisi dei dati esaminati e nei fattori di incertezza utilizzati (NRC 2000).

L'EPA ha anche calcolato attraverso un modello statistico ed utilizzando un fattore di incertezza pari a 10, il benchmark dose level (BMDL) che definisce il cut-off tra presunta innocuità e tossicità; come valori di cut-off sono stati scelti una concentrazione di THg pari a 5.8 µg/L nel sangue del cordone ed una concentrazione di THg pari a 1.2 µg/g nei capelli materni. Il valore BMDL rappresenta il limite inferiore di confidenza al 95% della dose che aumenterebbe la probabilità che il 5% della popolazione ottenesse un punteggio anormale al Boston Naming Test, un test neuropsicologico per i bambini in età scolare che valuta l'abilità di scegliere la parola appropriata per l'espressione di un particolare concetto.

Secondo il valore di assunzione giornaliero tollerabile stabilito dall'EPA una donna di 70 kg potrebbe assumere al massimo circa 50 µg di MeHg a settimana; questo valore è stato calcolato sulla base del limite inferiore di confidenza al 95% della dose che in caso di esposizione prenatale potrebbe determinare risultati anomali ai test di sviluppo neurologico e moltiplicato per un fattore di incertezza di almeno dieci volte (Integrated Risk Information System. EPA).

Considerando che la concentrazione media di MeHg nel pesce marino e d'acqua dolce è pari a circa 0.2 mg/kg una donna di 70 kg potrebbe consumare all'incirca 35 g di pesce al giorno (Mahafey et al. 1997) ovvero approssimativamente una porzione (150 g) di pesce a settimana.

La Food and Drug Administration (FDA) e l'Agenzia per la protezione dell'ambiente americana (EPA) hanno inoltre emanato una serie di raccomandazioni destinate sia alle donne in

età fertile, con lo scopo di limitare il consumo di pesce evitando in particolare il consumo dei pesci predatori al vertice della catena alimentare acquatica, che alle donne in gravidanza, con lo scopo di evitare esposizioni potenzialmente dannose per il feto (US Food and Drug Administration 2001; US Department of Health and Human Services 2004).

In seguito a queste raccomandazioni, il consumo di pesce riportato da una coorte di donne gravide del Massachusetts è drasticamente diminuito (Oken et al. 2003); in questo modo è stata limitata non solo la possibile esposizione dei feti al MeHg ma anche l'apporto PUFA's essenziali per il neurosviluppo ottimale del feto (Koletzko et al. 2008).

Dato che le maggiori concentrazioni di MeHg si rilevano negli organismi appartenenti ai livelli più elevati della catena trofica acquatica, il consumo di questi dovrebbe essere evitato o almeno ridotto, mentre dovrebbero essere preferiti i pesci di piccola taglia che stanno ai livelli più bassi della catena alimentare acquatica.

In Europa il Regolamento CE N° 1881/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari, fissa relativamente al Hg la concentrazione massima di 0.50 mg/kg nei prodotti della pesca eccetto quelli a più elevato livello di contaminazione (tonno, spigola, anguilla, scorfano, squalo, storione) per i quali la concentrazione massima è di 1.0 mg/kg.

Emerge pertanto con chiarezza la necessità di indagare ulteriormente gli effetti dell'esposizione prenatale a basse dosi di MeHg in modo da poter fornire alle donne in età fertile ed alle donne incinta delle chiare indicazioni relativamente al consumo di pesce durante la gravidanza.

## **4. Rilevanza ed obiettivi dello studio**

### **4.1. Rilevanza per la sanità pubblica**

L'interesse del mondo scientifico e dell'opinione pubblica per il possibile ruolo svolto dall'alimentazione come fattore protettivo o causa di malattia è in continua crescita e nella società moderna molte tra le più comuni patologie risultano essere in stretta associazione con la dieta.

Il Hg è uno degli inquinanti più pericolosi ed insidiosi per la salute dell'uomo e la sua tossicità si differenzia in funzione della forma chimica di assunzione. Il MeHg, in particolare, è in grado di causare gravi danni al sistema nervoso centrale sia dell'adulto che del feto. I grandi pesci predatori che occupano i vertici della catena alimentare acquatica costituiscono la principale fonte di introduzione di MeHg nell'organismo umano.

Il cervello in fase di sviluppo costituisce l'organo bersaglio più sensibile agli effetti tossici del MeHg; si ritiene che l'esposizione in utero costituisca un periodo critico per la tossicità del MeHg e che un'elevata sensibilità sia presente anche nella fase di sviluppo postnatale del bambino.

Da molti anni si discute relativamente ai benefici ed ai rischi derivanti dal consumo di pesce durante la gravidanza. Il pesce offre alcuni nutrienti essenziali per la crescita e lo sviluppo del cervello del feto, primi tra tutti i PUFA's, ma può contenere una quantità variabile di MeHg noto per la sua neurotossicità prenatale.

La reale portata del possibile rischio per la salute derivante dalla presenza del MeHg nel pesce tuttavia non è stata ancora chiarita. Dal momento che la tossicità del MeHg è stata dimostrata anche a basse concentrazioni, l'esposizione a questo composto dovrebbe essere ridotta al minimo determinando in questo modo una drastica diminuzione dei consumi di pesce. In termini di prevenzione però questa strada non è completamente percorribile in quanto il pesce è componente essenziale di una dieta equilibrata e fornisce importanti nutrienti.

Il Golfo di Trieste risulta essere una delle aree maggiormente soggette ad inquinamento da Hg dell'intero Mediterraneo. Le cause di questa contaminazione sono da attribuirsi alle numerose attività industriali presenti nel Golfo e soprattutto alla presenza nella vicina città slovena di Idrija della seconda miniera di Hg più grande del mondo. Le concentrazioni di Hg nelle acque, nei

sedimenti e nei pesci del Golfo di Trieste rimangono tuttora estremamente elevate nonostante dal 1996 le attività di estrazione siano state interrotte.

Negli anni passati un piccolo studio di coorte condotto in una zona costiera del Friuli Venezia Giulia ha rilevato che le concentrazioni di THg nei campioni di capelli di 243 mamme di giovani bambini erano direttamente associate con il consumo di pesce locale e raggiungevano livelli prossimi o superiori ai 10 ppm (Barbone et al. 2004; Gibicar et al. 2006). Pur rimanendo dell'incertezza sul livello minimo di esposizione prenatale al MeHg che sia causa di effetti tossici rilevabili sul sistema nervoso fetale, la letteratura disponibile fornisce consistenti evidenze della neurotossicità di esposizioni prenatali al MeHg corrispondenti a concentrazioni di THg nei capelli materni comprese tra 10 e 20 ppm.

E' emersa pertanto la necessità di indagare i possibili effetti sulla salute della popolazione locale dovuti al consumo di pesce contaminato; in particolare si è deciso di focalizzare l'attenzione sulle fasce di popolazione più sensibili alla tossicità del MeHg ovvero i feti ed i bambini.

Lo studio prospettico di coorte che costituisce l'oggetto del presente dottorato ha indagato lo sviluppo neurologico dei bambini esposti al MeHg attraverso l'alimentazione materna ricca di pesce in una popolazione costiera dell'Adriatico settentrionale.

L'ipotesi principale era che l'esposizione prenatale e/o postnatale fosse associata a un'alterazione delle funzioni neurocomportamentali e neurocognitive, che sono state valutate con esami specifici intorno ai 18 mesi di età dei bambini.

Oltre al Hg sono stati presi in considerazione anche altri elementi che possono essere assunti con la dieta quali il piombo (Pb), il cadmio (Cd), l'arsenico (As), il manganese (Mn), il rame (Cu), lo zinco (Zn) ed il selenio (Se), ma anche fattori nutrizionali ritenuti positivi per la crescita e lo sviluppo quali i PUFA's di cui è ricco il pesce. Nel corso dell'indagine non sono state trascurate altre variabili che possono influire sulle funzioni neurocognitive dei bambini quali l'ambiente familiare, lo stato socio-economico delle famiglie ed il quoziente intellettivo (QI) materno.

Lo studio si è rivolto a una popolazione di donne gravide residenti in una zona costiera del Friuli Venezia Giulia, per le quali si presumeva che il consumo di pesce fosse maggiore rispetto ad altre fasce di popolazione residenti in aree diverse. La partecipazione ha avuto un'importante ricaduta in termini di salute pubblica, poichè l'analisi dei dati raccolti in relazione alle abitudini alimentari, all'ambiente familiare e all'esposizione a basse dosi di MeHg attraverso il consumo di pesce, ha permesso ai ricercatori di orientare le future mamme e la comunità con informazioni

precise, non allarmistiche e comprensive di consigli utili a evitare possibili problemi e ad assicurare ai nuovi nati le maggiori garanzie di uno sviluppo appropriato.

Il valore dell'informazione prodotta da questo studio sarà proporzionale alla sua capacità di intervenire in modo rilevante sulle abitudini alimentari delle donne in età fertile ed in gravidanza.

## **4.2. Obiettivi dello studio**

Lo studio di coorte prospettico oggetto del presente dottorato ha avuto lo scopo di valutare l'associazione tra l'esposizione prenatale a basse dosi di MeHg attraverso il consumo di pesce materno e lo sviluppo neurologico dei bambini appartenenti ad una popolazione costiera del Friuli Venezia Giulia. Nella valutazione dell'associazione è stato considerato l'effetto di differenti potenziali fattori di confondimento primi tra tutti i PUFA's oltre che altre variabili socio-demografiche o legate agli stili di vita.

## **5. Materiali e Metodi**

### **5.1. Popolazione**

I soggetti eleggibili per lo studio sono stati reclutati da una popolazione di donne gravide residenti in Friuli Venezia Giulia da almeno 2 anni, maggiorenni, prive di patologie che potessero in qualche modo influire sul normale sviluppo neurologico dei loro bambini, aventi gravidanze singole e a decorso fisiologico, capelli di lunghezza adeguata ed afferenti relativamente alla gravidanza e al parto presso l'IRCCS Burlo Garofano di Trieste. Il reclutamento della coorte italiana è iniziato nell'aprile del 2007 e si è concluso nel marzo del 2009.

### **5.2. Disegno dello studio**

Lo studio è stato concepito come uno studio di coorte prospettico nel quale le donne sono state contattate ed informate sugli scopi della ricerca tra la 20<sup>a</sup> e la 22<sup>a</sup> settimana di gestazione, nel corso della seconda ecografia fornita gratuitamente dal Sistema Sanitario Nazionale, presso il Centro Ecografico dell'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste. Le donne che hanno accettato di essere arruolate nello studio sono state invitate a compilare un consenso informato ed è stato loro somministrato un questionario (questionario breve) volto a verificare che i criteri di inclusione nello studio fossero rispettati e a raccogliere alcune informazioni preliminari sulle abitudini alimentari e sullo stile di vita; a ciascuna donna arruolata sono stati prelevati una ciocca di capelli e due provette di sangue venoso ed è stato consegnato un contenitore di plastica sterile da riconsegnare con la prima urina del mattino in occasione della terza ed ultima ecografia fornita dal Sistema Sanitario Nazionale tra la 30<sup>a</sup> e la 32<sup>a</sup> settimana di gestazione. A ciascuna donna arruolata sono state inoltre somministrate le Matrici Progressive di Raven, un test di intelligenza non verbale che permette di valutare il livello di intelligenza generale e attraverso il quale è possibile ottenere la misura del QI dei soggetti esaminati.

In occasione della terza ecografia, tra la 30<sup>a</sup> e la 32<sup>a</sup> settimana di gestazione, a ciascuna donna arruolata è stato consegnato un altro questionario (questionario lungo dettagliato autocompilato) volto ad indagare in maniera approfondita la dieta durante la gravidanza e la presenza di eventuali esposizioni lavorative e/o abitative ai metalli pesanti, in particolare al Hg. Sempre in

questa occasione è stato consegnato alle donne un contenitore di plastica sterile per la raccolta di un campione di latte. Il campione di latte ed il questionario dettagliato sono stati raccolti un mese dopo il parto durante una visita effettuata dai ricercatori presso il domicilio delle donne arruolate.

I parti delle donne arruolate sono iniziati nel luglio del 2007 e si sono conclusi nell'agosto del 2009; entro pochi minuti dal parto è stato prelevato, dove possibile, un campione di sangue del cordone.

Lo sviluppo neurologico e psicologico dei bambini è stato valutato attraverso il Bayley Test Scales of Infant and Toddler Development®, Third Edition, (BSID III). I test sono stati effettuati a partire dal gennaio 2009 quando cioè i primi bambini nati dalle donne arruolate hanno raggiunto l'età di 18 mesi e sono terminati nel febbraio del 2011.

Con lo scopo di minimizzare le possibili perdite al follow-up delle donne arruolate, nei mesi precedenti l'incontro per la somministrazione del BSID III le donne sono state periodicamente informate, attraverso l'invio di comunicazioni postali, relativamente all'andamento dello studio ed ai valori di concentrazione di THg misurati nei campioni biologici raccolti; sono state anche inviate lettere d'auguri in occasione del primo compleanno dei bambini ed in occasione delle festività principali.

Il protocollo dello studio è stato approvato dai Comitati Etici dall'Università degli Studi di Udine e del IRCCS Burlo Garofolo di Trieste.

Le fasi dello studio sono riassunte in Tabella 1.

**Tabella 1.** Fasi dello studio.

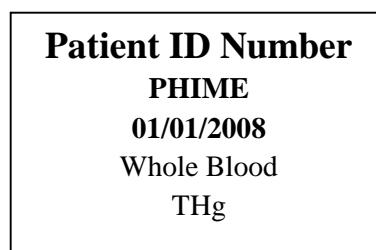
<b>FASE PRENATALE</b>	
<b>Primo incontro: 20<sup>a</sup>-22<sup>a</sup> settimana di gestazione</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arruolamento</li> <li>• Somministrazione questionario breve preliminare</li> <li>• Prelievo campione di capelli</li> <li>• Prelievo campione di sangue venoso</li> <li>• Matrici Progressive di Raven</li> </ul>
<b>Secondo incontro: 30<sup>a</sup>-32<sup>a</sup> settimana di gestazione</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Raccolta campione di urina</li> <li>• Consegna del questionario dettagliato</li> </ul>
<b>FASE POSTNATALE</b>	
<b>Terzo incontro: al momento del parto</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prelievo sangue del cordone ombelicale</li> </ul>
<b>Quarto incontro: 1 mese dopo il parto</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ritiro questionario dettagliato</li> <li>• Raccolta campione di latte</li> </ul>
<b>Quinto incontro: ai 18 mesi del bambino</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BSID III</li> </ul>

### 5.3. Raccolta dei campioni biologici

Ad ogni soggetto reclutato nella coorte è stato assegnato un numero progressivo di identificazione (ID) per garantire la massima riservatezza delle informazioni e dei dati trattati.

Il numero di identificazione del soggetto è stato riportato su tutte le etichette adesive utilizzate per i campioni biologici raccolti. Sulle etichette sono stati inoltre riportati i seguenti dati:

- nome dello studio
- data di raccolta
- tipo di campione
- sostanze da ricercare nel campione



#### Campione di capelli

I capelli sono stati prelevati dalla regione occipitale utilizzando un paio di forbici di acciaio inox ed indossando guanti privi di talco; la ciocca prelevata, del peso approssimativo di 200 mg è stata tagliata il più vicino possibile alla cute ed è stata successivamente legata in prossimità dell'estremità di taglio con del filo interdentale. Ciascuna ciocca è stata posta all'interno di una busta di plastica etichettata con il codice ID della donna; ciascuna busta di plastica è stata a sua volta riposta all'interno di una busta di carta bianca anch'essa etichettata con il codice ID della donna. Nei campioni di capelli sono state misurate le concentrazioni di THg e di MeHg. Le buste di carta contenenti i campioni sono state conservate a temperatura ambiente lontano da potenziali fonti di contaminazione.

#### Campione di sangue venoso

Sono stati prelevati 7 ml di sangue venoso in una provetta Vacutainer Blue Cup NaH specifica per i metalli pesanti e 5 ml di sangue venoso in una provetta Vacutainer Red Cup.

Il sangue prelevato nella provetta Blue Cup NaH è stato lasciato riposare per circa 10 minuti; successivamente una parte del sangue è stata suddivisa in 3 aliquote: un'aliquota da 1000 µl per la determinazione delle concentrazioni di Pb, Cd, As, Mn e Cu e due aliquote da 1500 µl per la determinazione delle concentrazioni di THg e MeHg. Il resto del campione è stato centrifugato a

3000 rxm per 10 minuti e successivamente 1200 µl di plasma sono stati separati dalla parte corpuscolata. L'aliquota di plasma è stata utilizzata per la determinazione delle concentrazioni di Zn e Se. Il sangue prelevato nella provetta Vacutainer Red Cup è stato centrifugato a 3000 rxm per 10 minuti e successivamente 2000 µl di siero sono stati separati dalla parte corpuscolata e suddivisi in 2 aliquote da 1000 µl ciascuna. Le aliquote di siero sono state utilizzate per la determinazione della concentrazione dei seguenti PUFA's: acido linoleico (LA, C18:2 ω-6), acido α-linolenico (ALA, C18:3 ω-3), acido arachidonico (ARA, C20:4 ω-6), acido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 ω-3), acido docosapentaenoico (DPA, C22:5 ω-3), acido docosaesaenoico (DHA, C22:6 ω-3). Ciascuna aliquota è stata etichettata con il codice ID della donna e tutte le aliquote di sangue sono state conservate in un congelatore a -80°C fino al momento delle analisi.

#### Campione di urina

Il campione di urina è stato suddiviso in due aliquote da 13 ml ciascuna. Le due aliquote sono state etichettate con il codice ID della donna e sono state conservate nel congelatore a -80°C fino al momento delle analisi. All'interno dei campioni di urina è stata determinata la concentrazione di THg.

#### Campione di sangue del cordone

Il campione di sangue del cordone è stato prelevato tramite una siringa entro pochi minuti dal parto e prima del clampaggio del cordone ombelicale; il sangue prelevato è stato delicatamente travasato all'interno di una provetta Vacutainer Blue Cup NaH da 7 ml specifica per i metalli pesanti. Il sangue è stato lasciato riposare per circa 10 minuti; successivamente una parte del sangue è stata suddivisa in 3 aliquote: un'aliquota da 1000 µl per la determinazione delle concentrazioni di Pb, Cd, As, Mn e Cu e due aliquote da 1500 µl per la determinazione delle concentrazioni di THg e MeHg. Il resto del campione è stato centrifugato a 3000 rxm per 10 minuti e successivamente 1200 µl di plasma sono stati separati dalla parte corpuscolata. L'aliquota di plasma è stata utilizzata per la determinazione delle concentrazioni di Zn e Se. Ciascuna aliquota è stata etichettata con il codice ID della donna e tutte le aliquote di sangue sono state conservate in un congelatore a -80°C fino al momento delle analisi.

### Campione di latte materno

Il campione di latte materno è stato raccolto dalle donne nelle 24 ore precedenti l'arrivo del ricercatore incaricato di ritirare presso il domicilio delle signore il campione di latte stesso ed il questionario dettagliato precedentemente consegnato. Il campione di latte è stato spremuto a mano direttamente dal seno oppure è stato estratto utilizzando un tiralatte; in entrambi i casi per la raccolta e la conservazione del campione di latte è stato utilizzato un contenitore sterile precedentemente consegnato alle donne. Nell'arco delle 24 ore il latte è stato raccolto in tre diversi momenti della giornata: al mattino, al pomeriggio ed alla sera; in ciascuno di questi tre momenti inoltre è stata raccolta una piccola quantità di latte all'inizio, nella parte centrale ed alla fine della poppata. Tra una poppata e l'altra il contenitore è stato conservato ben chiuso in frigorifero a 4°C. Il campione di latte è stato utilizzato per la determinazione delle concentrazioni di THg e MeHg. Ciascun campione di latte una volta raccolto è stato etichettato con il codice ID della donna e conservato in un congelatore a -80°C fino al momento delle analisi.

Le caratteristiche e la tipologia di analisi a cui sono stati destinati i campioni raccolti sono riportate in Tabella 2.

Per garantire la massima uniformità, confrontabilità e precisione tutte le procedure relative al prelievo, allo stoccaggio ed alla conservazione dei campioni biologici raccolti, sono state effettuate esclusivamente da personale abilitato facente parte dello studio; anche il sangue del cordone è stato prelevato e processato entro pochi minuti dal parto da ricercatori coinvolti nello studio, reperibili 24 ore su 24 sette giorni alla settimana, che venivano allertati dal personale ostetrico della sala parto nel momento in cui una delle donne arruolate entrava in travaglio.

I campioni biologici raccolti nel corso dello studio sono stati periodicamente trasportati e/o inviati presso i laboratori incaricati delle analisi. Nello specifico i campioni di capelli, di sangue intero (venoso e del cordone), di urina e di latte sono stati trasportati presso l'Istituto Jozef Stefan di Ljubljana per la determinazione delle concentrazioni di THg, MeHg, Pb, Cd, As, Mn e Cu. I campioni di plasma sono stati trasportati presso il Clinical Center di Ljubljana per le analisi di Zn e Se. I campioni di siero sono stati inviati presso l'Università di Ulster per la determinazione delle concentrazioni di PUFA's.

Il trasporto e la spedizione dei campioni di sangue, urina e latte sono avvenuti all'interno di contenitori di polistirolo contenenti ghiaccio secco al fine di evitarne lo scongelamento durante il trasporto.

**Tabella 2.** Caratteristiche e tipologia di analisi a cui sono stati destinati i campioni raccolti

<b>CAMPIONE</b>	<b>QUANTITÀ</b>
<b>Capelli della madre</b>	200 mg per THg
<b>Sangue venoso</b>	<p><b>3 aliquote di sangue intero:</b>            1000 µl per Pb, Cd, As, Mn e Cu            2 x 1500 µl per THg e MeHg</p> <p><b>1 aliquota di plasma:</b>            1200 µl per Zn e Se</p> <p><b>2 aliquote di siero:</b>            2 x 1000 µl per PUFA's</p>
<b>Urina</b>	13 ml per THg
<b>Sangue del cordone</b>	<p><b>3 aliquote di sangue intero:</b>            1000 µl per Pb, Cd, As, Mn e Cu            2 x 1500 µl per THg e MeHg</p> <p><b>1 aliquota di plasma:</b>            1200 µl per Zn and Se</p>
<b>Latte</b>	<b>1 aliquota</b> da 13 ml per THg e MeHg

## 5.4. Biomarkers di esposizione

I parametri misurati nell'ambito del monitoraggio biologico umano sono indicati con il nome di biomarkers o indicatori biologici. Tali indicatori includono parametri di natura chimica, biochimica, fisiologica e comportamentale. La loro funzione è di rilevare un evento che può influenzare o predire l'insorgenza e/o l'evoluzione di una malattia e sono fondamentali al fine di stabilire un nesso causale tra l'esposizione ad una sostanza tossica ed il manifestarsi di alterazioni funzionali o morfologiche.

I biomarkers sono classificati in biomarkers di esposizione (indicatori di dose interna e indicatori di dose biologicamente efficace), biomarkers di effetto e biomarkers di suscettibilità.

La loro misurazione viene effettuata a livello di un'ampia gamma di matrici biologiche (urina, sangue intero, siero, plasma, capelli, unghie, denti, latte, saliva, meconio, aria espirata, sangue dal cordone ombelicale ecc), ed un biomarker ideale dovrebbe sempre essere stabile, sufficientemente sensibile e specifico.

Durante la fase prenatale la valutazione del rischio presenta numerosi problemi a causa della difficoltà di ottenere dati relativi all'effettiva esposizione del feto. A questo scopo vengono utilizzati dei biomarkers "indiretti" ovvero basati su misurazioni del contenuto di uno xenobiotico all'interno di campioni biologici materni oltre che nel sangue e nel tessuto cordonale.

In questo studio relativamente all'esposizione prenatale si è scelto di misurare la concentrazione di THg e MeHg nei campioni di capelli, di sangue venoso e di urina delle donne arruolate mentre per quanto riguarda l'esposizione postnatale si è scelto di misurare la concentrazione di THg e di MeHg nei campioni di sangue del cordone e di latte.

Le concentrazioni di THg misurate nei campioni di capelli e di sangue venoso vengono solitamente utilizzate come biomarkers di esposizione principale negli individui per i quali si possano escludere esposizioni occupazionali o ambientali e per i quali la principale fonte di esposizione sia costituita dal MeHg assunto attraverso la dieta (NRC 2000). Negli individui che consumano pesce circa l'80% del Hg presente nei capelli è sottoforma di MeHg. Il MeHg una volta all'interno del capello viene parzialmente trasformato in IHg; di conseguenza misurando la concentrazione di THg si ottiene una buona stima dell'effettiva quantità di MeHg assorbito dal follicolo del capello dal torrente circolatorio. La concentrazione di THg presente nei campioni di capelli riflette la concentrazione di MeHg presente nel sangue nel momento in cui il capello si è

formato anche se a causa dell'abbondante presenza di proteine contenenti gruppi SH è generalmente 250-300 volte maggiore rispetto alla concentrazione misurata nel sangue.

Dato che l'emivita del Hg nel sangue corrisponde a circa 50 giorni, la concentrazione di THg misurata nel sangue costituisce una misura di esposizione recente; al contrario la concentrazione di THg misurata nei capelli permette di ricapitolare l'esposizione di diversi mesi addietro.

In persone che consumano pesce più del 90% del Hg presente nei globuli rossi è sottoforma di MeHg; le concentrazioni di Hg misurate nei campioni di sangue costituiscono l'indicatore di esposizione più appropriato per valutare la dose di Hg effettivamente assorbita dall'organismo e la quantità di Hg disponibile sistemicamente (Grandjean et al. 2005a).

La concentrazione di Hg misurata nel sangue del cordone costituisce un ottimo biomarker per valutare l'esposizione al MeHg nel feto (Honda et al. 2006); il MeHg viene trasportato attivamente attraverso la placenta da parte di carrier aminoacidici ed il Hg presente nel sangue del cordone è quasi totalmente nella forma di MeHg (Grandjean et al. 2005a). Il cordone ombelicale si sviluppa prevalentemente nel corso del secondo e del terzo trimestre di gestazione e raggiunge i due terzi della propria lunghezza entro la fine del secondo trimestre (Kaufmann and Scheffen 1998); dato che l'emivita del MeHg nel sangue è di circa 45 giorni, la concentrazione di MeHg misurata nel sangue del cordone può essere considerata come un indicatore dell'esposizione fetale media al Hg durante il terzo trimestre (Grandjean et al. 1997). Inoltre a causa del trasporto attivo del MeHg attraverso la placenta e degli elevati valori di ematocrito normalmente presenti nel feto, la concentrazione di MeHg misurata nel sangue del cordone è da 1,5 a 2 volte maggiore rispetto a quella misurata nel sangue materno (Sakamoto et al. 2004; Honda et al. 2006).

La concentrazione di THg misurata nei campioni di urina costituisce il biomarker di elezione per valutare l'esposizione al IHg (Vahter et al. 2000). Nelle persone per le quali si possano escludere esposizioni occupazionali o ambientali, la principale fonte di esposizione al IHg è costituita dai vapori di Hg<sup>0</sup> rilasciati dalle amalgame dentali. Grazie all'elevata liposolubilità il Hg<sup>0</sup> è in grado di attraversare la barriera placentare (Clarkson 1989) accumulandosi nel cervello e nel fegato del feto.

In diversi studi è emerso come i bambini siano esposti al MeHg anche attraverso il latte materno (Sundberg et al. 1991; Grandjean et al. 1994; Nordenhall et al. 1998; Bjornberg et al. 2005). Sia il MeHg che il IHg vengono trasportati dal plasma al latte legati alle albumine sieriche e il IHg anche legato alle caseine (Sundberg et al. 1999). L'escrezione nel latte è inoltre influenzata dalla concentrazione di Hg presente nel plasma materno; come già visto circa il 65%

del IHg e solo il 10% del MeHg contenuti nel sangue intero si trovano nel plasma e sono quindi disponibili all'escrezione nel latte. Nonostante il IHg venga escreto nel latte materno in maggior misura rispetto al MeHg, è il MeHg che una volta ingerito viene maggiormente assorbito a livello gastrointestinale e che quindi costituisce un'ulteriore fonte di esposizione per i bambini. In popolazioni ad elevato consumo di pesce il MeHg escreto attraverso il latte può costituire una fonte di esposizione significativa per i bambini.

## 5.5. Analisi chimiche

La determinazione delle concentrazioni di THg nei campioni di capelli, di sangue venoso e di sangue del cordone è stata effettuata mediante combustione termica a 650°C, amalgamazione e successiva spettroscopia di assorbimento atomico a vapori freddi (CVAAS) mediante lo strumento Direct Mercury Analyzer (Milestone, USA), in accordo con le procedure indicate dall'Agenzia Americana per la Protezione dell'Ambiente (EPA, 1998).

L'accuratezza dei valori di concentrazione di THg misurati nei campioni di capelli è stata verificata attraverso l'analisi del materiale di riferimento certificato NIES 13 (capelli umani); i valori di concentrazione misurati sono risultati in buon accordo con i valori di riferimento.

L'accuratezza dei valori di concentrazione di THg misurati nei campioni di sangue è stata verificata attraverso l'analisi del materiale di riferimento certificato Seronorm Trace Elements in Whole Blood L-1; anche in questo caso i valori di concentrazione misurati sono risultati in buon accordo con i valori di riferimento.

Il limite di rilevabilità (LOD) del metodo, calcolato come la somma di tre volte la deviazione standard del campione bianco è stato di 0.2 mg/g di campione di capelli e di 0.02 ng/g di campione di sangue; il limite di quantificazione (LOQ) del metodo è stato di 0.7 ng/g di campione di capelli e di 0.07 ng/g di campione di sangue.

La precisione di determinazione delle concentrazioni misurate nei campioni di capelli, calcolata sulla base della deviazione standard della concentrazione di THg misurata nel materiale di riferimento certificato, è stata del 7% (IC 95% e fattore di copertura  $k=2$ ); la precisione di determinazione delle concentrazioni misurate nei campioni di sangue (calcolata come sopra descritto) è stata del 7% per i livelli di concentrazione maggiori o uguali a 1 ng/g (IC 95%,  $k=2$ ) e del 14% (IC 95%,  $k=2$ ) per i livelli di concentrazione inferiori a 1 ng/g.

Per la determinazione delle concentrazioni di THg nei campioni di latte materno circa 2 ml di latte sono stati versati in una beuta volumetrica con tappo a vite da 30 ml; successivamente sono stati aggiunti 1 ml di acqua distillata, 2 ml di una miscela HNO<sub>3</sub> (Merk, Germany, p.a.)-HClO<sub>4</sub> (Merk, Germany, suprapur) al 65% (1:1, v/v) e 5 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 96%. La beuta è stata riscaldata su una piastra a 220° C per 20 minuti. Dopo raffreddamento il volume del campione è stato portato a 30 ml mediante l'aggiunta di acqua distillata. Come descritto dettagliatamente da Akagi (1997) il contenuto di THg è stato determinato nei campioni digeriti mediante spettrometria ad assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) tramite l'analizzatore semi-automatico Mercury Analyser.

L'accuratezza dei valori di concentrazione di THg misurati nei campioni di latte è stata verificata attraverso l'analisi del materiale di riferimento certificato Non-Fat Milk Powder NIST 1549; i valori di concentrazione misurati sono risultati in buon accordo con i valori di riferimento.

Il Limite di rilevabilità (LOD) del metodo, calcolato sulla base della somma di tre volte la deviazione standard del campione bianco è stato di 0.045 ng/ml di campione di latte; il limite di quantificazione (LOQ) del metodo è stato di 0.02 ng/ml di campione di latte.

La precisione di determinazione delle concentrazioni di THg misurate nei campioni di latte è stata del 13% (IC 95%; k=2). Questo valore di precisione relativamente basso è dovuto alle moderate concentrazioni di THg presenti nei campioni di latte materno.

Per la determinazione delle concentrazioni di MeHg nei campioni di capelli circa 0.015-0.030 g di capelli sono stati inseriti in una provetta di teflon assieme a 10 ml di HCl 6M (Merck, Germany, suprapur); la miscela è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. Il Hg presente nell'estratto è stato sottoposto a nuova estrazione mediante l'aggiunta di 5 ml di toluene. 2 µl della miscela di toluene sono stati iniettati all'interno di una colonna cromatografica impaccata e la concentrazione di MeHg è stata determinata mediante gas cromatografia con rivelatore a cattura di elettroni (GC-EDC) come descritto dettagliatamente da Horvat et al. (1988) e da Horvat (1990).

L'accuratezza dei valori di concentrazione di MeHg misurati nei campioni di capelli è stata verificata attraverso l'analisi del materiale di riferimento certificato NIES 13 (capelli umani); i valori di concentrazione misurati sono risultati essere in buon accordo con i valori di riferimento.

Il limite di rilevabilità (LOD) del metodo, calcolato come la somma di tre volte la deviazione standard del campione bianco è stato di 0.2 ng/g di campione di capelli; il limite di quantificazione (LOQ) del metodo è stato di 0.7 ng/g di campione di capelli.

Per la determinazione delle concentrazioni di MeHg nei campioni di sangue e di latte circa 200 g di sangue o 1 g di latte sono stati versati direttamente in una provetta di Teflon con tappo a vite da 30 ml; successivamente sono stati aggiunti 6 ml di una miscela costituita da H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% (Merck, Germany, suprapur), KBr al 18% (Merck, Germany, p.a.) e da 1.0 ml di CuSO<sub>4</sub> 1M (Merck, Germany); la provetta è stata chiusa ed agitata per 15 minuti. Sono stati aggiunti 10 ml di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Merck, Germany, suprasolv) ed il campione è stato nuovamente agitato per 15 minuti. Il campione è stato centrifugato per 5 minuti a 3200 rxm e la fase organica è stata separata da quella acquosa tramite un imbuto separatore in Teflon; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> è stato raccolto in una provetta di Teflon da 60 ml a cui sono stati in seguito aggiunti 20 ml di acqua Milli-Q. La fase organica è stata fatta evaporare attraverso un bagno d'acqua a 90°C ed il rimanente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> è stato eliminato attraverso l'aggiunta di azoto gassoso per 5 minuti. Il pH della soluzione è stato aggiustato a 4,6 tramite l'aggiunta di 100 µl di una soluzione tampone acetato (CH<sub>3</sub>COOH: Merck, Germany suprapur; KH<sub>2</sub>COOH: Merk, Germany, extra pure), quindi sono stati aggiunti 50 µl di NaBEt<sub>4</sub> al 1% (Stream Chemicals, USA) e la miscela è stata lasciata reagire a temperatura ambiente per 15 minuti. La forma etilata del Hg è stata separata dalla miscela attraverso l'utilizzo di una trappola in Tenax sotto un flusso di azoto privo di Hg per 15 minuti. La trappola è stata poi collegata con un flusso di argon ed il MeHg è stato rimosso termicamente (180°C) attraverso una colonna cromatografica isoterma. Come descritto dettagliatamente da Horvat et al. (1993) e da Liang et al. (1994) le diverse forme di Hg sono state convertite in Hg<sup>0</sup> tramite pirolisi a 600°C e misurate attraverso spettrometria atomica di fluorescenza a vapori freddi (CV-AFS).

L'accuratezza dei valori di concentrazione di MeHg misurati nei campioni di sangue è stata verificata attraverso l'analisi del materiale di riferimento certificato Seronorm Trace Elements Whole Blood L-1; l'accuratezza dei valori di concentrazione di MeHg misurati nei campioni di latte è stata verificata attraverso l'analisi dei materiali standard di riferimento Spiked Skim Milk Powder BCR 150 e Non-Fat Milk Powder NIST 1549; i valori di concentrazione misurati sono risultati essere in buon accordo con i valori certificati e di riferimento.

Il limite di rilevabilità (LOD) del metodo, calcolato sulla base della somma di tre volte la deviazione standard del campione bianco è stato di 0.02 ng/g di campione di sangue e di 0.003 ng/g di campione di latte; il limite di quantificazione (LOQ) del metodo è stato di 0.05 ng/g di campione di sangue e di 0.01 ng/g di campione di latte.

La precisione di determinazione delle concentrazioni di MeHg misurate nei campioni di sangue è stata del 12% (IC 95%; k=2) per livelli di concentrazione maggiori o uguali a 1ng/g e

del 14% (IC 95%; k=2) per livelli di concentrazione inferiori a 1 ng/g; la precisione di determinazione delle concentrazioni di MeHg misurate nei campioni di latte è stata del 17% (IC 95%; k=2).

Le concentrazioni di Pb, Cd, As, Mn e Cu nei campioni di sangue intero venoso e del cordone e di Se e Zn nei campioni di plasma venoso e del cordone sono state determinate attraverso spettrometria di massa accoppiata induttivamente al plasma (ICP-MS) mediante lo strumento Agilent 7500ce provvisto dell'autocampionatore Cetac-ASX 510 in accordo con il metodo descritto da Barany et al. (1997).

I lipidi totali contenuti nei campioni di siero sono stati estratti secondo la metodologia adattata da Folch et al. (1957) e successivamente esterificati. La determinazione delle concentrazioni degli esteri metilici degli acidi grassi (FAME) è stata effettuata mediante gas cromatografo provvisto di colonna capillare BPX70 (SGE Analytical Science) attraversata da un flusso di elio e mediante rilevatore a spettrometria di massa a quadrupolo Agilent 5975C GM MSD (Agilent Technologies UK Limited, Stockport, UK).

## **5.6. Matrici Progressive di Raven**

Alle donne che hanno accettato di essere arruolate nello studio sono state somministrate le Matrici Progressive di Raven (Raven's Standard Progressive Matrices), un test di intelligenza non verbale che permette di valutare il livello di intelligenza generale dei soggetti esaminati (Raven 1940; Raven et al. 1986). Le Matrici di Raven misurano l'efficienza intellettuale, l'abilità nel formare delle relazioni percettive, trovare delle soluzioni e ragionare per analogia; possono essere somministrate a persone di qualsiasi età, indipendentemente dal livello culturale.

Sono costituite da 60 schede di difficoltà crescente, suddivise all'interno di 5 sezioni (A, B, C, D ed E). In ciascuna scheda è riportata una matrice di figure che presenta una parte mancante; al soggetto esaminato viene richiesto di completare la matrice scegliendo la corretta parte mancante tra i modelli numerati riportati al di sotto della matrice stessa. Il criterio di scelta deve essere sempre quello di selezionare il modello in grado di formare con il resto della matrice un insieme logico. Le matrici vengono presentate dall'esaminatore secondo un ordine ben preciso che garantisce la difficoltà crescente delle schede proposte.

L'esaminatore riporta nella griglia di valutazione il numero corrispondente alla scelta effettuata dal soggetto in esame per ogni matrice. La prova non prevede un tempo massimo, sono ammessi ripensamenti e cambi di scelta ma non è possibile ritornare sulle matrici già esaminate.

Ad ogni risposta corretta viene assegnato un punto. La somma di tutti i punti costituisce il punteggio grezzo; il punteggio grezzo può essere trasformato in rango percentile oppure, attraverso le apposite tabelle di trasformazione riportate nel manuale del test, in QI (Raven 1969).

Le Matrici di Raven sono state somministrate alle donne arruolate presso il Centro Ecografico dell'IRCCS Burlo Garofolo di Trieste da una psicologa abilitata in occasione del primo incontro con i ricercatori tra la 20<sup>a</sup> e la 22<sup>a</sup> settimana di gestazione.

## **5.7. Questionari**

Nel corso dello studio sono stati utilizzati due questionari retrospettivi del tipo FFQ (Food Frequency Questionnaire).

Il primo questionario utilizzato (Allegato 1), il questionario breve preliminare, è stato somministrato alle donne durante la fase dell'arruolamento con lo scopo di verificare che i criteri di inclusione nello studio fossero rispettati e di raccogliere alcune informazioni preliminari. Il questionario breve è un metodo di valutazione rapido con cui sono stati raccolti i dati anagrafici delle partecipanti ed alcune indicazioni sulle loro abitudini di vita attraverso risposte dicotomiche e una breve batteria di items sulla frequenza di consumo dei principali alimenti.

Il secondo questionario utilizzato (Allegato 2), il questionario lungo, è un questionario dettagliato autocompilato di tipo semiquantitativo, sviluppato specificatamente per la registrazione delle abitudini alimentari durante la gravidanza.

Questo questionario è stato adattato alle esigenze del nostro studio a partire da un altro questionario del tipo FFQ già validato ed utilizzato per la rilevazione delle abitudini alimentari nella popolazione italiana (Franceschi et al. 1993; Franceschi et al. 1995; Decarli et al. 1996).

Il questionario lungo è stato consegnato alle donne in occasione del secondo incontro, tra la 30<sup>a</sup> e la 30<sup>a</sup> settimana di gravidanza ed è stato compilato dalle stesse presso il proprio domicilio nei giorni successivi alla nascita dei loro bambini; il questionario è stato infine riconsegnato ai ricercatori in occasione della visita presso le abitazioni delle donne ad un mese dal parto.

Il questionario lungo era strutturato in tre sezioni: nella prima sezione venivano raccolti i dati anagrafici, antropometrici, scolastici ed occupazionali delle donne, alcune informazioni relative alle gravidanze precedenti ed alla gravidanza appena conclusa oltre che alcune informazioni relative allo stato socio-economico, allo stile di vita ed allo stato di salute generale delle signore e delle loro famiglie. La seconda sezione era costituita dal questionario dietetico vero e proprio composto da una lista di alimenti per i quali si richiedeva la frequenza di consumo abituale secondo una scala di frequenze predefinite (mensile, settimanale o giornaliera). Le voci alimentari, che comprendevano sia alimenti singoli sia ricette complesse, erano suddivise in sezioni. In ciascuna delle sezioni erano indicati gli alimenti più rappresentativi dell'alimentazione italiana. Una sezione speciale, costituita da 7 domande, era dedicata alla valutazione del consumo di pesce. In questa sezione si è tenuto conto delle 22 specie di pesce comunemente pescate e consumate nell'area di studio nonché dei principali tipi di pesce potenziali fonte di mercurio.

Nella terza sezione venivano infine raccolte informazioni relative alla storia residenziale ed occupazionale delle donne arruolate.

## **5.8. Rilevazione dello sviluppo neurologico**

Lo sviluppo neurologico e psicologico dei bambini è stato valutato a 18 mesi di età attraverso la somministrazione del BSID III (Bayley 2006).

Il BSID III costituisce lo strumento di valutazione di riferimento internazionale relativamente allo sviluppo cognitivo, linguistico, motorio, socio-emotivo e comportamentale dei bambini da 1 a 42 mesi ed è costituito da 5 scale di valutazione a somministrazione individuale: la Scala Cognitiva, la Scala del Linguaggio che comprende i subtest della Comunicazione Recettiva e della Comunicazione Espressiva, la Scala Motoria che comprende i subtest della Motricità Fine e della Motricità Grossolana, la Scala Socio-Emozionale e la Scala del Comportamento Adattivo.

La valutazione di queste 5 scale è condotta in parte attraverso esame diretto dei bambini ed in parte utilizzando le informazioni riportate dai genitori attraverso l'utilizzo di un questionario.

La valutazione diretta riguarda la Scala Cognitiva, la Scala del Linguaggio e la Scala Motoria; la Scala Socio-Emozionale e quella del Comportamento Adattivo invece sono completate

(interamente o in cooperazione con lo psicologo esaminatore) dal genitore che accompagna il bambino al test.

Nel presente studio sono state misurate tutte e cinque le scale di valutazione.

Ciascuna scala è costituita da diversi item ordinati secondo il loro grado di difficoltà. Ogni fascia d'età prevede un insieme di item con una gamma di difficoltà che va da quelli superati dal 90% dei bambini a quelli superati dal 15% dei bambini del campione di standardizzazione; gli item sono considerati "superati" o "non superati", ottenendo punteggio 1 o 0.

La Scala Cognitiva è costituita da 91 item e permette di valutare lo sviluppo senso motorio, la manipolazione, la memoria, la relazione tra gli oggetti e la formazione dei concetti.

La Scala del Linguaggio è costituita dal subtest del Linguaggio Recettivo e da quello del Linguaggio Espressivo. Il subtest del Linguaggio Recettivo include 49 item che valutano il comportamento preverbale, lo sviluppo del vocabolario, la capacità di identificare oggetti e immagini, il vocabolario relativo allo sviluppo morfologico, gli indicatori di tempo e l'utilizzo del possessivo. Il subtest del Linguaggio Espressivo include 48 item che valutano la comunicazione preverbale, lo sviluppo del vocabolario e lo sviluppo morfosintattico.

La Scala Motoria è costituita dal subtest della Motricità Fine e da quello della Motricità Grossolana; il subtest della Motricità Fine include 66 item che valutano le abilità della motricità fine associate alle prassie (sistemi coordinati di movimenti in funzione di un'intenzione e/o un risultato), l'integrazione motorio-percettiva, la pianificazione e la velocità motoria. Il subtest della Motricità Grossolana misura, attraverso 72 item, principalmente il movimento degli arti e del torace, valuta il posizionamento statico, il movimento dinamico, la locomozione, la coordinazione, il bilanciamento e la pianificazione motoria.

Attraverso la Scala Socio-Emozionale è possibile investigare l'acquisizione emozionale e sociale dei bambini. Gli item valutano il dominio dell'abilità emozionale funzionale, come l'autoregolazione e l'interesse per il mondo, la necessità di comunicare, l'impegno con gli altri e lo stabilire relazioni, l'utilizzo delle emozioni con scopo interattivo, l'utilizzo di segnali emozionali per risolvere i problemi. Si tratta di informazioni fornite dal genitore. Al termine della compilazione della Scala Socio-Emozionale, i dati, sono inseriti in tabelle che consentono di ricavare il profilo all'interno del quale si colloca il bambino.

La Scala del Comportamento Adattivo, anch'essa compilata dal genitore, è costituita da diversi subtest che indagano la comunicazione (verbale e non verbale), la vita di comunità (interesse per le attività fuori casa), la salute e la sicurezza (attenzione al mantenersi lontano da pericoli fisici), il divertimento (giocare, seguire delle regole), la cura di sé (mangiare, andare al

bagno, lavarsi), l'autodirezionarsi (autocontrollo, seguire direttive, fare delle scelte), la competenza prescolastica (riconoscimento di lettere, conteggio, disegni), il vivere in casa (aiutare gli adulti, prendersi cura delle proprietà personali), il sociale (andare d'accordo con altre persone, buone maniere, assistere gli altri) e l'attività motoria (locomozione e manipolazione dell'ambiente). Anche per questa scala i dati sono inseriti in tabelle che consentono di ricavare il profilo all'interno del quale si colloca il bambino.

Al termine della somministrazione del test, i punteggi delle diverse scale sono ricavati dalla somma degli item superati dal bambino e addizionati al numero dell'item che precede quello di somministrazione.

I punteggi grezzi così ottenuti sono trasformati, per mezzo di tabelle di conversione, in punteggi di scala, in punteggi compositi, in gradi percentili, in punteggi di crescita ed in punteggi equivalenti per età di sviluppo.

I punteggi di scala possono essere calcolati per tutti i subtest oltre che per le Scale Cognitive e Socio-Emozionale e derivano dai punteggi grezzi totali dei subtest, con una media di 10 ed una deviazione standard di 3.

I punteggi compositi sono calcolati per tutte e cinque le scale di valutazione, hanno una media di 100 ed una deviazione standard di 15; nelle scale che presentano subtest (Scala del Linguaggio, Scala Motoria e Scala del Comportamento Adattivo) i punteggi compositi vengono calcolati attraverso diverse somme dei punteggi di scala dei subtest stessi.

Il punteggio percentile indica la posizione del bambino rispetto a quella del campione di standardizzazione.

I punteggi di crescita sono utilizzati per rappresentare lo sviluppo del bambino nel tempo e sono disponibili per la Scale Cognitive e per i subtest della Comunicazione Recettiva, Espressiva, della Motricità Fine e della Motricità Grossolana, hanno una media di 500 ed una deviazione standard di 100.

I punteggi equivalenti per età di sviluppo rappresentano l'età media (in mesi) alla quale un dato punteggio grezzo totale è tipico: essi sono disponibili per la Scale Cognitive e per i subtest della Comunicazione Recettiva, Espressiva, della Motricità Fine e della Motricità Grossolana.

Nel presente studio sono stati utilizzati i punteggi compositi delle cinque scale di valutazione misurate. I test sono stati somministrati presso l'Unità Operativa di Neuropsichiatria Infantile del IRCCS Burlo Garofano di Trieste da due psicologhe abilitate.

La concordanza (inter-rater reliability) tra le due psicologhe è stata verificata su un sottocampione di bambini ed è risultata molto alta per tutti e tre i punteggi compositi relativi alle

scale valutate direttamente dalle psicologhe: il punteggio composito della Scala Cognitiva (ICC=0.98, 95%, CI: 0.97-0.99), il punteggio composito della Scala del Linguaggio (ICC=0.99, 95%, CI: 0.99-1.00) ed il punteggio composito della Scala Motoria (ICC 0.93, 95%, CI: 0.90-0.97).

## 5.9. Analisi statistiche

Nelle analisi statistiche sono stati inclusi solamente i bambini nati dalla 37<sup>a</sup> settimana di gestazione in poi, per i quali era disponibile almeno una misura di esposizione al Hg e per i quali il BSID III era stato effettuato all'età di 18±2 mesi.

Le misure di esposizione di interesse principale sono state il consumo di pesce delle donne durante la gravidanza e le concentrazioni di THg nei campioni biologici delle donne e dei bambini.

Il consumo di pesce durante la gravidanza è stato stimato sulla base delle informazioni riportate nel questionario lungo dettagliato autocompilato dalle donne subito dopo il parto. Il questionario lungo presentava all'interno della seconda sezione tre domande relative al consumo di pesce in cui veniva richiesto alle donne di riportare la frequenza di consumo, secondo delle categorie di frequenze predefinite (mai, meno di una volta al mese, una volta al mese, ecc), di porzioni di 150 g di pesce, crostacei e molluschi cucinati in diversi modi (bolliti, alla griglia, al forno e fritti). La distribuzione di frequenza di queste variabili è stata descritta attraverso il numero assoluto e la percentuale di soggetti in ciascuna categoria. Per ciascuna domanda relativa al consumo di pesce, la conversione dalle categorie di frequenza di consumo predefinite al numero di porzioni di pesce consumate è stata effettuata assegnando a ciascuna categoria un consumo corrispondente al valore mediano della categoria stessa (ad esempio: 2-4 volte a settimana è diventato 3 volte a settimana). Il consumo di pesce totale è stato calcolato attraverso la somma del consumo settimanale stimato di tutti i tipi di pesce.

La distribuzione del consumo di pesce, delle concentrazioni di Hg e di PUFA's rilevate nei campioni biologici analizzati è stata descritta attraverso i seguenti indici di sintesi: media aritmetica, deviazione standard, 25° percentile, mediana, 75° percentile, minimo e massimo.

Sono state calcolate anche le medie geometriche delle concentrazioni di Hg. La normalità delle distribuzioni è stata verificata attraverso il test di Shapiro-Wilk.

La concentrazione di MeHg nei campioni biologici, disponibile solo per un sottocampione di donne della coorte, è stata confrontata con quella di THg nei soggetti per i quali erano presenti entrambe le misure di concentrazione.

Sono stati calcolati i coefficienti di correlazione di Spearman per valutare le possibili associazioni tra i valori di concentrazione di THg e di MeHg nei campioni di capelli, di sangue venoso, di sangue del cordone e di latte.

I principali outcome di interesse sono stati i punteggi composti ottenuti dai bambini nelle cinque scale di valutazione del BSID III: la Scala Cognitiva, la Scala del Linguaggio, la Scala Motoria, la Scala Socio-Emozionale e la Scala del Comportamento Adattivo.

La distribuzione dei punteggi è stata descritta attraverso i seguenti indici di sintesi: media aritmetica, deviazione standard, 25° percentile, mediana, 75° percentile, minimo e massimo.

Le differenze tra i gruppi di soggetti sono state verificate attraverso il test di Wilcoxon per quanto riguarda le variabili continue e attraverso il test del Chi-Quadrato per quanto riguarda le variabili categoriche.

Sono stati calcolati i coefficienti di correlazione di Spearman per valutare le possibili associazioni tra il consumo di pesce e le concentrazioni di Hg e PUFA's nei campioni biologici analizzati.

Mediante analisi di regressione lineare sono state esaminate le misure di associazione grezza tra le concentrazioni di THg misurate nei campioni biologici e ciascuno dei punteggi composti ottenuti dai bambini nelle cinque scale di valutazione del BSID III; sono stati costruiti modelli separati per ciascuno dei punteggi composti delle cinque scale di valutazione considerate.

Dato che, sulla base del test di Shapiro-Wilk, la distribuzione delle concentrazioni di THg nei campioni biologici non era normale, la variabile THg è stata introdotta nei modelli di regressione lineare dopo trasformazione logaritmica. A titolo di analisi di sensibilità, sono comunque stati costruiti dei modelli contenenti la variabile THg non trasformata. Sono stati costruiti anche dei modelli di regressione lineare in cui la concentrazione di THg misurata nei campioni di capelli materni era stata categorizzata all'interno di quattro gruppi: <500, 500-999, 1000-1999,  $\geq$  2000 ng/g.

Mediante analisi di regressione lineare multipla sono state esaminate le misure di associazione tra Hg e neurosviluppo, includendo nel modello anche le possibili variabili confondenti in grado di influenzare lo sviluppo neurologico dei bambini. Quali variabili confondenti sono state considerate il consumo materno di pesce fresco, surgelato ed in scatola durante la gravidanza, la concentrazione dei PUFA's misurata nei campioni di siero materno prelevati durante la

gravidanza (LA, ALA, ARA, EPA, DPA, DHA), il sesso del bambino, il peso alla nascita, le settimane di gestazione, il QI materno, l'età della madre al momento del parto, il BMI materno prima della gravidanza, l'aumento di peso durante la gravidanza, lo stato civile delle madri al momento del parto, l'indice socio-economico (SES) (Bennet et al. 2007), la superficie della casa, il numero di adulti e bambini presenti in casa, il numero di sigarette fumate, il consumo di alcool durante la gravidanza, l'allattamento al seno (bambino allattato al seno, bambino non allattato al seno, allattamento esclusivo fino ai 4 mesi, allattamento fino ai 18 mesi), il consumo di pesce da parte del bambino fino ai 18 mesi, la frequenza all'asilo nido fino ai 18 mesi, il momento della giornata in cui il bambino è stato sottoposto al BSID III (mattina, pomeriggio-sera). Per quanto riguarda le concentrazioni dei PUFA's queste sono state incluse nei modelli come concentrazioni individuali dei singoli acidi grassi misurati (LA, ALA, ARA, EPA, DPA, DHA), come percentuale sulla concentrazione totale di acidi grassi misurata, come concentrazione di acidi grassi omega-3 (EPA, DPA, DHA e ALA) o come concentrazione di acidi grassi omega-6 (ARA e LA). Nei modelli contenenti la variabile sangue del cordone sono stati inclusi come possibili fattori confondenti anche le concentrazioni di Pb, Cd, As, Mn, Cu, Se e Zn misurate nei campioni di sangue del cordone analizzati.

Dato che la maggior parte delle covariate considerate sono state stimate sulla base del questionario lungo dettagliato e che quest'ultimo poteva essere incompleto, con lo scopo di evitare la perdita di potere statistico nell'analisi multivariata a causa dei valori mancanti, si è deciso di imputare i valori mancanti per alcune variabili, assumendo che questi fossero completamente casuali.

Tra tutte le variabili potenzialmente confondenti, sono state incluse nel modello finale solo quelle che nelle analisi bivariate sono risultate associate con almeno un BSID III con  $p < 0.10$ .

Sono state eseguite delle analisi stratificate per il sesso dei bambini con lo scopo di verificare se e come l'effetto del Hg fosse diverso tra maschi e femmine.

L'effetto di ciascuna variabile sui BSID III è stato presentato in termini di coefficienti beta, la cui significatività statistica è stata espressa in termini di valori di p. La bontà del modello in termini di variabilità dell'outcome spiegata è stata espressa attraverso l' $r^2$ .

Le elaborazioni statistiche sono state effettuate mediante il software SAS versione 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

In tutte le analisi statistiche è stato considerato un livello di significatività pari a  $P < 0.05$ .

## 6. Risultati

Il reclutamento della coorte è iniziato nell'aprile del 2007 e si è concluso nel marzo del 2009. Sono state arruolate 900 donne e di queste 767 (85%) risultavano ancora all'interno dello studio al momento del parto; a 632 bambini è stato somministrato il BSID III al raggiungimento del 18° mese di vita.

Le madri dei bambini persi al follow-up esibivano uno stato socio-economico (mediana 2.50 contro 2.75,  $p=0.0261$ ) ed un livello di QI (mediana 118 contro 125,  $p=0.0015$ ), significativamente più bassi rispetto alle madri dei bambini ancora all'interno dello studio; inoltre le madri dei bambini persi al follow-up erano meno frequentemente sposate (85.5% contro 90.4%) e più frequentemente separate (8.4% contro 3.3%,  $p=0.0371$ ) rispetto a quelle i cui bambini facevano ancora parte dello studio al compimento del 18° mese di vita; l'età al momento del parto (mediana 34 contro 33 anni,  $p=0.4374$ ) e lo stato occupazionale nei due gruppi di madri non differivano significativamente.

Dopo aver escluso tutti i bambini nati pretermine (<37 settimane di gestazione) e 3 bambini a cui il BSID III era stato somministrato dopo i 20 mesi di età, sono stati utilizzati per le analisi finali i dati relativi a 606 coppie mamma-bambino.

Le caratteristiche socio-demografiche delle 606 donne considerate nelle analisi definitive sono riportate in Tabella 3 (variabili continue) ed in Tabella 4 (variabili categoriche).

L'età media delle donne al momento del parto era di 33.3 anni e durante la gravidanza l'aumento di peso medio è stato di 13.3 kg. Il 92,9% delle donne considerate era di nazionalità Italiana, l'83.8% era stabilmente occupata ed il 77.4% viveva in una casa di proprietà. Il 48.3% delle donne considerate aveva un diploma di scuola superiore ed il 34.8% era laureata.

Le caratteristiche dei 606 bambini considerati nelle analisi definitive sono riportate in Tabella 5 (variabili continue) ed in Tabella 6 (variabili categoriche).

Sono stati esaminati 307 maschi (50.7%) e 299 femmine (49.3%); alla nascita i bambini presentavano un peso medio di 3419 g ed una lunghezza media di 50.14 cm.

**Tabella 3.** Caratteristiche socio-demografiche delle donne considerate nello studio (variabili continue).

Caratteristiche delle donne	N	Media	Mediana	DS
Età media (anni)	606	33.3	33	4.3
BMI medio prima della gravidanza (kg/m <sup>2</sup> )	606	23.3	22.2	14.5
Aumento di peso medio durante la gravidanza (kg)	606	13.3	13	4.2
Numero di sigarette fumate durante la gravidanza	606	144	0	560
Consumo settimanale di alcool durante la gravidanza (bicchieri)	606	1.6	0.3	3.3
Indice Socio-Economico della famiglia (SES)	606	2.6	2.7	0.9
Matrici Progressive di Raven	606	119.1	125	11

**Tabella 4.** Caratteristiche socio-demografiche delle donne considerate nello studio (variabili categoriche).

Caratteristiche delle donne	N	%
<b>Nazionalità</b>		
• Italiana	563	92.9
• Straniera	43	7.1
<b>Stato civile al momento del parto</b>		
• Sposata/convivente	541	89.3
• Separata/divorziata	20	3.3
• Single	38	6.3
• Non riportato	7	1.1
<b>Titolo di studio</b>		
• Non riferito	2	0.3
• Diploma elementare	5	0.8
• Diploma di scuola media	95	15.7
• Diploma di scuola superiore	293	48.3
• Laurea	211	34.8
		<i>Continua</i>

<b>Caratteristiche delle donne</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Situazione lavorativa</b>		
• Occupata	508	83.8
• Casalinga	48	7.9
• In cerca di lavoro	27	4.4
• Studentessa	6	1.0
• Licenziata	8	1.3
• Non riportato	9	1.5
<b>Casa di proprietà della famiglia</b>		
• Si	469	77.4
• No	130	21.4
• Non riportato	7	1.1
<b>Superficie della casa</b>		
• Meno di 50 m <sup>2</sup>	41	6.8
• Tra 50 e 100 m <sup>2</sup>	405	66.8
• Più di 100 m <sup>2</sup>	153	25.2
• Non riportato	7	1.1
<b>Numero di adulti che fanno parte della famiglia (inclusa la donna)</b>		
• 1-2	568	93.7
• >2	29	4.8
• Non riportato	9	1.5
<b>Numero di bambini che fanno parte della famiglia (incluso in nuovo nato)</b>		
• 1	339	55.9
• 2	200	33.0
• 3	39	6.4
• >3	11	1.8
• Non riportato	17	2.8
<b>Vive con fumatori</b>		
• Si	120	19.8
• No	486	80.2

**Tabella 5.** Caratteristiche dei bambini considerati nello studio (variabili continue).

<b>Caratteristiche dei bambini considerati nello studio</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Mediana</b>	<b>DS</b>
<b>Peso alla nascita (g)</b>	606	3419	3400	453
<b>Lunghezza alla nascita (cm)</b>	603	50.14	50	2.06

**Tabella 6.** Caratteristiche dei bambini considerati nello studio (variabili categoriche).

<b>Caratteristiche dei bambini considerati nello studio</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Sesso del bambino</b>		
Maschio	307	50.7
Femmina	299	49.3
<b>Epoca gestazionale al momento del parto (settimane)</b>		
37	33	5.4
38	94	15.5
39	163	26.9
40	166	27.4
41	119	19.6
42	31	5.1

La distribuzione delle concentrazioni di THg e di MeHg rilevate nei campioni biologici considerati è riportata in Tabella 7. Le concentrazioni sono espresse in ng/g.

Nel Grafico 1 è riportata la distribuzione di frequenza della concentrazione di THg nei campioni di capelli materni.

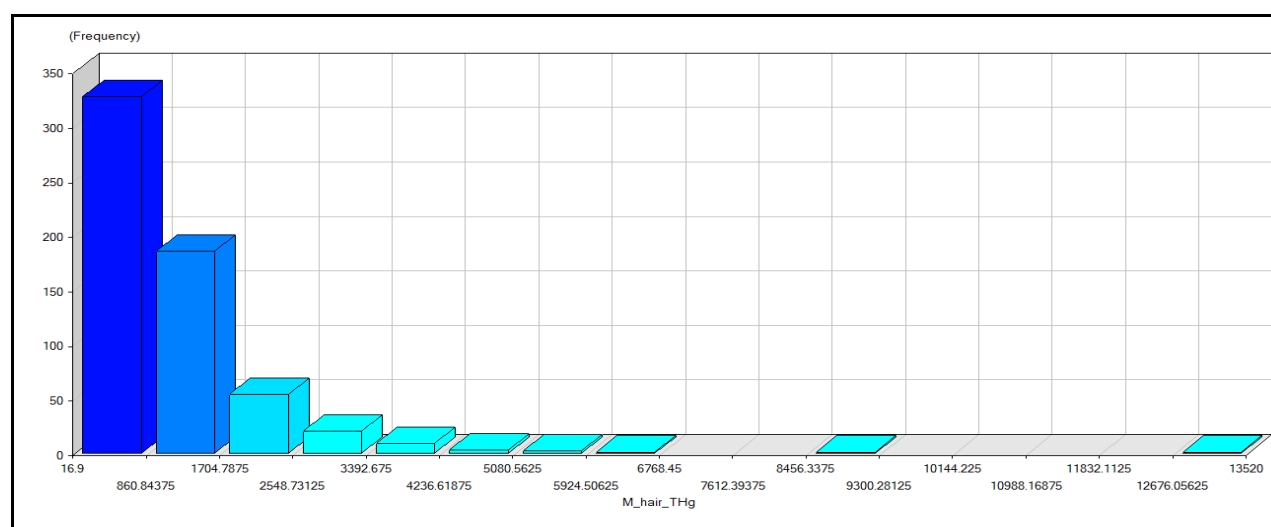
In Tabella 8 è riportata la matrice dei coefficienti di correlazione di Spearman tra le concentrazioni di THg e MeHg nei campioni di capelli, di sangue venoso, di sangue del cordone e di latte. Le correlazioni risultano quasi tutte statisticamente significative.

Le associazioni evidenziate nella matrice di correlazione di Spearman sono state riportate in forma grafica in Tabella 9.

**Tabella 7.** Distribuzione delle concentrazioni di THg e di MeHg rilevate nei campioni biologici considerati. Le concentrazioni sono espresse in ng/g.

Campione	N	Media	DS	25° perc	Mediana	75° perc	Minimo	Massimo
<b>Capelli materni</b>								
THg	604	1061	1028	481	788	1281	17	13520
MeHg	220	1674	1046	1114	1382	1885	356	10132
MeHg/THg (%)	220	0.89	0.16	0.84	0.99	1	0.16	1
<b>Sangue venoso materno</b>								
THg	606	3.14	3.44	1.18	2.35	3.98	0.05	39.60
MeHg	236	4.46	4.04	2.39	3.46	5.30	0.37	39.60
MeHg/THg (%)	236	0.88	0.19	0.81	0.99	1	0.33	1
<b>Urina materna</b>								
THg	589	1.11	1.51	0.29	0.71	1.40	0.01	18.61
<b>Sangue del cordone</b>								
THg	457	5.54	4.83	2.40	3.97	7.02	0.12	32.76
MeHg	169	7.71	6.06	3.97	6.07	9.63	1.20	54.80
MeHg/THg (%)	167	0.87	0.13	0.78	0.90	1	0.36	1
<b>Latte materno</b>								
THg	492	0.33	1.31	0.11	0.18	0.28	0	28.30
MeHg	182	0.17	0.15	0.07	0.14	0.23	0.01	1.09
MeHg/THg (%)	182	0.58	0.29	0.31	0.60	0.84	0.01	1

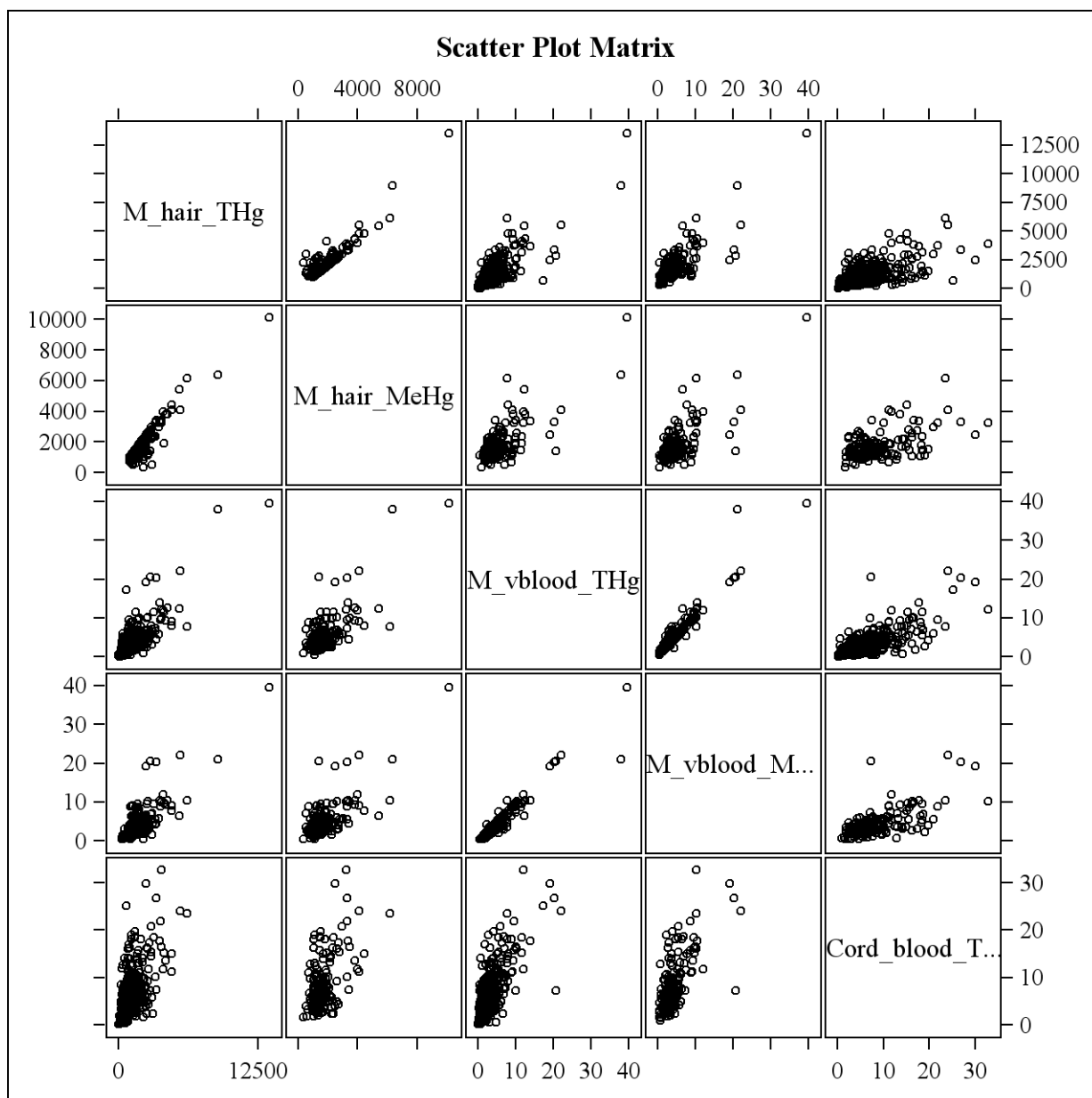
**Grafico 1.** Distribuzione di frequenza della concentrazione di THg nei campioni di capelli materni. Le concentrazioni sono espresse in ng/g.



**Tabella 8.** Matrice delle Correlazioni di Spearman tra le concentrazioni di THg e MeHg nei campioni di capelli, sangue venoso, sangue del cordone e latte.

Spearman Correlation Coefficients Prob >  r  under H0: Rho=0 Number of Observations								
	Capelli materni THg	Capelli materni MeHg	Sangue venoso THg	Sangue venoso MeHg	Sangue del cordone THg	Sangue del cordone MeHg	Latte THg	Latte MeHg
Capelli materni THg	1.00000 604	0.81325 <.0001 220	0.75370 <.0001 604	0.59033 <.0001 235	0.65128 <.0001 455	0.40680 <.0001 168	0.38781 <.0001 491	0.20428 0.0058 181
Capelli materni MeHg		1.00000 220	0.52305 <.0001 220	0.49162 <.0001 220	0.39246 <.0001 167	0.41917 <.0001 168	0.21289 0.0042 179	0.20336 0.0063 179
Sangue venoso THg			1.00000 606	0.91638 <.0001 236	0.69319 <.0001 457	0.61807 <.0001 169	0.47262 <.0001 492	0.40886 <.0001 182
Sangue venoso MeHg				1.00000 236	0.59834 <.0001 180	0.57927 <.0001 169	0.40424 <.0001 192	0.35852 <.0001 180
Sangue del cordone THg					1.00000 457	0.96887 <.0001 167	0.52607 <.0001 366	0.52938 <.0001 135
Sangue del cordone MeHg						1.00000 169	0.53397 <.0001 134	0.52648 <.0001 134
Latte THg							1.00000 492	0.67406 <.0001 182
Latte MeHg								1.00000 182

**Tabella 9.** Scatter plot relativi alle associazioni tra le concentrazioni di THg e MeHg nei campioni di capelli, sangue venoso, sangue del cordone e latte.



La distribuzione delle concentrazioni di PUFA's rilevate nei campioni di siero venoso materno è riportata in Tabella 10. Le concentrazioni sono espresse in mg/ml.

La distribuzione dei punteggi compositi ottenuti dai bambini considerati nelle cinque scale di valutazione del BSID III è riportata in Tabella 11.

**Tabella 10.** Distribuzione delle concentrazioni di PUFA's rilevate nei campioni di siero venoso materno. Le concentrazioni sono espresse in mg/ml.

PUFA's	N	Media	DS	25° perc	Mediana	75° perc	Minimo	Massimo
<b>OMEGA 3</b>								
C18:3 ALA	589	0.023	0.007	0.018	0.022	0.026	0.016	0.062
C20:5 EPA	589	0.039	0.035	0.024	0.026	0.034	0.018	0.200
C22:5 DPA	589	0.047	0.007	0.048	0.048	0.048	0.018	0.120
C22:6 DHA	589	0.045	0.029	0.018	0.036	0.064	0.014	0.152
Omega 3 Totali	589	0.154	0.054	0.114	0.136	0.176	0.072	0.406
<b>OMEGA 6</b>								
C18:2 LA	587	0.436	0.164	0.370	0.452	0.530	0.016	0.882
C20:4 ARA	589	0.114	0.053	0.078	0.116	0.154	0.018	0.304
Omega 6 Totali	587	0.551	0.183	0.462	0.564	0.658	0.036	1.066
Omega 6 Totali/ Omega 3 Totali	587	3.81	1.48	2.830	3.810	4.750	0.320	9.640

**Tabella 11.** Distribuzione dei punteggi compositi ottenuti dai bambini esaminati nelle cinque scale di valutazione del BSID III.

BSID III	N	Media	DS	25° perc	Mediana	75° perc	Minimo	Massimo
Scala Cognitiva	604	106.2	8.3	100	105	110	75	130
Scala del Linguaggio	604	97.7	8.7	91	97	103	47	121
Scala Motoria	604	101.4	6.0	97	100	107	67	115
Scala Socio-Emozionale	429	105.4	15.9	95	105	115	60	145
Scala del Comportamento Adattivo	426	101.8	12.8	93	101	111	62	136

Le donne considerate nelle analisi finali hanno riferito un consumo medio di pesce durante la gravidanza corrispondente a 1.06 porzioni a settimana (deviazione standard 0.99, mediana 0.92, range 0-6) considerando solamente il consumo di pesce fresco e surgelato, un consumo medio corrispondente a 1.69 porzioni a settimana (deviazione standard 1.30, mediana 1.38, range 0-7) considerando sia il consumo di pesce fresco e surgelato che il consumo di pesce in scatola ed un consumo medio corrispondente a 2,33 porzioni a settimana (deviazione standard 1.71, mediana 1.84, range 0-11) considerando il consumo di tutti i tipi di pesce (fresco, surgelato ed in scatola), di crostacei e di molluschi.

Le donne hanno riportato di consumare con maggior frequenza le seguenti specie di pesci: tonno (consumo medio: 0.64 volte a settimana, prevalentemente in scatola), branzino (0.34 volte a settimana, prevalentemente fresco e di provenienza locale), orata (0.32 volte a settimana, prevalentemente fresco e di provenienza locale), cheppia (0.21 volte a settimana, prevalentemente fresco e di provenienza locale), merluzzo (0.21 volte a settimana, prevalentemente congelato), trota/salmone (0.17 volte a settimana, prevalentemente fresco, di differenti provenienze), platessa (0.16 volte a settimana, prevalentemente congelato), sgombro (0.14 volte a settimana, prevalentemente fresco e di provenienza locale) e sogliola (0.13 volte a settimana, prevalentemente fresco, di differenti provenienze).

Il consumo di pesce riferito dalle donne è risultato moderatamente correlato con le concentrazioni di THg misurate nei capelli ( $r=0.34$ ,  $p<0.0001$ ), nel sangue venoso materno ( $r=0.33$ ,  $p<0.0001$ ) e nel sangue del cordone ( $r=0.42$ ,  $p<0.0001$ ); basse correlazioni sono state osservate anche tra il consumo di pesce e le concentrazioni di THg misurate nei campioni di latte ( $r=0.27$ ,  $p<0.0001$ ) e nei campioni di urine ( $r=0.13$ ,  $p=0.0020$ ).

Le specie di pesci che hanno mostrato le correlazioni più alte con le concentrazioni di THg misurate sia nei campioni di capelli che nei campioni sangue del cordone sono state il branzino ( $r=0.37$  e  $r=0.40$ ), l'orata ( $r=0.34$  e  $r=0.37$ ) e il pagello ( $r=0.31$  e  $r=0.29$ ) con tutti i valori di p-values  $<0.0001$ .

Il consumo di pesce riferito ha mostrato basse correlazioni anche con le concentrazioni di DHA rilevate all'interno dei campioni di siero materno ( $r=0.08$ ,  $p=0.0569$ ) e con la percentuale di DHA sulla concentrazione totale di PUFA's misurata ( $r=0.09$ ,  $p=0.0298$ ). Non sono emerse altre correlazioni significative tra il consumo di pesce riportato dalle donne e le concentrazioni di PUFA's misurate durante la gravidanza.

Le misure di associazione grezze ed aggiustate tra i punteggi compositi ottenuti dai bambini nelle cinque scale di valutazione del BSID III ed il logaritmo della concentrazione di THg

misurata nei capelli materni e nel sangue del cordone sono mostrate in Tabella 12. Il modello statistico numero 1 riporta le misure di associazione grezze; il modello statistico numero 2 riporta le misure di associazione aggiustate per il consumo di pesce riferito dalle donne durante la gravidanza; il modello statistico numero 3 riporta le misure di associazione aggiustate per la concentrazione totale di PUFA's e per le percentuali di LA, di ALA, di ARA, di EPA, di DPA e di DHA sulla concentrazione totale di PUFA's misurata. Il modello statistico numero 4 riporta le misure di associazione aggiustate per il consumo di pesce materno, per la concentrazione totale di PUFA's e per le percentuali di LA, di ALA, di ARA, di EPA, di DPA e di DHA sulla concentrazione totale di PUFA's misurata, per il sesso dei bambini, per il peso alla nascita, per il QI materno, per l'aumento di peso durante la gravidanza, per lo stato civile delle madri al momento del parto, per l'indice socio-economico (SES), per il numero di bambini presenti in casa, per il consumo di alcool in gravidanza, per l'allattamento al seno, per il consumo di pesce da parte del bambino fino ai 18 mesi e per la frequenza all'asilo nido fino ai 18 mesi.

Non sono emerse associazioni inverse statisticamente significative tra le concentrazioni di Hg misurate nei campioni di capelli e di sangue del cordone ed i punteggi compositi ottenuti dai bambini al BSID III; l'unica associazione positiva e significativa rilevata, tra la concentrazione di Hg misurata nei campioni di capelli e nel sangue del cordone ed il punteggio composito relativo alla Scala del Linguaggio, non è rimasta tale in seguito all'aggiustamento per i potenziali fattori confondenti.

Le concentrazioni di THg misurate nei campioni di sangue venoso, di urina e di latte non hanno mostrato associazioni significative con i punteggi compositi relativi alla Scala Cognitiva, del Linguaggio, Motoria e del Comportamento Adattivo (dati non mostrati).

Non sono emerse associazioni statisticamente significative tra la concentrazione di THg misurata nei campioni di capelli ed i punteggi ottenuti al BSID III nemmeno dopo categorizzazione dei valori di concentrazione di THg. Il verso e la forza delle associazioni rilevate tra la concentrazione di THg misurata nei campioni di capelli ed i punteggi ottenuti al BSID III non sono cambiati in seguito all'utilizzo nel modello di analisi della variabile THg non trasformata. I risultati sono rimasti pressochè invariati anche dopo aver escluso dal modello di analisi le tre donne aventi una concentrazione di THg nei capelli >6000 ng/g (dati non mostrati).

**Tabella 12.** Misure di associazione grezze ed aggiustate tra i punteggi compositi ottenuti dai bambini nelle cinque scale di valutazione del BSID III ed il logaritmo della concentrazione di THg (ng/g) misurata nei capelli materni e nel sangue del cordone.

	Modello 1		Modello 2		Modello 3		Modello 4	
	beta	P	beta	p	beta	p	beta	P
<b>Punteggio composito Scala Cognitiva</b>								
<b>Ln [THg] capelli materni</b>	0.4447	0.2945	0.3952	0.3816	0.3735	0.4015	-0.0022	0.9967
	N=602		N=602		N=585		N=505	
	R <sup>2</sup> <0.01		R <sup>2</sup> <0.02		R <sup>2</sup> =0.01		R <sup>2</sup> =0.08	
<b>Ln [THg] sangue del cordone</b>	0.5198	0.2268	0.4577	0.3301	0.5898	0.1880	0.0518	0.9232
	N=455		N=455		N=446		N=378	
	R <sup>2</sup> <0.01		R <sup>2</sup> <0.01		R <sup>2</sup> =0.02		R <sup>2</sup> =0.10	
<b>Punteggio composito Scala del Linguaggio</b>								
<b>Ln [THg] capelli materni</b>	1.2389	0.0051	1.0551	0.0249	1.2995	0.0052	0.8464	0.1055
	N=602		N=602		N=585		N=505	
	R <sup>2</sup> =0.01		R <sup>2</sup> =0.01		R <sup>2</sup> =0.02		R <sup>2</sup> =0.17	
<b>Ln [THg] sangue del cordone</b>	0.8298	0.0733	0.6359	0.2084	0.9484	0.0502	0.4142	0.4556
	N=455		N=455		N=446		N=378	
	R <sup>2</sup> =0.01		R <sup>2</sup> =0.01		R <sup>2</sup> =0.02		R <sup>2</sup> =0.19	
<b>Punteggio composito Scala Motoria</b>								
<b>Ln [THg] capelli materni</b>	-0.2161	0.4852	-0.2895	0.3753	-0.3804	0.2351	-0.1875	0.6160
	N=602		N=602		N=585		N=505	
	R <sup>2</sup> <0.01		R <sup>2</sup> <0.01		R <sup>2</sup> =0.01		R <sup>2</sup> =0.08	
<b>Ln [THg] sangue del cordone</b>	-0.0818	0.7926	-0.1815	0.5933	-0.0605	0.8527	0.1557	0.6844
	N=455		N=455		N=446		N=378	
	R <sup>2</sup> <0.01		R <sup>2</sup> <0.01		R <sup>2</sup> =0.01		R <sup>2</sup> =0.12	
<b>Punteggio composito Scala Socio- Emozionale</b>								
<b>Ln [THg] capelli materni</b>	1.5852	0.0867	0.9209	0.3493	1.800	0.0645	1.7727	0.1119
	N=427		N=427		N=416		N=362	
	R <sup>2</sup> <0.01		R <sup>2</sup> =0.01		R <sup>2</sup> =0.02		R <sup>2</sup> =0.15	
<b>Ln [THg] sangue del cordone</b>	0.4978	0.6026	-0.5574	0.5976	0.4637	0.6484	-0.0711	0.9523
	N=322		N=322		N=317		N=271	
	R <sup>2</sup> <0.01		R <sup>2</sup> =0.02		R <sup>2</sup> =0.01		R <sup>2</sup> =0.19	

*Continua*

	Modello 1		Modello 2		Modello 3		Modello 4	
	beta	P	beta	p	beta	p	beta	P
<b>Punteggio composito Scala del Comportamento Adattivo</b>								
<b>Ln [THg] capelli materni</b>	1.4698	0.0646	0.9254	0.2708	1.5504	0.0586	0.5460	0.5556
	N=424		N=424		N=414		N=362	
	R <sup>2</sup> =0.01		R <sup>2</sup> =0.02		R <sup>2</sup> =0.02		R <sup>2</sup> =0.13	
<b>Ln [THg] sangue del cordone</b>	0.5763	0.4840	-0.2051	0.8215	0.6007	0.4768	-0.5684	0.5659
	N=317		N=317		N=313		N=271	
	R <sup>2</sup> <0.01		R <sup>2</sup> =0.01		R <sup>2</sup> =0.02		R <sup>2</sup> =0.16	

**Modello 1:** misure di associazione grezze.

**Modello 2:** misure di associazione aggiustate per il consumo di pesce riferito dalle donne durante la gravidanza.

**Modello 3:** misure di associazione aggiustate per la concentrazione totale di PUFA's e per le percentuali di LA, di ALA, di ARA, di EPA, di DPA e di DHA sulla concentrazione totale di PUFA's misurata.

**Modello 4:** misure di associazione aggiustate per il consumo di pesce materno, per la concentrazione di PUFA's, per il sesso dei bambini, per il peso alla nascita, per il QI materno, per l'aumento di peso durante la gravidanza, per lo stato civile delle madri al momento del parto, per l'indice socio-economico (SES), per il numero di bambini presenti in casa, per il consumo di alcool in gravidanza, per l'allattamento al seno, per il consumo di pesce da parte del bambino fino ai 18 mesi e per la frequenza all'asilo nido fino ai 18 mesi.

Considerando il sottocampione della coorte per il quale erano disponibili i valori di concentrazione di MeHg, l'analisi univariata ha rilevato la presenza di associazioni positive statisticamente significative tra la concentrazione di MeHg misurata nei campioni di capelli e nel sangue del cordone ed il punteggio composito ottenuto nella Scala Cognitiva (rispettivamente  $\beta=2.6685$ ,  $p=0.02870$  e  $\beta=2.317$ ,  $p=0.0135$ ); dopo aggiustamento per i potenziali fattori confondenti queste associazioni non sono rimaste significative (dati non mostrati).

Dalle analisi stratificate per il sesso dei bambini sono emerse associazioni statisticamente significative solo tra il logaritmo della concentrazione di THg nei capelli materni ed il punteggio composito relativo alla Scala del Linguaggio tra le bambine ( $\beta=1.5291$ ,  $p=0.0445$ ); non sono emerse associazioni tra i bambini (dati non mostrati).

Relativamente ai possibili effetti sullo sviluppo neurologico dei bambini legati al consumo di pesce materno durante la gravidanza (numero di porzioni di pesce consumate settimanalmente), nel modello di analisi univariata sono state osservate delle associazioni positive statisticamente significative tra il consumo di pesce riferito dalle donne ed i punteggi compositi ottenuti dai bambini nella Scala del Linguaggio ( $\beta=0.5426$ ,  $p=0.0447$ ), nella Scala Socio-Emozionale ( $\beta=1.4589$ ,  $p=0.0134$ ) e nella Scala del Comportamento Adattivo ( $\beta=1.1384$ ,  $p=0.0150$ ). Nel modello statistico aggiustato per tutti i potenziali fattori di confondimento l'associazione con il punteggio composito della Scala del Linguaggio non è rimasta significativa mentre l'associazione con il punteggio composito della Scala Socio-Emozionale è rimasta significativa nel modello statistico contenente la concentrazione di THg misurata nel sangue del cordone ( $\beta=1.8425$ ,  $p=0.0284$ ).

Il modello di analisi univariata non ha evidenziato associazioni tra i punteggi compositi ottenuti al BSID III e la concentrazione di PUFA's misurata nei campioni di siero materno, con l'eccezione di un'unica associazione positiva al limite della significatività tra la percentuale di ALA ed il punteggio composito relativo alla Scala Cognitiva ( $\beta=1.6551$ ,  $p=0.0681$ ), il cui verso e la cui forza sono rimasti invariati anche nel modello aggiustato per tutti i potenziali fattori confondenti ( $\beta=1.4084$  e  $p=0.1685$  nel modello statistico contenente la concentrazione di THg misurata nei campioni di capelli;  $\beta=1.6232$  e  $p=0.1186$  nel modello statistico contenente la concentrazione di THg misurata nel sangue del cordone).

Nel modello aggiustato per tutti i possibili fattori confondenti è stata evidenziata un'associazione positiva tra il punteggio composito relativo alla Scala del Linguaggio e le

concentrazioni di THg misurate nei capelli e nel sangue del cordone (rispettivamente  $\beta=1.5894$ ,  $p=0.1193$  e  $\beta=1.4689$ ,  $p=0.2288$ ).

In Tabella 13 viene mostrato come, quando le concentrazioni di PUFA's vengono incluse nel modello statistico come concentrazioni assolute, nessuna delle associazioni rilevate raggiunge la significatività statistica.

Un'associazione inversa è emersa tra il rapporto PUFA's omega-6 totali/PUFA's omega-3 totali ed il punteggio composito ottenuto nella Scala del Linguaggio ( $p=0.0707$ ).

Nelle analisi stratificate per il sesso dei bambini non sono emerse differenze significative tra i maschi e le femmine.

Dal modello statistico multivariato il QI materno è risultato consistentemente associato con i punteggi compositi ottenuti dai bambini nelle scale di valutazione Cognitiva, del Linguaggio, Motoria e Socio-Emozionale ( $\beta=0.0710$ ,  $0.0696$ ,  $0.0524$  e  $0.1891$  rispettivamente, con valori di  $p=0.0527$ ,  $0.0569$ ,  $0.0450$  e  $0.0219$  rispettivamente). Non sono emerse associazioni significative con il punteggio composito relativo alla Scala del Comportamento Adattivo ( $\beta=-0.0082$ ,  $p=0.9010$ ).

Le bambine hanno ottenuto punteggi migliori rispetto ai bambini nella Scala Cognitiva ( $\beta=1.3999$ ,  $p=0.0628$ ), nella Scala del Linguaggio ( $\beta=4.7544$ ,  $p<0.0001$ ), nella Scala Socio-Emozionale ( $\beta=6.8962$ ,  $p<0.0001$ ) e nella Scala del Comportamento Adattivo ( $\beta=5.4241$ ,  $p<0.0001$ ); le differenze tra maschi e femmine relativamente al punteggio composito della Scala Motoria non erano significative ( $\beta=0.7158$ ,  $p=0.1819$ ).

La durata del consumo di pesce fresco da parte dei bambini è risultata associata positivamente con i punteggi compositi ottenuti nella Scala Cognitiva ( $\beta=0.2002$ ,  $p=0.0346$ ) e nella Scala del Comportamento Adattivo ( $\beta=0.5041$ ,  $p=0.0037$ ); non sono emerse associazioni con i punteggi ottenuti nella Scala del Linguaggio ( $\beta=0.0944$ ,  $p=0.3168$ ), nella Scala Motoria ( $\beta=-0.0007$ ,  $p=0.9913$ ) e nella Scala Socio-Emozionale ( $\beta=0.3281$ ,  $p=0.1327$ ).

**Tabella 13.** Misure di associazione aggiustate tra i punteggi compositi ottenuti dai bambini nelle cinque scale di valutazione del BSID III e le concentrazioni assolute di PUFA's (mg/ml) misurate nei campioni di siero venoso materno durante la gravidanza.

BSID III	Punteggio composito Scala Cognitiva			Punteggio composito Scala del Linguaggio			Punteggio composito Scala Motoria			Punteggio composito Scala Socio-Emozionale			Punteggio composito Scala del Comportamento Adattivo		
	Modello 1	Modello 2	Modello 3	Modello 1	Modello 2	Modello 3	Modello 1	Modello 2	Modello 3	Modello 1	Modello 2	Modello 3	Modello 1	Modello 2	Modello 3
	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)	beta (p)
<b>Omega 3</b>															
<b>C18:3 ALA</b>	56.8287 (0.3533)	-	-	76.7142 (0.2095)	-	-	-25.6522 (0.5565)	-	-	22.3358 (0.8719)	-	-	-99.1767 (0.3547)	-	-
<b>C20:5 EPA</b>	0.0734 (0.9946)	-	-	8.9996 (0.4064)	-	-	-7.9093 (0.3069)	-	-	-0.2595 (0.9917)	-	-	17.5969 (0.3781)	-	-
<b>C22:5 DPA</b>	-58.2675 (0.2780)	-	-	-19.5536 (0.7152)	-	-	-46.7118 (0.2224)	-	-	-44.9412 (0.1820)	-	-	-36.2873 (0.6129)	-	-
<b>C22:6 DHA</b>	10.6137 (0.4935)	-	-	12.1836 (0.4310)	-	-	7.2911 (0.5092)	-	-	-45.4528 (0.1820)	-	-	31.0207 (0.2562)	-	-
<b>Omega 3 totali</b>	-	3.0549 (0.6607)	-	-	10.1456 (0.1441)	-	-	-4.1162 (0.4064)	-	-	-18.1834 (0.2460)	-	-	13.0968 (0.3022)	-
<b>Omega 6</b>															
<b>C18:2 LA</b>	0.9615 (0.6896)	-	-	-3.2557 (0.1759)	-	-	0.9968 (0.5613)	-	-	-6.9937 (0.2053)	-	-	-1.4397 (0.7427)	-	-
<b>C20:4 ARA</b>	0.5338 (0.9497)	-	-	-5.7276 (0.2095)	-	-	1.5919 (0.7917)	-	-	3.0915 (0.8708)	-	-	-16.2127 (0.2914)	-	-
<b>Omega 6 totali</b>	-	1.6888 (0.4245)	-	-	-2.8919 (0.1705)	-	-	1.3348 (0.3755)	-	-	-7.2464 (0.1278)	-	-	-3.7132 (0.3288)	-
<b>Omega 6 totali/ Omega 3 totali</b>	-	-	0.0574 (0.8174)	-	-	-0.4481 (0.0707)	-	-	0.0892 (0.6143)	-	-	-0.3306 (0.5492)	-	-	-0.5027 (0.1698)

**Modello 1:** Modello di regressione lineare contenente le concentrazioni di ALA, EPA, DPA, DHA, LA e ARA (mg/ml), il logaritmo della concentrazione di THg nei campioni di capelli materni (ng/g), il consumo di pesce materno, il sesso dei bambini, il peso dei bambini alla nascita, il QI materno, l'aumento di peso durante la gravidanza, lo stato civile delle madri al momento del parto, l'indice socio-economico (SES), il numero di bambini presenti in casa, il consumo di alcool in gravidanza, l'allattamento al seno, il consumo di pesce da parte del bambino fino ai 18 mesi e la frequenza all'asilo nido fino ai 18 mesi.

**Modello 2:** Modello di regressione lineare contenente le concentrazioni di PUFA's omega 3 e omega 6 e le altre variabili sopra elencate.

**Modello 3:** Modello di regressione lineare contenente il rapporto PUFA's omega-6 totali/PUFA's omega-3 totali e le altre variabili sopra elencate.

## 7. Discussione

Nello studio di coorte oggetto del presente dottorato il consumo di pesce da parte delle donne in gravidanza è stato moderato (in media 1.69 porzioni a settimana), molto più basso rispetto al consumo di pesce riferito dalle donne arruolate nello studio di coorte delle Seychelles (12 pasti a base di pesce a settimana) (Myers et al. 2007).

Anche le concentrazioni di Hg misurate nei campioni biologici delle mamme e dei bambini considerati nello studio sono risultate piuttosto basse (concentrazione media di THg nei capelli materni pari a 1061 ng/g, con dieci soggetti aventi concentrazioni di THg >4000 ng/g e tre soggetti aventi concentrazioni di THg >6000 ng/g), tanto che nell'ambito di valori di concentrazione così moderati non esistono evidenze che l'esposizione prenatale al Hg attraverso l'alimentazione materna possa determinare effetti avversi sullo sviluppo neurologico dei bambini.

Le concentrazioni di THg misurate nei capelli materni sono risultate associate con le concentrazioni di THg misurate nei campioni di sangue venoso ( $r=0.75$ ,  $p<0.0001$ ); le associazioni rilevate tra il THg misurato nel sangue venoso e il THg misurato nel sangue del cordone ( $r=0.69$ ,  $p<0.0001$ ) e le associazioni rilevate tra le concentrazioni di THg nei capelli materni e il THg misurato nel sangue del cordone ( $r=0.65$ ;  $p<0.0001$ ) sono risultate moderate ma statisticamente significative.

In questo studio le concentrazioni di MeHg sono state misurate solamente su un sottocampione della coorte, selezionato tra le donne che avevano presentato le concentrazioni di THg più elevate nei campioni di capelli. Il MeHg è un composto fortemente tossico e biodisponibile e una volta assorbito dai produttori primari tende a bioaccumularsi nel passaggio attraverso la catena alimentare acquatica concentrandosi nei tessuti dei consumatori all'apice della catena stessa. I grandi pesci carnivori costituiscono la fonte più importante di introduzione di MeHg nell'organismo umano. Questo biomarker risulta essere la più appropriata misura di esposizione tra gli individui la cui dieta comprenda anche il consumo di pesce e per i quali si possano escludere esposizioni occupazionali o ambientali alla forma inorganica ed elementare del Hg come nel nostro caso. Come previsto le associazioni rilevate tra le concentrazioni di THg e MeHg misurate nei campioni di capelli, sangue venoso e sangue del cordone sono state tutte elevate e altamente significative (capelli:  $r=0.81$ ,  $p<0.0001$ ; sangue venoso:  $r=0.92$ ,  $p<0.0001$ ; sangue del cordone:  $r=0.97$ ,  $p<0.0001$ ). L'associazione rilevata tra le concentrazioni di THg e MeHg misurate nei campioni di latte è stata moderata ma significativa ( $r=0.67$ ,  $p<0.0001$ ).

Nelle donne per le quali erano disponibili le misure di concentrazione del MeHg, il rapporto MeHg/THg è stato molto elevato (mediana pari a 0.99 nei campioni di capelli e nei campioni di sangue venoso e a 0.90 nei campioni di sangue del cordone). Questo ci fa ritenere che nelle donne della nostra coorte la maggior parte del Hg fosse presente nella forma metilata e che la concentrazione di THg possa essere considerata una buona variabile proxy per stimare la concentrazione di MeHg. Solamente nei campioni di latte il rapporto MeHg/THg è stato più basso (mediana pari a 0.60); questo è dovuto al fatto che il MeHg viene escreto solo in minima quantità nel latte materno. Infatti sia il MeHg che il IHg vengono trasportati dal plasma al latte legati alle albumine sieriche e il IHg anche legato alle caseine (Sundberg et al. 1999). L'escrezione del Hg nel latte è inoltre influenzata dalla concentrazione nel plasma materno: circa il 65% del IHg e solo il 10% del MeHg contenuti nel sangue intero si trovano nel plasma e sono quindi disponibili all'escrezione nel latte (Kershaw et al. 1980).

Relativamente ai campioni biologici considerati per la determinazione della concentrazione di Hg, tutte le correlazioni tra le concentrazioni di THg ed i punteggi compositi ottenuti dai bambini nelle cinque scale di valutazione del BSID III, sono risultate non significative in seguito all'aggiustamento per i diversi potenziali fattori confondenti considerati; è stata rilevata un'unica associazione positiva al limite della significatività con il punteggio della Scala Socio-Emozionale, che risultava solo quando venivano considerate le concentrazioni di THg nei campioni di capelli materni e nel sangue del cordone mentre non risultava quando venivano considerate le concentrazioni di THg nei campioni di sangue venoso, di urina e di latte.

Nella nostra coorte le associazioni tra i punteggi ottenuti dai bambini al BSID III e le concentrazioni di MeHg misurate nei campioni biologici sono state calcolate solamente per un ristretto gruppo di soggetti, non per forza rappresentativi dell'intera coorte. I risultati ottenuti sono stati in linea con quelli ottenuti considerando l'intera coorte ed utilizzando le misure di concentrazione di THg e non hanno rilevato effetti avversi del Hg sul neurosviluppo dei bambini.

Tralasciando i risultati relativi al punteggio composito della Scala Socio-Emozionale comunque la coerenza dei risultati ottenuti con i diversi campioni biologici considerati indica che essi non sono correlati alla scelta del mezzo di valutazione dell'esposizione;

Nello studio di coorte delle Seychelles una possibile spiegazione all'inconsistenza delle associazioni rilevate tra l'esposizione al MeHg attraverso il consumo di pesce e lo sviluppo neurologico dei bambini fu il confondimento residuo dovuto alla presenza di alcune variabili che non vennero prese in considerazione nel corso dello studio, molto probabilmente alcuni fattori nutrizionali presenti nel pesce (Myers et al. 2007). Nel nostro studio abbiamo rilevato delle

variazioni estremamente piccole tra la stima grezza degli effetti delle concentrazioni di THg sui punteggi ottenuti al BSID III e la stima aggiustata sulla base del consumo di pesce riferito dalle donne e delle concentrazioni di PUFA's misurate nei campioni di siero venoso materno durante la gravidanza. Tutto ciò suggerisce che nella nostra popolazione, caratterizzata da un moderato consumo di pesce, gli effetti del Hg sul neurosviluppo non sono stati nascosti o alterati dallo stato nutrizionale.

Dal modello statistico aggiustato per tutti i potenziali fattori confondenti non è emersa alcuna associazione tra il consumo di pesce riferito dalle donne ed il neurosviluppo dei bambini, mentre è emersa un'associazione molto bassa tra il consumo di pesce e le concentrazioni di PUFA's misurate nei campioni di siero venoso materno durante la gravidanza. Alla base di questi risultati ci possono essere motivi diversi: i consumi di pesce durante la gravidanza possono essere stati riportati nei questionari in maniera imprecisa; possono essere stati commessi degli errori nella stima del numero di porzioni di pesce consumate settimanalmente sulla base delle categorie di frequenza di consumo presenti nei questionari; il pesce reperibile sul mercato dell'area di studio potrebbe non aver contenuto grandi concentrazioni di PUFA's e di altri nutrienti benefici oppure il consumo di pesce da parte delle donne considerate nella nostra coorte potrebbe essere stato così basso da non costituire la principale fonte di PUFA's.

L'accumulo di Pufa's nei tessuti fetali aumenta esponenzialmente con il progredire della gravidanza; in particolare, durante le ultime dieci settimane di gestazione, si assiste ad un trasferimento selettivo da parte della placenta di alcuni tra i più importanti PUFA's soprattutto ARA e DHA e diversi studi hanno evidenziato come nel sangue del cordone siano misurabili concentrazioni di DHA superiori rispetto a quelle misurabili nel sangue materno (Haggarty 2010; Larquè et al. 2011). Il DHA è indispensabile per la crescita del feto che durante l'ultimo trimestre di gravidanza è in grado di incamerare fino a 67 mg di DHA al giorno.<sup>17</sup> Diversi studi hanno inoltre dimostrato come a un'insufficiente disponibilità fetale di DHA possano corrispondere disturbi nervosi, psicomotori e dello sviluppo cognitivo nella prima infanzia. (14-16).

Questo conferma l'importanza di un adeguato apporto di DHA al feto, che, nell'impossibilità di sintetizzarlo autonomamente, ne viene dotato in misura congrua grazie all'amplificazione del trasporto da parte della placenta. Questo trasferimento selettivo da parte della placenta, i cui meccanismi non sono ancora stati del tutto chiariti, potrebbe essere alla base delle differenze rilevate tra le distribuzioni di PUFA's nel sangue materno e nell'alimentazione delle donne arruolate (Haggarty 2010). Ulteriori studi e la misurazione delle concentrazioni di PUFA's nei pesci reperibili nell'area di studio ci permetteranno di chiarire maggiormente i risultati ottenuti.

Al contrario di quello che ci aspettavamo, le concentrazioni di PUFA's misurate nel siero materno durante la gravidanza sono risultate solo lievemente associate al neurosviluppo dei bambini; associazioni al limite della significatività sono state rilevate tra le concentrazioni di ALA (associazione positiva) e il rapporto PUFA's omega 3 totali/PUFA's omega 6 totali (associazione inversa) ed il punteggio composito relativo alla Scala del Linguaggio.

Nello studio di coorte delle Seychelles era stata rilevata un'associazione inversa tra il rapporto PUFA's omega 3 totali/PUFA's omega 6 totali e l'indice di sviluppo psicomotorio del BSID II; nella coorte delle Seychelles inoltre non era stata rilevata alcuna associazione tra la concentrazione di PUFA's e l'indice di sviluppo mentale del BSID II mentre era stata evidenziata un'associazione positiva tra l'indice di sviluppo psicomotorio e la concentrazione di PUFA's omega 3 all'età di 9 e 30 mesi (Stokes-Riner et al. 2010; Strain et al. 2008).

Nel nostro studio lo sviluppo neurologico dei bambini è stato valutato all'età di 18 mesi tuttavia è possibile che gli effetti benefici dei PUFA's trasferiti dalla madre al feto attraverso la placenta siano transitori ed altre fonti di PUFA's possano diventare importanti man mano che il bambino cresce. Quest'ipotesi potrebbe spiegare il motivo per cui abbiamo trovato solamente una lieve associazione tra le concentrazioni di PUFA's ed il neurosviluppo dei bambini.

Negli ultimi anni sono stati effettuati diversi studi per valutare se la supplementazione di PUFA's al latte artificiale oppure alle donne che stanno allattando sia in grado di migliorare lo sviluppo neurocognitivo dei bambini nati a termine; i risultati di questi studi non hanno portato a risultati univoci (Simmer et al. 2008; Delgado-Noguera et al. 2010). Nella nostra coorte la durata del consumo di pesce da parte dei bambini è risultata essere maggiormente associata ai punteggi ottenuti dai bambini nella Scala Cognitiva del BSID III rispetto alle sostanze nutrienti ricevute durante la vita intrauterina.

Un'altra possibile ragione alla base della mancanza di associazione tra la concentrazione di PUFA's nei campioni materni e lo sviluppo neurologico dei bambini potrebbe essere che, nelle ultime settimane di gestazione in corrispondenza del massimo accumulo di grassi nei tessuti fetali, i depositi di grasso materni sono in grado di assicurare al feto un bilanciato ed adeguato apporto di PUFA's specifici (soprattutto DHA e ARA). In questo modo il feto viene protetto da eventuali carenze della dieta materna durante la gravidanza e indipendentemente dalla composizione di PUFA's presente nel sangue della madre gli viene garantito il corretto apporto di nutrienti essenziali. I PUFA's immagazzinati nel tessuto adiposo fetale costituiranno un'importante riserva durante i primi mesi di vita postnatale (Haggarty 2010).

Delle numerose variabili addizionali considerate in questo studio, solamente poche sono risultate associate con i punteggi ottenuti dai bambini al BSID III. Il QI materno è risultato strettamente associato ai punteggi ottenuti dai bambini nelle scale di valutazione Cognitiva, del Linguaggio e Motoria mentre il consumo di pesce fresco da parte dei bambini è risultato associato ad un migliore sviluppo cognitivo. Come già visto in altri studi, le bambine hanno ottenuto migliori punteggi rispetto ai bambini relativamente alla Scala del Linguaggio (Auestand et al. 2003; Reilly et al. 2010).

Il livello di neurosviluppo dei bambini della nostra coorte inoltre è risultato più elevato relativamente all'ambito cognitivo rispetto a quello del linguaggio. Questo potrebbe dipendere dal fatto che il BSID III è stato validato su una popolazione di bambini statunitensi in cui lo sviluppo del linguaggio potrebbe avere dei tempi differenti.

In questo studio siamo stati in grado di controllare solo parzialmente i possibili fattori confondenti legati all'ambiente sociale dei bambini. Nella nostra coorte infatti l'ambiente domestico e gli stimoli ricevuti dai bambini nel contesto familiare sono ancora in corso di valutazione attraverso l'AIRE, uno strumento di esame dell'ambiente familiare, elaborato da Capotorti et al. (1987) basato sul modello della Home (Home Observation for Measurement of the Environment) (Frankeburg and Coons 1986). Quando la valutazione sarà completata, includendo nelle analisi anche queste importanti informazioni relative all'ambiente domestico, saremo in grado di ridurre la quantità di confondimento residuo e di comprendere maggiormente l'ampia variabilità rilevata nei punteggi ottenuti dai bambini al BSID III. Nonostante il grande numero di potenziali fattori confondenti inseriti nei modelli di analisi considerati infatti siamo stati in grado di spiegare solamente una piccola fetta della variabilità rilevata nei punteggi ottenuti dai bambini; tutto ciò indica che lo sviluppo neurologico dei bambini nella nostra società è un processo estremamente articolato ed influenzato da un gran numero di variabili.

In questo studio è stata considerata l'esposizione prenatale a diversi elementi oltre al Hg; tuttavia non è stata considerata l'esposizione ai PCB's attraverso il consumo di pesce e di altri alimenti. La determinazione delle concentrazioni di PCB's nei campioni biologici di un sottocampione della nostra coorte e nei pesci reperibili nell'area di studio ci permetteranno di chiarire se l'esposizione a questi contaminanti possa costituire un rischio per la popolazione in esame.

Infine, il nostro studio ha identificato alcuni fattori in grado di influenzare lo sviluppo neurologico dei bambini, ad esempio il QI materno. Tuttavia, potrebbe essere che il nostro studio non avesse sufficiente potere statistico per rivelare gli effetti del Hg nel caso questi fossero molto

leggeri. La nostra coorte italiana infatti è nata come parte integrante di un ampio studio di coorte internazionale coinvolgente quattro diversi paesi del Mediterraneo e la numerosità del campione di soggetti da arruolare per raggiungere una potenza statistica tale da rivelare effetti del Hg anche modesti era stata calcolata sull'insieme dei quattro paesi partecipanti.

## 8. Conclusioni

Nella coorte analizzata l'esposizione prenatale al Hg è stata bassa e nell'ambito di valori di concentrazione così moderati non sono stati evidenziati effetti avversi sullo sviluppo neurologico dei bambini esaminati. In questo studio di coorte il QI materno, il sesso dei bambini ed il consumo di pesce da parte dei bambini fino ai 18 mesi sono risultati essere i principali fattori in grado di influenzare i risultati ottenuti dai bambini al BSID III, sottolineando in questo modo l'importanza e l'influenza dell'ambiente familiare sul neurosviluppo.

Come sottolineato da Tamburlini e Barbone (2007), per garantire l'effettiva promozione dello sviluppo neurologico dei bambini, è necessario che tutti gli studi effettuati in questo ambito abbiano un approccio multidimensionale e prendano in considerazione tutti i fattori potenzialmente in grado di influenzare lo sviluppo neurologico e psicologico dei bambini.

Nella nostra coorte ulteriori analisi, compresa l'acquisizione di maggiori e dettagliate informazioni relative ad altri aspetti della vita dei soggetti esaminati, quali ad esempio l'ambiente sociale domestico e gli stimoli ricevuti dai bambini nel contesto familiare, contribuiranno a spiegare una maggiore proporzione della variabilità rilevata nei punteggi ottenuti al BSID III e ci permetteranno di comprendere meglio il neurosviluppo nella nostra popolazione.

## 9. Bibliografia

Agah H., Leermarkers M., Elskens M., Fatemi S. M. F. and Baeyens W. 2007. Total mercury and methylmercury concentrations in fish from the Persian Gulf and the caspian sea. *Water, Air & Soil Pollution* 181: 95-105.

Akagi H. 1997. Analytical method for evaluating human exposure to mercury due to gold mining. In: *Proceedings of the international workshop on health and environmental effects of mercury due to mining operations*, Manila: National Institute for Minamata Disease: 131-141.

Alberg G., Ekman L., Falk R., Greitz U., Persson G. and Snibs J. 1969. Metabolism of methylmercury (203 Hg) compounds in man. *Archives of Environmental Health* 19: 478.

Allen J.W.; Shanker G., Tan K.H., Aschner M. 2002. The consequences of methylmercury exposure on interactive functions between astrocytes and neurons. *Neurotoxicology* 6: 755-759.

Amin-Zaki L., Elhassani S., Majeed M.A., Clarkson T.W., Doherty R.A., Greenwood M. 1974. Intra-uterine methylmercury poisoning in Iraq. *Pediatrics* 54: 587-595.

Andre J.M., Boudou A., Ribeyre F., Bernhard M. (1991): Comparative study of mercury accumulation in dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from French Atlantic and Mediterranean coasts. *The Science of the Total Environment* 104:191-209.

Aschner M., Clarkson T.W. 1989. Methylmercury uptake across bovine brain capillary endothelial-cells in vitro-the role of amino-acids. *Pharmacology and Toxicology* 64: 293-9.

Aschner M. 1996. Astrocytes as modulators of mercury induced neurotoxicity. *Neurotoxicology* 17: 663-669.

Aschner M., Yao C.P., Allen J.W., Tan K.H. 2000. Methylmercury alters glutamate transports in astrocytes. *Neurochemistry International* 37: 199-206.

Aschner M. 2002. Neurotoxic mechanisms of fish-borne methylmercury. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 12: 101-104.

Aschner M., Syversen T., Souza D.O., Rocha J.B.T., Farina M. 2007. Involvement of glutamate and reactive oxygen species in methylmercury neurotoxicity. *Brazilian Journal of Medical Biology* 40: 285-291.

Ask Björnberg K., Vahter M., Berglund B., Niklasson B., Blennow M., Sandborgh-Englund G. 2005. Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-fed infant. *Environmental Health Perspectives* 113: 1381-1385.

Auestad N., Scott D.T., Janowsky J.S., Jacobsen C., Carroll R.E., Montalto M.B., Halter R., Qiu W., Jacobs J.R., Connor W.E., Connor S.L., Taylor J.A., Neuringer M., Fitzgerald K.M., Hall R.T. 2003. Visual, cognitive, and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. *Pediatrics* 112: 177-183.

Bakir F., Damluji S.F., Amin-Zaki L., Murtadha M., Khalidi A., Al-Rawi N.Y., Tikriti S., Dhahir H.I., Clarkson T.W., Smith J.C., Doherty R.A. 1973. Methyl mercury poisoning in Iraq. *Science* 181: 230-241.

Baldi F., Renzoni A. and Bernhard M. 1978. Mercury concentration in pelagic fishes (anchovy, mackerel and sardine) from the Italian coast Strait of Gibiltera. *Journ. Etud. Pollut. CIESM* 4: 251-254.

Baldi, F., Bargagli, R., Focardi, S., Fossi, C., 1983. Mercury and chlorinated hydrocarbons in sediments from the bay of Naples and adjacent marine areas. *Marine Pollution Bulletin* 14: 108-111.

Baldi F., Filippelli M., Olson G.J. 1989. Biotransformation of mercury by bacteria from a river collecting cinnabar mine waters. *Microbial Ecology* 17: 263-274.

Barany E., Bergdal I.A., Schutz A., Skerfving S., Oskarsson A. 1997. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Direct Multi-element Analysis of Diluted Human Blood and Serum. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 12: 1005-1009.

Barbone F., Valent F., Pisa F., Daris F., Fajon V., Gibicar D., Logar M., Horvat M. 2004. Prenatal low level methyl mercury exposure and child development in an Italian coastal area. *Seychelles Medical & Dental Journal* 7: 149-154.

Barghigiani C., Ristori T., Lopez Arenas J. 1996. Mercury in marine sediment from a contaminated area of the northern Tyrrhenian Sea: <20  $\mu\text{m}$  grain-size fraction and total sample analysis. *The Science of the Total Environment* 192: 63-73.

Bellanger T.M., Caesar E.M. and Trachtman L. 2000. Blood mercury levels and fish consumption in Louisiana. *Journal of the Louisiana State Medical Journal* 152: 64-73.

Bayley N. 2006. Bayley Scales of Infant and Toddler Development, Terza edizione. San Antonio, TX: The Psychological Corporation.

Berlin M. and Gibson S. 1963. Renal uptake, excretion and retention of mercury. A study in the rabbit during infusion of mercuric chloride. *Archives of Environmental Health* 6: 617-625.

Berlin M., Fazackerley J. and Nordberg G. 1969. The uptake of mercury in the brains of mammals exposed to mercury vapor and to mercuric salts. *Archives of Environmental Health* 18: 719-729.

Bernhard M. 1988. Mercury in the Mediterranean. UNEP Regional Seas Reports and Studies No. 98, UNEP.

Bernhard M., Renzoni A. 1977. Mercury concentration in Mediterranean marine organisms and their environment: natural or anthropogenic origin. *Thalassia jugoslavica*. 13: 265-300.

Bernhard M., Andreae, M. O. (1984). Transport of trace metals in marine food chains. In: Nriagu, J. O. (ed.). *Changing metal cycles and human health*. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag, Berlin, pp. 143-168.

Bernhard M., Buffoni G. and Renzoni A. 1982. Mercury in Mediterranean tuna. Why is their level higher than in Atlantic tuna? *Thalassia jugoslavica* 18: 231-243.

Bernhard M. 1988. Mercury in the Mediterranean. UNEP Regional Seas Reports and Studies No. 98, UNEP.

Bernhard M. 1985. Mercury accumulation in a pelagic food chain. In *Environmental inorganic chemistry*, ed A. E. Matertell and K. J. Irgolic, Deer eld Beach, VCH Publishers, Florida, pp. 349-358.

Bernhard M. and Renzoni A. 1977. Mercury concentration in Mediterranean marine organisms and their environment: natural or anthropogenic origin. *Thalassia jugoslavica* 13: 265-300.

Bernhard M. and Andreae M.O. 1984. Transport of trace metals in marine food chains. In: Nriagu, J. O. (ed.). *Changing metal cycles and human health*. Dahlem Konferenzen. Springer-Verlag, Berlin, pp. 143-168.

Bernhard, M., Buffoni, G., 1982. Mercury in the Mediterranean, an overview. In: *Proceedings of the International Conference on Environmental Pollution 1981*. University of Thessaloniki, pp. 458-484.

Beijer K. and Jernelov A. 1987. Ecological aspects of mercury-selenium interactions in the marine environment. *Environmental Health Perspectives* 25: 43-45.

Biester H., Gosar M., Covelli S. 2000. Mercury speciation in sediments affected by dumped minino residues in the drainage area of the Idrija mercury mine, Slovenia. *Environmental Science & Technology* 34: 3330-3336.

Bjornberg K.A., Vahter M., Berglund B., Niklasson B., Blennow M., Sandborgh-Englund G. 2005. Transport of methylmercury and inorganic mercury to the fetus and breast-fed infant. *Children's Health* 113: 1381-1385.

Brambati A. 1997. Metalli pesanti nelle lagune di Marano e Grado. Piano di studi finalizzato all'accertamento di sostanze persistenti nelle Lagune di Marano e Grado ed al loro risanamento. (RFVG) Direzione Regionale dell'Ambiente, Servizio dell'Idraulica, Trieste, p.175.

Budtz-Jorgensen E., Keideing N., Grandjean P., White R.F. 1999. Methylmercury neurotoxicity independent of PCB exposure. *Environmental Health Perspectives* 107: 236-237.

Byers T. 2001. Food frequency dietary assessment: how bad is good enough? *American Journal of Epidemiology* 154: 1087-1088.

Byrne A.R., Skreblin M., Falnoga I., Al-Sabti K., Horvat M. 1995. Mercury and selenium: perspectives from Idrija. *Acta Chimica Slovenica* 42: 175-198.

Camargo, J.A., 2002. Contribution of Spanish–American silver mines (1570–1820) to the present high mercury concentrations in the global environment: a review. *Chemosphere* 48: 51-57.

Capotorti F., Siglienti L., Battaini A., Di Tullio F., Rosenholtz E., Vecerova S., Molinari G., Carelli E., Foderini N., Sabbatini P. 1987. La valutazione dell'ambiente familiare negli studi longitudinali di sviluppo infantile. *Medico e Bambino* 9: 16-23.

Carpi A., Lindberg S.E. 1997. Sunlight-Mediated Emission of Elemental Mercury from Soil Amended with Municipal Sewage Sludge. *Environmental Science & Technology* 31: 2085-2091.

Castoldi A.F., Barni S., Turin I., Gandini C., Manzo L. 2000. Early acute necrosis delayed apoptosis and cytoskeletal breakdown in cultured cerebellar granule neurons exposed to methylmercury. *Journal of Neuroscience Research* 59: 775-787.

Castoldi A.F., Coccini T., Beccatelli S., Manzo L. 2001. Neurotoxicity and molecular effects of methylmercury. *Brain Research Bulletin* 55: 197-203.

Chicourel E.L., Sakuma A.M., Zenebon O., Tenuta Filho A. 2001. Inefficacy of cooking methods on mercury reduction from shark. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion* 51: 288-292.

Choi C.M., Lapham L.W., Amin-Zaki L., Saleem T. 1978. Abnormal neuronal migration, deranged cerebral cortical organization and diffuse white matter astrocytosis of human fetal brain: A major effect of methylmercury poisoning in utero. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 37: 719-732.

Choi B.H. 1989. The effects of methylmercury on the developing brain. *Progress in Neurobiology* 32: 447-470.

Cinquina A.L., Moriconi M., Cozzani R 1995. Mercurio nei prodotti ittici della costa laziale rispetto alle nuove disposizioni di legge (D.M. 9.12.1993). Atti S.I.S.Vet. XLIX. Salsomaggiore Terme, pp. 505-506.

Clarkson T.W., Gatzky J. and Dalton C. 1961. Studies on the equilibration of mercury vapor with blood. Atomic Energy Commission Research and Development Report, UR Report No 582.

Clarkson T.W. 1989. Mercury. *Journal of the American College of Toxicology* 8: 1291-1296.

Clarkson T. W. 1992. Mercury, major issues in environmental health. *Environmental Health Perspectives* 100: 31-38.

Clarkson T.W. 1994. The toxicology of mercury and its compounds. In: Watras C.J. and Huckabee J.W. *Mercury pollution: Integration and synthesis*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, USA, pp. 631-640.

Clarkson T.W. 1995. Environmental contaminants in the food chain. *The American Journal of Clinical Nutrition* 61: 682-686.

Clarkson T.W. 1997. The toxicology of mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 34: 369-403.

Clarkson T.W., Magos L., Myers G.J. 2003. The toxicology of mercury-current exposures and clinical manifestations. *The New England Journal of Medicine* 349: 1731-1737.

Clarkson T.W. and Strain J.J. 2004. Methylmercury: loaves versus fishes. *Seychelles Medical and Dental Journal* 7: 61-66.

Compeau G. and Bartha R. 1984. Methylation and demethylation of mercury under controlled red-ox, pH, and salinity conditions. *Applied Environmental Microbiology* 48: 1203-1207.

Compeau G. and Bartha R. 1985. Sulfate-reducing bacteria: principal methylators of mercury in anoxic estuarine sediment. *Applied Environmental Microbiology* 50: 498-502.

Compeau G. and Bartha R. 1987. Effect of salinity on mercury-methylating activity of sulfate-reducing bacteria in estuarine sediments. *Applied Environmental Microbiology* 53: 261-265.

Conquery M., Cossa D. 1995. Mercury speciation in surface waters of the North Sea. *Netherlands Journal of Sea Research* 34: 245-257.

Conquery M., Cossa D., Martin J-M. 1995. The distribution of dissolved and particulate mercury in three Siberian estuaries and adjacent costal waters. *Water, Air Soil & Pollution* 80: 653-664.

Cossa D., Martin J-M., sanjuan J. 1994. Dimethylmercury formation in the Alboran Sea. *Marine Pollution bulletin* 28: 381-384.

Cossa D. 1995. Poissons au mercure: une spécialité redoutable. *La Recherche* 277, Juin, 26: 688-689.

Cossa D., Coquery M., Gobeil C., Martin J-M. 1996. Mercury fluxes at the ocean margins. In Baeyens W., Ebinghaus R., Vasiliev O. Editors. *Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances*. Netherlands. Kluwer Academic Publishers, pp. 229-247.

Cossa D., Averty B., Pirrone N. 2009. The origin of methylmercury in open Mediterranean waters. *Limnology and Oceanography* 54: 837–844.

Covelli S. 1998. Ciclo biogeochimico del mercurio nei sedimenti del Golfo di Trieste. Tesi di Dottorato in Scienze Ambientali, Università di Trieste, pp. 170.

Covelli S., Faganeli J., Horvat M., Bramati A. 1999. Porewater Distribution and Benthic Flux Measurements of Mercury and Methylmercury in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 48: 415-428.

Covelli S., Faganelli J., Horvat M., Bramati A. 2001. Mercury contamination of coastal sediments as the result of long-term cinnabar mining activity (Gulf of Trieste, northern Adriatic sea). *Applied Geochemistry* 16: 541-558.

Covelli S., Piani R., Faganeli J., Bramati A., 2004. Circulation and suspended matter distribution in a microtidal deltaic system: the Isonzo river mouth (northern Adriatic Sea). *Journal of Coastal Research* 41: 130–140.

Covelli S., Faganeli J., De Vittor C., Predonzani S., Acquavita A., Horvat M. 2008. Benthic fluxes of mercury species in a lagoon environment (Grado Lagoon, Northern Adriatic Sea, Italy). *Applied Geochemistry* 23: 529-546.

Covelli S., Emili A., Acquavita A., Koron N., Faganeli J. 2011. Benthic biogeochemical cycling of mercury in two contaminated northern Adriatic coastal lagoons. *Continental Shelf Research* 31: 1777-1789.

Cox C., Clarkson T.W., Marsh D.O., Amin-Zaki L., Tikriti S. and Myers G.G. 1989. Dose-response analysis of infants prenatally exposed to methyl mercury: an application of a single compartment model to single-strand hair analysis. *Environmental Research* 49: 318-332.

Craig P. J. and Moreton P. A. 1986. Total mercury, methylmercury and sulfide levels in British estuarine sediments III. *Water Research* 20: 1111-1118.

Cuvin-Aralar M.L. and Furness R.W. 1991. Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21: 348-364.

Daniels J.L., Longnecker M.P., Rowland A.S., Golding J. ALSPAC Study Team. 2004. Fish intake during pregnancy and early cognitive development of offspring. *Epidemiology* 15: 394-402.

Daris F., Piani C., Mattassi G., Brisotto R. 1993. Distribuzione del mercurio in sedimenti e prodotti ittici delle Lagune di Grado e Marano. Reg. Aut. Friuli Venezia Giulia (Ed.), Atti del Convegno: Il Mercurio nelle lagune di Grado e Marano. *Aspetti Igienico-Sanitari*: 24-45.

Davidson P.W., Myers G.J., Cox C., Shamlaye C., Choisy O., Sloane-Reeves J., Cernichiari E., Marsh D.O., Berlin M., Tanner M. 1995. Neurodevelopmental test selection, administration, and performance in the main Seychelles child development study. *Neurotoxicology* 16: 665-676.

Davidson P.W., Myers G.J., Cox C., Axtell C., Shamlaye C., Sloane-Reeves J., Cernichiari E., Needham L., Choi A., Wang Y., Berlin M., Clarkson T.W. 1998. Effects of prenatal and postnatal methylmercury exposure from fish consumption on neurodevelopment: outcomes at 66 months of age in the Seychelles Child Development Study. *The Journal of the American Medical Association* 280: 701-707.

Davidson P.W., Palumbo D., Myers G.J., Cox C., Shamlaye C.F., Sloane-Reeves J. 2000. Neurodevelopmental outcomes of Seychellois children from the pilot cohort at 108 months following prenatal exposure to methylmercury from a maternal fish diet. *Environmental Research* 84: 1-11.

Davidson P.W., Gary J., Myers M.D. and Weiss B. 2004. Mercury Exposure and Child Development Outcomes. *Pediatrics* 113: 1023-1029.

Davidson P.W., Sloane-Reeves J., Myers G.J., Hansen O.N., Huang L.S., Georger L.A. 2008. Association between prenatal exposure to methylmercury and visuospatial ability at 10.7 years in the Seychelles child development study. *Neurotoxicology* 29: 453-459.

Davis L.E., Kornfeld M., Mooney H.S., Fiedler K.J., Haaland K.Y., Orrison W.W., Cernichiari E., Clarkson T.W. 1994. Methylmercury poisoning: long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family. *Annals of Neurology* 35: 680-688.

Debes F., Budtz-Jørgensen E., Weihe P., White R.F., Grandjean P. 2006. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicology and Teratology* 28: 536-547.

Delgado-Noguera M.F., Calvache J.A., Bonfill Cosp X. 2010. Supplementation with long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) to breastfeeding mothers for improving child growth and development. *Cochrane Database Syst Rev* 12: CD007901.

Di Leonardo R., Tranchida G., Bellanca A., Neri R., Angelone M., Mazzola S. 2006. Mercury levels in sediments of central Mediterranean Sea: A 150+ year record from box-cores recovered in the Strait of Sicily. *Chemosphere* 65: 2366-2376.

EFSA (European Food Safety Authority) 2004. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food. Request N° EFSA-Q-2003-030. Adopted on 24 February 2004. *The EFSA Journal* 34: 1-4.

EFSA (European Food Safety Authority) 2008. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to mercury and methylmercury in food. Request N°EFSA-Q-2003-030. *The EFSA Journal* 654: 1-74.

Emili A., Koron N., Covelli S., Faganeli J., Acquavita A., Predonzani S., De Vittor C. 2011. Does anoxia affect mercury cycling at the sediment–water interface in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea)? Incubation experiments using benthic flux chambers. *Applied Geochemistry* 26: 194-204.

EPA 1997. Mercury study report to congress. Vol. I: Executive Summary. EPA-452/R-97-003. U.S. Environmental Protection Agency, Office of Air quality Planning and Standards, and Office of Research and Development.

EPA 2003. Fact Sheet. Update: National Listing of Fish and Wildlife Advisories. Washington, D.C.: Office of Water. EPA 540-R-01-005.

EPA. 1998. Method 7473. Mercury in solids and solutions by thermal decomposition amalgamation and atomic absorption spectrometry.

Eto K., Oyanagi S., Itai Y., Tokunaga H., Takizawa Y., Suda I. 1992. A fetal type of Minamata Disease: an autopsy case report with special reference to the nervous system. *Molecular and Chemical Neuropathology* 16: 171-186.

Faganeli J., Horvat M., Covelli S., Fajon V., Logar M., Lipej L., Cermelj B. 2003. Mercury and methylmercury in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea). *Science of the Total Environment* 304: 315-326.

Falnoga I., Tusek- Znidric M., Horvat M., Stegnar P. 2000. Mercury, selenium and cadmium in human autopsy samples from Idrija residents and mercury mine workers. *Environmental Research* 84: 211-218.

Farhana Z., Shamim R., Soghra H. and Rizwan K. 2005. Low dose mercury toxicity, human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20: 351-360.

Ferrara F. and Funari E. 2004. Rischio chimico associato alla qualità dell'acqua del Mar Adriatico, Rapporti ISTISAN 04/4; Rapporto finale delle attività finanziate dal progetto MURST/CNR "PRISMA2".

Ferrara F., Funari E. 1999. Stato dell'arte sulla contaminazione chimica dei prodotti ittici del mare Adriatico e stima del rischio per la popolazione residente lungo la costa italiana. Roma: Istituto Superiore di Sanità: 1999. (Rapporti ISTISAN 99/16).

Ferrara R., Maserti B.E. 1992. Mercury concentration in the water, particulate matter, plankton and sediment of the Adriatic Sea. *Marine Chemistry* 38: 237-249.

Ferrara R., Maserti B.E., Andersson M., Edner H., Ragnarson P., Svanberg S. 1997. Mercury degassing rate in some Mediterranean areas. *Water, Air & Soil Pollution* 93: 59-66.

Ferrara R., Mazzolai B., Lanzillotta E., Nucaro E., Pirrone, N. 2000. Temporal trends in gaseous mercury evasion from the Mediterranean Seawaters. *Science of the Total Environment* 259: 183-190.

Fitzgerald W.F. and Clarkson T.W. 1991. Mercury and Monomethylmercury: Present and Future Concerns. *Environmental research* 109: 355-367.

Fitzgerald W. F., Mason, R. P. and Vandal G. M. 1991. Atmospheric cycling and air-water exchange of mercury over mid-continental lacustrine regions. *Water, Air & Soil Pollution Journal* 56: 745-768.

Fitzgerald W.F. 1993. Mercury as a global pollutant. *The World & I Journal* October: 192-198.

Fitzgerald W.F. and Clarkson T.W. 1991. Mercury and monomethylmercury: present and future concern. *Environmental Health Perspectives* 96: 159-166.

Fitzgerald, W.F., Lamborg, C.H., 2005. Geochemistry of mercury in the environment. In: Lollar, B.S. (Ed.), *Environmental Geochemistry*. Elsevier-Pergamon, Oxford, pp. 107-148.

Folch J., Lees M., Sloane Stanley G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry* 226: 497-509.

Frankeburg W.K., Coons C.E. 1986. Home screening Questionnaire: Its validity in assessing home environment. *Journal of Pediatrics* 108: 624-626.

Geijerstam E., Sandborgh-Englund G., Jonsson F., Ekstrand J. 2001. Mercury uptake and kinetics after ingestion of dental amalgam. *Journal of Dental Research* 80: 1793-1796.

Ghidini S., G. Delbono e G. Campanili. 2000. Livelli ed evoluzione di cadmio, mercurio ed arsenico nei pesci dell'Alto Adriatico. Istituto di Scienza e Tecnologia degli Alimenti. Annali della Facolta' di Medicina Veterinaria, Universita' di Parma, Vol. 20 pp. 201-217.

Gibicar D, Horvat M, Nakou S, Sarafidou J, Yager J. 2006. Pilot study of intrauterine exposure to methylmercury in Eastern Aegean islands, Greece. *Science of the Total Environment* 367: 586-595.

Gibicar D., Horvat M., Logar M., Fajon V., Falnoga I., Ferrara R., Lanzillotta E., Ceccarini C., Mazzolai B., Denby B., Pacyna J. 2009. Human exposure to mercury in the vicinity of chlor-alkali plant. *Environmental Research* 109: 355-367.

Gilmour C.C. and Henry E.A. 1991. Mercury methylation in aquatic systems affected by acid deposition. *Environmental Pollution* 71:131-169.

Gilmour C.C., Henry E.A., Mitchell R. 1992. Sulfate stimulation of mercury methylation in freshwater sediments. *Environmental Science and Technology* 26: 2281-2287.

Gochfeld M. 2003. Cases of mercury exposure, bio-availability, and absorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 174-179.

Gosar M., Pirc S. and Bidovec M. 1997. Mercury in the Idrijca River sediments as a reflection of mining and smelting activities of the Idrica mercury mine. *Journal of Geochemical Exploration* 58: 125-131.

Grandjean P., Nielsen G.D., Jørgensen P.J.; Horder M. 1992. Reference intervals for trace elements in blood: significance of risk factors. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 52: 321-337.

Grandjean P. and Weihe P. 1993. Neurobehavioral effects of intrauterine mercury exposure: potential sources of bias. *Environmental Research* 61: 176-183.

Grandjean P., Jørgensen P.J., Weihe P. 1994. Human milk as a source of methylmercury exposure in infants. *Environmental Health Perspectives* 102: 74-77.

Grandjean P., Weihe P., Needham L.L., Burse V.W., Patterson D.G. Jr, Sampson E.J., Jørgensen P.J., Vahter M. 1995 a. Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic, and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk. *Environmental Research* 71: 29-38.

Grandjean P., Weihe P. and White R.F. 1995 b. Milestone development in infants exposed to methylmercury from human milk. *Neurotoxicology* 16: 27-33.

Grandjean P., Weihe P., White R.F., Debes F., Araki S., Murata K., Sørensen N., Dahl D., Yokoyama K., Jørgensen P.J. 1997. Cognitive deficit in 7-year-old children with prenatal exposure to methylmercury. *Neurotoxicology and Teratology* 19: 417-428.

Grandjean P., Bjerve K.S., Weihe P., Steuerwald U. 2001. Birthweight in a fishing community: significance of essential fatty acids and marine food contaminants. *International Journal of Epidemiology* 30: 1272-1278.

Grandjean P., White R.F., Weihe P., Jørgensen P.J. 2003. Neurotoxic risk caused by stable and variable exposure to methylmercury from seafood. *Ambulatory Pediatrics* 3: 18-23.

Grigal D.F. 2002. Inputs and outputs of mercury from terrestrial watersheds: a review. *Environmental Reviews* 10: 1-39.

Haggarty P. 2010. Fatty acid supply to the human fetus. *The Annual Review of Nutrition* 30: 237-255.

Halbach S. and Clarkson T.W. 1978. Enzymatic oxidation of mercury vapour by erythrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 523: 522–531

Harada M. 1995. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology* 25: 1-24.

Hedgecock I. M., Pirrone N., Trunfio G.A., Sprovieri F. 2006. Integrated mercury cycling, transport, and air-water exchange (MECAWEx) model. *Journal of Geophysical Research* 111, D20302, doi: 10.1029/2006JD 007117.

Hibbeln J.R., Davis J.M., Steer C., Emmett P., Rogers I., Williams C., et al. 2007. Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study. *Lancet* 369: 578-585.

Hightower J. M. and Moore D. 2003. Mercury levels in high-end consumers of fish. *Environmental Health Perspectives* 111: 604–608.

Honda S., Hylander L., Sakamoto M. 2006. Recent advances in Evaluation of Health Effects on Mercury with Special Reference to Methylmercury – A Minireview. *Environmental Health and preventive Medicine* 11: 171-176.

Hornung H. 1986. Assessment of mercury pollution in coastal marine sediments and in benthic organism. In “FAO/UNEP/WHO/IOC/IAEA Meeting of the Biogeochemical Cycle of Mercury in the Mediterranean”, FAO Fish Report N° 325 (Suppl.), pp 104-110. Rome Italy.

Hornung H., Krom M.D., Cohen Y., Bernhard M. 1993. Trace metal content in deep-water sharks from the eastern Mediterranean Sea. *Marine Biology* 115: 331-338.

Horvat M., May K., Stoeppler M., Byrne A.R. 1988. Comparative studies of methylmercury in biological and environmental samples. *Applied Organometallic Chemistry* 2: 515-524.

Horvat M., Byrne A.R., May K. 1990. A modified method for the determination of methylmercury by gas chromatography. *Talanta* 37: 207-212.

Horvat M., Liang L., Bloom N.S. 1993. Comparison of Distillation with other current isolation methods for the determination of methyl mercury compounds in low level environmental samples, Part 2: Water. *Analytica Chimica Acta* 282: 153-168.

Horvat M. 1996. Mercury speciation and analysis. In Baeyens W., Ebinghaus R., Vasiliev O. editors. *Global and regional mercury cycles: sources, fluxes and mass balances*. Netherlands. Kluwer Academic Publishers, 1996: 1-31.

Horvat M., Covelli S., Faganeli J., Logar M., Mandic V., Rajar R., Sirca A., Zagar D. 1999. Mercury in contaminated coastal environment; A case study: The Gulf of Trieste. *Science of the Total Environment* 237/238: 43-56.

Hribernik I. 1950. Our observations of professional mercury intoxications in Idrija (1946-1950). *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 1: 291-299.

Hudson R.J.M., Gherini S.A., Watras C.J., and Porcella D.B. 1994. Modeling the biogeochemical cycling of mercury in lakes: the mercury cycling model (MCM) and its application to MTL study lakes, In *Mercury Pollution, Integration and Synthesis*, Ed. By C.J. Watras and J.W. Huckabee, CRC Press, pp 473-523.

Hursh J.B., Clarkson T.W., Cherian M.G., Vostal J.J. and Vander Malie R. 1976. Clearance of Mercury Vapor (Hg-197, Hg-203) Inhaled by Human Subjects. *Archives of Environmental Health* 3: 302-309.

Hursh J.B., Clarkson T.W., Miles E.F., Goldsmith L.A. 1989. Percutaneous absorption of mercury vapor by man. *Archives of Environmental Health* 44: 120-127.

Hylander L.D. and Meili M. 2003. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Science of the Total Environment* 304: 13-27.

Ikingura J.R., Akagi H. 1999. Methylmercury production and distribution in aquatic systems. *Science of the Total Environment* 234: 109-18.

Igata A. 1993. Epidemiological and clinical features of Minamata disease. *Environmental Research*. 63:157-169.

IPCS (1991) *Inorganic mercury*. Geneva, World Health Organization International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 118).

- Jensen S. and Jernelov A. 1969. Biological methylation of mercury in aquatic organisms. *Nature (London)* 223: 753-754.
- Kaufmann P., Scheffen I. 1998. Placental development. In: *Fetal and Neonatal Physiology*, Vol 1; 2nd ed. Philadelphia, PA:W.B. Saunders, 59–70.
- Kajiwara, Y., Yasutake, A., Adachi, T., Hirayama, K., 1996. Methylmercury transport across the placenta via neutral amino acid carrier. *Archives of Toxicology* 70: 310-314.
- Kerper L.E., Ballatori .N, Clarkson T.W. 1992. Methylmercury cross the blood-brain by an amino acid carrier. *American Journal of Physiology* 262: 761-765.
- Kershaw T.G., Dhahir P.H., Clarkson T.W. 1980. The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man. *Archives of Environmental Health* 35: 28-36
- Khayat A. and Dencker L. 1982. Fetal uptake and distribution of metallic mercury vapor in the mouse: influence of ethanol and aminotriazole. *International Journal of Biological Research in Pregnancy* 38-46.
- Kjellstrom T., Kennedy P., Wallis S., Mantell C. 1986. Physical and Mental Development of Children with Prenatal Exposure to Mercury from Fish. Stage I: Preliminary Tests at Age 4. Report 3080. Solna, Sweden National Swedish Environmental Agency.
- Kjellstrom T., Kennedy P., Wallis S., Stewart A., Friberg L., Lind B. 1989. Physical and Mental Development of Children with Prenatal Exposure to Mercury from Fish. Stage II: Interviews and Psychological Tests at Age 6. Report 3642. Solna, Sweden National Swedish Environmental Protection Board.
- Kobal Grum D., Kobal A.B., Arneric N., Horvat M., Zenko B., Dzeroski S. 2006. Personality traits in miners with past occupational elemental mercury exposure. *Environmental Health Perspectives* 114: 290-296-
- Koletzko B., Lien E., Agostoni C., Böhles H., Campoy C., Cetin I., et al. 2008. World Association of Perinatal Medicine Dietary Guidelines Working Group. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *Journal of Perinatal Medicine* 36: 5-14.
- Kotnik J., Horvat M. and Dizdarevic T. 2005. Current and past mercury distribution in air over the Idrija Hg mine region, Slovenia. *Atmospheric Environment* 39: 7570-7579.
- Kurland L.T., Faro S. N., Siedler H. 1959. Minamata disease: The outbreak of a neurologic disorder in Minamata, Japan, and its relationship to the ingestion of seafood contaminated by mercuric compound. *World Neurology* 1: 370-395.

Larquè E., Demmelmair H., Gil-Sanchez A., Prieto-Sanchez M.T., Blanco J.E., Pagan A., Faber F.L., Zamora S., Parilla J.J., Koletzko B. 2011. Placental transfer of fatty acids and fetal implications. *American Journal of Clinical Nutrition* 94: 1908-1913.

Lewin G.A., Schachter H.M., Yuen D., Merchant P., Mamaladze V., Tsertsvadze A. 2005. Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ). Effects of omega-3 fatty acids on child and maternal health. *Evidence Report/Technology Assessment* 118: 1-11.

Liang L., Horvat M., Bloom N.S. 1994. An improved method for speciation of mercury by aqueous phase ethylation, room temperature precollection, GC separation and CV AFS detection. *Talanta* 3: 371-379.

Mahaffey K.R. 2004. Fish and shellfish as dietary sources of methylmercury and the omega-3 fatty acids. Eicosahexaenoic acid and docosahexaenoic acid: risks and benefits. *Environmental Research* 95: 414-428.

Magalhaes M.C., Costa V., Mebezes G.M., Pinho M.R., Santos R.S., Monteiro L.R. 2007. Intra- and inter-specific variability in total and methylmercury bioaccumulation by eight marine fish species from the Azores. *Marine Pollution Bulletin* 54: 1654-1662.

Mahafey R.K., Rice G.E., Schoeny R. 1997. Mercury study report to congress, vol IV: characterisation of human health and wildlife risk from mercury exposure in the United States (EPA-452 R-97-009), Washington DC.

Marszalek J.R. and Lodish H.F. 2005. Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21: 633-657.

Mason R.P. and Fitzgerald W.F. 1990. Alkylmercury species in the equatorial Pacific. *Nature (London)* 347: 457-459.

Mason R.P. and Fitzgerald W.F. 1991. Mercury speciation in open ocean waters. *Water, Air & Soil Pollution Journal* 56: 745-767.

Mason R.P., Fitzgerald W.F., Morel F.M.M. 1994. The biogeochemical cycling of elemental mercury: anthropogenic influences. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 58: 3191-3198.

Mason R.P., Rolffhus K.R. and Fitzgerald W.F. 1995. Methylated and elemental mercury cycling in surface and deep ocean waters of the north Adriatic. *Water, Air & Soil Pollution* 80: 665-677.

Majori L., Nedoclan G., Modonutti G.B. 1967. Inquinamento da mercurio nell'Alto Adriatico. *Acqua e Aria* 3: 164-172.

Matsumoto H., Koya G. and Takeuchi T. 1965. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 24: 563-574.

McCann J.C. and Ames B.N. 2005. Is docosahexaenoic acid a n-3 long chain polyunsaturated fatty acid required for development of normal brain? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *American Journal of Clinical Nutrition* 82: 281-295.

Miettinen J. K. 1973. Absorption and elimination of dietary mercury (Hg<sup>2+</sup>) and methylmercury in man. In *Mercury, mercurials and mercaptans*. Miller M.W., Clarkson T.W. (ed). Thomas C.C.: Springfield, U.S.A.

Miklavcic A., Stibilj V., Heath E., Polak T., Snoj Tratnik J., Klauz J. 2011a. Mercury selenium, PCB's and fatty acids in fresh and canned fish available on the Slovenian market. *Food Chemistry* 124: 711-720.

Miklavcic A., Cuderman P., Mazej D., Snoj Tratnik J., Krsnik M., Planinsek P., Osredcar J., Horvat M. 2011b. Biomarkers of low-level mercury exposure through fish consumption in pregnant and lactating Slovenian women. *Environmental Research* 111: 1201-1207.

Mlakar I. 1974. Basic parameters of the production of the Idrija Mercury Mine through the centuries to today (in Slovene). *Idrijski razdgladi XIX (3-4)*, 1-40.

Morgan J.N., Berry M.R., Graves R.L. 1997. Effects on commonly used cooking practices on total mercury concentration in fish and their impact on exposure assessment. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 7: 19-33.

Mozzafarian D. and Rimm E. B. 2008. Fish Intake, Contaminants, and Human Health: Evaluating the Risks and the Benefits. *The Journal of the American Medical Association* 296: 1885-1899.

Myers G.J., Davidson P.W., Cox C., Shamlaye C.F., Tanner M.A., Choisy O. 1995. Neurodevelopmental outcomes of Seychellois children sixty-six months after in utero exposure to methylmercury from a maternal fish diet: pilot study. *Neurotoxicology* 16: 639-652.

Myers G.J., Davidson P.W., Shamlaye C.F., Axtell C.D., Cernichiari E., Choisy O. 1997. Effects of prenatal methylmercury exposure from a high fish diet on developmental milestones in the Seychelles Child Development Study. *Neurotoxicology* 18: 819-829.

Myers G.J., Davidson P.W., Cox C., Shamlaye C., Cernichiari E., Clarkson T.W. 2000. Twenty-seven years studying the human neurotoxicity of methylmercury exposure. *Environmental Research* 83: 275-285.

Myers G.J., Davidson P.W., Cox C., Shamlaye C.F., Palumbo D., Cernichiari E. 2003. Prenatal methylmercury exposure from ocean fish consumption in the Seychelles child development study. *Lancet* 361: 1686-1692.

Myers G.J., Davidson P.W., Strain J.J. 2007. Nutrient and Methyl Mercury Exposure from Consuming Fish. *American Society for Nutrition* 137: 2805-2808.

Murata K., Weihe P., Budtz-Jørgensen E., Jørgensen P.J., Grandjean P. 2004. Delayed brainstem auditory evoked potential latencies in 14-year-old children exposed to methylmercury. *Journal of Pediatrics* 144: 177-83.

Nagase H., Ose Y., Sato T., Ishikawa T. 1982. Methylation of mercury by humic substances in an aquatic environment. *Science of the Total Environment* 32: 147-156.

NRC (National Research Council) 2000. Toxicological effects of Methylmercury. Washington National Academy Press.

Nelson, C.H., Pierce, D.E., Leong, K.W., Wang, F.F.H., 1975. Mercury distribution in ancient and modern sediment of northeastern Bering Sea. *Marine Geology* 18: 91–104.

Nielsen J.B. and Andersen O. 1990. Disposition and retention of mercuric chloride in mice after oral and parenteral administration. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 30: 167-180.

Nordenhall K., Dock L., Vahter M. 1998. Cross-fostering study of methylmercury retention, demethylation and excretion in the neonatal hamster. *Pharmacology and Toxicology* 82: 132-136.

Ogrinc N., Monperrus M., Kotnik J., Fajon V., Vidimava C., Amouroux D., Kocman D., Tessier E., Žižek S., Horvat M. 2007. Distribution of mercury and methylmercury in deep-sea surficial sediments of the Mediterranean Sea. *Marine Chemistry* 107: 31-48.

Oken E., Kleinman K.P., Berland W.E., Simon S.R., Rich-Edwards J.W., Gillman M.W. 2003. Decline in fish consumption among pregnant women after a national mercury advisory. *Obstetrics & Gynecology* 102: 346-351.

Oken E., Wright R.O., Kleinman K.P., Bellinger D., Amarasiriwardena C.J., Hu H., Rich-Edwards J.W., Gillman M.W. 2005. Maternal fish consumption, hair mercury, and infant cognition in a U.S. Cohort. *Environmental Health Perspectives* 113: 1376-1380.

Oken E., Radesky J.S., Wright R.O., Bellinger D.C., Amarasiriwardena C.J., Kleinman K.P., Hu H., Gillman M.W. 2008. Maternal fish intake during pregnancy, blood mercury levels, and child cognition at age 3 years in a US cohort. *American Journal of Epidemiology* 167: 1171-1181.

Olivieri G., Brack C., Muller-Spahn F., Stahelin H. B., Herrmann M., Renard P., Brockhaus M., Hock C. 2000. Mercury induces cell cytotoxicity and oxidative stress and increases beta-amyloid secretion and tau phosphorylation in SHSY5Y neuroblastoma cells. *Journal of Neurochemistry* 74: 231-236.

Olivieri G., Novakovic M., Savaskan E., Meier F., baysang G., Brockhaus M., Muller-Spahn F. 2002. The effects of  $\beta$ -estradiol on SHSY5Y neuroblastoma cells during heavy metal induced oxidative stress, neurotoxicity and  $\beta$ -amyloid secretion. *Neuroscience* 113: 849-855.

Pedersen M.B., Hansen J.C., Mulvad G., Pedersen H.S., Gregersen M., Danscher G. 1999. Mercury accumulations in brains from populations exposed to high and low dietary levels of methyl mercury. *Circumpolar Health* 58: 96–107.

Pendergrass J.C. and Haley B.E. 1997. Inhibition of brain tubulin-guanosine 5'-triphosphate interactions by mercury: similarity to observations in Alzheimer's diseased brain. In: *Metallions on Biological systems*, Sigel A. and Sigel H. ed. pp 461-478. Dekker, New York.

Perugini M., Visciano P., Manera M., Zaccaroni A., Olivieri V., Amorena M. 2009. Levels of Total Mercury in Marine Organisms from Adriatic Sea, Italy. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83: 244–248.

Peterson C. L., Klawe W. L. and Sharp G. D. 1973. Mercury in tuna: a review. *Fishery Bulletin U.S.* 71: 603-613.

Pinheiro M.C.N., Nascimento J.L.M., Silveira L.C.L., Rocha J.B.T., Aschner M. 2009. Mercury and Selenium-a review on aspects related to the health of human populations in the Amazon. *Environmental Bioindicators* 4: 222-245.

Pitkin R.M., Bahns J.A., Filer L.J. Reynolds W.A. 1976. Mercury in human maternal and cord blood, placenta, and milk. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 151: 565-567.

Raven J. 1940. *Progressive Matrices*. Mental Healt. 1.: 10-18.

Raven J.C., Court J.H., Raven J. *Manual for Raven's Progressive Matrices and Vocabulary Scales*, Lewis, London, 1986.

Raven J.C. 1969. "SPM Standard Progressive Matrices". Ristampa 2007. *Manuale O.S. Organizzazioni Speciali*, Firenze.

Ray A.B. and Selvakumar A. 2007. Laboratory studies on the remediation of mercury contaminated sites. *Remediation Journal* 10: 49-56.

Raymond L. and Ralston V.C.N. 2004. Mercury: Selenium interactions and health implications. *Seychelles Medical and Dental Journal* 7: 72-75.

- Reilly S., Wake M., Ukoumunne O.C., Bavin E., Prior M., Cini E., Conway L., Eadie P., Bretherton L. 2010. Predicting language outcomes at 4 years of age: findings from Early Language in Victoria Study. *Pediatrics* 126: 1530-1537.
- Renzi A. 1978. Comparison between the Hg concentration of *Thunnus thunnus* from the Mediterranean and the Atlantic. *Journée d'Etude sur la Pollution CIESM* 4: 225-260.
- Renzi A. e Baldi F. 1975. Osservazioni sulla distribuzione di mercurio della fauna del Mar Ligure e del Mar Tirreno. *Acqua Aria* 8: 597:602.
- Renzi A., Zino F., Franchi E. 1998. Mercury levels along the food chain and risk for exposed population. *Environmental Research* 77: 68–72.
- Rinklebe J., During A., Overesch M., Wennrich R., Stärkm H.J., Mothes S., Neue H. U. 2009. Optimization of the simple field method to determine mercury volatilization from soils. Examples of 13 sites in floodplain ecosystems at the Elbe River (Germany). *Ecological Engineering* 35: 319-328.
- Rolfhus K.R. and Fitzgerald W.F. 1995. Linkages between atmospheric mercury deposition and the methylmercury content of marine fish. *Water, Air & Soil Pollution Journal* 80: 291-297.
- Roos D.H., Puntel R.L., Lugokenski T.H., Ineu R.P., Bohrer D., Burger M.E., Franco J.L., Farina M., Aschner M., Rocha J.B.T., De Vargas Barbosa N.B. 2010. Complex Methylmercury–Cysteine Alters Mercury Accumulation in Different Tissues of Mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 107: 789–792.
- Sakamoto M., Kubota M., Liu X.J., Murata K., Nakai K., Satoh H.. 2004. Maternal and fetal mercury and n-3 polyunsaturated fatty acids as a risk and benefit of fish consumption to fetus. *Environmental Science and Technology* 38: 3860-3863.
- Sandborg-Englund G., Elinder C.G., Langworth S., Schutz A. and Ekstrand J. 1998. Mercury in biological fluids after amalgam removal. *Journal of Dental Research* 77: 615–624.
- Sanzo J.M., Dorronsoro M., Amiano P., Amurrio A., Aguinagalde F.X., Azpiri M.A. 2001. Estimation and validation of mercury intake associated with fish consumption in an EPIC cohort of Spain. *Public Health Nutrition* 4: 981–988.
- Shin E.B. and Krenkel, P.A. 1976. *Journal of the Water Pollution Control Federation* 48, 473.
- Siegel S. M. and Siegel B. Z. 1984. *Nature* 309: 146-147.
- Schoeman K. Bend J.R., Hill J., Nash K., Koren G. 2009. Defining a lowest observable adverse effect hair concentrations of mercury for neurodevelopmental effects of prenatal

methylmercury exposure through maternal fish consumption: a systematic review. *Therapeutic Drug Monitoring* 31: 670-682.

Shamlaye C., Davidson P.W., Myers G.J. 2004. The Seychelles Child Development Study: two decades of collaboration. *Seychelles Medical & Dental Journal* 7: 92-99.

Simmer K., Patole S.K., Rao S.C. 2008. Longchain polyunsaturated fatty acid supplementation in infants born at term. *Cochrane Database Syst Rev* 1:CD000376.

Skylberg U., Bloom P.R., Qian J., Lin C.M., Bleam W.F. 2006. Complexation of mercury (II) in soil organic matter: EXAFS evidence for linear two-coordination with reduced sulfur groups. *Environmental Science and Technology* 40: 4174-4180.

Snyder R. D. 1972. The involuntary movements of chronic mercury poisoning. *Archives of Neurology* 26: 379-381.

Sorensen N. and Murata K., 1999. Prenatal methylmercury exposure as a cardiovascular risk factor at 7 years of age. *Epidemiology* 10: 370-375.

Stoeppler, M., Bernhard, M., Backhaus, F., Schulte, E. (1979). Comparative studies on trace metal levels in marine biota. I. Mercury in marine organisms from western Italian coast, the Strait of Gibraltar and the North Sea. *Science of the Total Environment* 3: 209-223.

Stokes-Riner A., Thurston S.W., Myers G.J., Duffy E.M., Wallace J., Bonham M., Robson P., Shamlaye C.F., Strain J.J., Watson G., Davidson P.W. 2010. A longitudinal analysis of prenatal exposure to methyl mercury and fatty acids in the Seychelles. *Neurotoxicology and Teratology* 33: 325-328.

Storelli M.M. 2008. Potential human health risks from metals (Hg, Cd, and Pb) and polychlorinated biphenyls (PCBs) via seafood consumption: Estimation of target hazard quotients (THQs) and toxic equivalents (TEQs). *Food and Chemical Toxicology* 46: 2782-2788.

Storelli M.M., Giacomini-Stuffer R., Marcotrigiano G.O. 2001. Total mercury and methylmercury in tuna fish and sharks from the South Adriatic sea. *Italian Journal of Food Science* 13: 101-106.

Storelli M.M., Storelli A., Giacomini-Stuffer R., Marcotrigiano G.O. 2005. Mercury speciation in the muscle of two commercially important fish, hake (*Merluccius merluccius*) and striped mullet (*Mullus barbatus*) from the Mediterranean Sea: estimated weekly intake. *Food Chemistry* 89: 295-300.

Strain J.J., Davidson P.W., Bonham M.P., Duffy E.M., Stokes-Riner A., Thurston S.W., Wallace J.M., Robson P.J., Shamlaye C.F., Georger L.A., Sloane-Reeves J., Cernichiari E.,

Canfield R.L., Cox C., Huang L.S., Janciurias J., Myers G.J., Clarkson T.W. 2008. Associations of maternal long-chain polyunsaturated fatty acids, methyl mercury, and infant development in the Seychelles Child Development Nutrition Study. *Neurotoxicology* 29: 776-782.

Tamburlini G, Barbone F. 2007. Maternal fish consumption and children's development. *Lancet* 369: 1166-1167.

Sundberg J., Oskarsson A. and Albanus L. 1991. Methylmercury exposure during lactation: Milk concentration and tissue uptake of mercury in the neonate rat. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 255-262.

Sundberg J., Jonsson S., Karlsson M.O., Oskarsson A. 1999. Lactational exposure and neonatal kinetics of methylmercury and inorganic mercury in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 154: 160-169.

Swartout J. and Rice G. 2000. Uncertainty analysis of the estimated ingestion rates used to derive the methylmercury reference dose. *Drug and Chemical Toxicology* 23: 293-306.

Takeuchi T., Morikawa N., Matsumoto H., Shiraisci Y. 1962. A pathologic study of Minamata disease in Japan. *Acta Neuropathologica (Berl)* 2: 40-57.

Takahashi Y., Tsuruta S., Hasegawa J., Kameyama Y., Yoshida M. 2001. Release of mercury from dental amalgam fillings in pregnant rats and distribution of mercury in maternal and fetal tissues. *Toxicology* 163: 115-126.

Tsubaki T. and Irukayama K. 1977. *Minamata disease, Methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan*. Amsterdam, Elsevier.

UNEP 2002. *Global Mercury Assessment*. UNEP Chemicals Mercury Programme.

Urbach J., Boadi W., Brandes J.M., Kerner H., Yannai S. 1992. In vitro effect of mercury on enzyme activities and its accumulation in first-trimester human placenta. *Environmental Research* 57: 96-106.

USS DHS 1993. U.S. Department of Health & Human Services. Public Health service Agency for Toxic and Disease Registry. *Toxicological Profile for Mercury*, pp 1-124.

US Department of Health and Human Services. 2004. What you need to know about mercury in fish and shellfish. March 2004 (Document No. EPA-823-R-04-005).

US Food and Drug Administration. 2001. Consumer advisory: an important message for pregnant women and women of childbearing age who may become pregnant about the risks of mercury in fish. March 2001.

Uvensky V.N., Li J. and Fink A.L. 2001. Metal-triggered structural transformation, aggregation, and fibrillation of human  $\alpha$ -synuclein. A possible molecular link between Parkinson's disease and heavy metal exposure. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 44284-44296.

Vahter M.E., Mottet N.K., Friberg L.T., Lind S.B., Charleston J.S., Burbacher T.M. 1995. Demethylation of methyl mercury in different brain sites of *Macaca fascicularis* monkeys during long-term subclinical methyl mercury exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* 134: 273-284.

Vahter M., Åkesson A., Lind B., Björs U., Schütz A., Berglund M. 2000. Longitudinal study of methylmercury and inorganic mercury in blood and urine of pregnant and lactating women, as well as in umbilical cord blood. *Environmental Research* 84: 186-194.

Weiss B. 1994. The developmental neurotoxicity of methylmercury. *Environmental Health Perspectives* 102: 103-108.  
Vimy M. J., Takahashi Y., Lorscheider F. L. 1990. Maternal-fetal distribution of mercury (203Hg) released from dental amalgam fillings. *American Journal of Physiology*. 258: 939-945.

Zahir F., Rizwi S.J, Haq S.K., Khan R.H. 2005. Low dose mercury toxicity and human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20: 351-360.

Weiner J.A. and Nylander M. 1995. An estimation of the uptake of mercury from amalgam fillings based on urinary mercury excretion of mercury in Swedish subjects. *Science of the Total Environment* 168: 255-265.

White R., Debes F., Rahl R., Grandjean P. Development and field testing of a neuro-psychological test battery to assess the effects of methylmercury exposure in the Faroe Islands. *Proceedings of the International Symposium on Assessment on Environmental Pollution and Health Effects of Methylmercury, Kumamoto; 1994: 127-140.*

WHO. 1976. Mercury. *Environment Health Criteria* 1. Geneva: World Health Organisation.

WHO. 1991. Inorganic Mercury. *Environment Health Criteria* 1. Geneva: World Health Organisation.

WHO. 2003. Elemental Mercury and Inorganic Mercury Compounds. *Human Health Aspects. Concise International Chemical Assessment Document* 50. Geneva: World Health Organisation.

WHO 2004. *Technical Report Series* 922. Sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA) 133.

WHO 1990. *Environmental Health Criteria* 101, Methylmercury. Geneva: World Health Organisation.

Wiggers G.A., Pecanha F.M., Briones A.M., et al. 2008. Low mercury concentrations cause oxidative stress and endothelial dysfunction in conductance and resistance arteries. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 295: 1033-1043.

Winfrey M.R. and Rudd J.W. 1990. Environmental Factors affecting the formation of methylmercury in low pH lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9: 853-869.

Yin Z.B., Jiang H.Y., Syversen T., Rocha J.B.T., Farina M., and Aschner. M. 2008. The methylmercury-L-cysteine conjugate is a substrate for the L-type large neutral amino acid transporter. *Journal of Neurochemistry* 107: 1083-90.

Yin Z.B., Milatovic D., Aschner J.L., Syversen T., Rocha J.B.T., Souza D.O., Sidoryk M., Albrecht J., and Aschner M. 2007. Methylmercury induces oxidative injury, alterations in permeability and glutamine transport in cultured astrocytes. *Brain Research* 1131: 1-10.

Zhang L., Paige Wright L., Blanchard P. 2009. A review of current knowledge concerning dry deposition of atmospheric mercury. *Atmospheric Environment* 43: 5853-5864.

# **Allegato 1**



## Progetto PHIME

### Questionario breve per le madri

PHIME PATIENT ID | | | | | |

CODICE FISCALE | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

#### MADRE

Q1 Nome e Cognome

.....

Q2 Data di nascita

| | | | | | | | | |  
gg mm aa

Q3 Luogo di nascita (città e nazione)

.....

Q4 Indirizzo.....

Q5 Numero di telefono .....

Q6 Da quale anno risiede in Friuli-Venezia Giulia? | | | | |

Q7 Pensa che si trasferirà fuori regione nei prossimi due anni? 1.SI' 2. NO

Q8 Attività lavorativa svolta nell'ultimo anno .....

Q9 Scolarità (anni di scuola)

| | |

Q10 Numero di figli

| | |

Q11 Data di nascita del figlio più giovane

| | | | | | | | | |

gg mm aa

#### PADRE

Q12 Nome e Cognome.....

Q13 Data di nascita

| | | | | | | | | |  
gg mm aa

Q14 Attività lavorativa svolta attualmente.....

Q15 Scolarità (anni di scuola)

| | |

Q16 Data presunta del parto

| | | | | | | | | |  
gg mm aa

Q17 Durante la gravidanza ha avuto problemi? 1.SI' 2. NO

Q18 Se sì, quali ? .....

Q19 Durante la gravidanza è stata curata per qualche malattia? 1.SI' 2. NO

Q20 Se sì, per quali malattie ? .....

Q21 Peso prima della gravidanza (kg) |\_|\_|\_|

Q22 Altezza (cm) |\_|\_|\_|

Q23 Abitudine al fumo:

fumava prima della gravidanza ? 1.SI' 2. NO

fuma attualmente? 1.SI' 2. NO

(solo per chi attualmente fuma)

Q24 Quante sigarette fuma al giorno ? |\_|\_|

Q25 Con quale frequenza consuma i seguenti alimenti e bevande ? (segnare per ciascuno la frequenza corrispondente)

Alimenti e bevande	FREQUENZA									
	Mai	Meno di una volta al mese	1-3 volte al mese	1 volta alla sett	2 volte alla sett	3 volte alla sett	4 volte alla sett	5 volte alla sett	6 volte alla sett	Almeno 1 volta al giorno
Verdure* (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Latte e derivati (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Uova (uno)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Carne (1 porzione, 150g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pesce fresco (1 porzione, 150g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pesce surgelato (1 porzione, 150g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pesce in scatola (1 scatola, 80g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bevande alcoliche^ (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

\* Verdure: si intendono tutti le verdure eccetto le patate

^ Latte e derivati: 1 porzione = 1 yogurt oppure 1 fetta di formaggio (100g) oppure 1 tazza o 1 bicchiere di latte (200g)

^ Bevande alcoliche: 1 porzione = 1 bicchiere di vino (125ml) oppure 1 lattina di birra oppure 1 bicchierino di superalcolico (30ml)

Q26 Consumo di bevande alcoliche

Prima della gravidanza 1.SI' 2. NO

Attualmente 1.SI' 2. NO

Q27 Il Suo consumo di bevande alcoliche si concentra in alcuni giorni della settimana? 1.SI' 2. NO

Q28 Se sì, in quanti giorni alla settimana? 1 2 3 4 5

Q29 Nell'ultimo anno ha abitato in un luogo diverso dalla Sua attuale abitazione? 1.SI' 2. NO

Q30 Per quanto tempo? 1. numero di settimane |\_|\_|

2. numero di mesi |\_|\_|

Q31 Dove? .....

Q32 Data del prelievo di capelli |\_|\_| |\_|\_| |\_|\_|  
gg mm aa

Q33 Luogo .....

Q34 Determinazione analitica

Hgtot

|\_|\_|\_|\_|

**Q35 Data della determinazione**

|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|  
*gg mm aa*

## **Allegato 2**



***PHIME UDINE***

***QUESTIONARIO DETTAGLIATO PER LE MADRI***

## **ISTRUZIONI PER LA COMPILAZIONE**

*L'obiettivo di questo studio è rilevare la storia residenziale, lavorativa e le abitudini alimentari delle donne DURANTE la gravidanza.*

*Il questionario prevede diverse sezioni, dove si raccolgono informazioni di tipo anagrafico, residenziale e lavorativo, e le abitudini alimentari: La preghiamo di compilare queste sezioni quanto più possibile in modo chiaro e comprensibile, utilizzando la scrittura per esteso quando espressamente richiesto e tralasciando la compilazione dei campi segnalati con un asterisco (\*). Tutti i dati saranno trattati a solo scopo scientifico e secondo la legge sulla privacy (D.Lgs n.196, 30 giugno 2003)*

*La parte alimentare del questionario è composta da una prima serie di domande riguardanti alcune caratteristiche generali delle Sue abitudini alimentari, a cui segue una lista di domande preimpostate che si riferiscono alla frequenza con cui ha consumato abitualmente una porzione degli alimenti elencati.*

*Con "consumo abituale" si intende tutto ciò che Lei ha mangiato durante la gravidanza, tralasciando tutte le volte che le Sue abitudini hanno subito delle variazioni temporanee, di durata non superiore a una settimana a causa di particolari situazioni quali ad esempio malattie, viaggi, malesseri passeggeri non legati alla gravidanza. La preghiamo perciò di fare riferimento alla Sua alimentazione escludendo tali periodi. È necessario scegliere per ciascuna la frequenza di consumo più corretta, quella cioè che meglio descrive le Sue abitudini.*

*Le porzioni che vede riportate sono riferite alle porzioni medie abituali italiane per un adulto: nel caso in cui la Sua porzione abituale fosse molto superiore o molto inferiore a quelle indicate, indichi la frequenza e segnali per favore a matita in corrispondenza della domanda la quantità da Lei effettivamente consumata e lo segnali all'incaricata alla raccolta del questionario*

*Per rispondere deve mettere una crocetta, o una barra, (UNA SOLA) nella casella corrispondente alle Sue abitudini, usando possibilmente una biro rossa, verde o blu. A parte alcune eccezioni (indicate sul questionario) dovrà mettere UNA SOLA CROCETTA su ogni riga.*

*La preghiamo di rispondere a TUTTE le domande, mettendo una crocetta sulla casella corrispondente a MAI se non consuma l'alimento. Per alcuni alimenti è richiesta anche se l'alimento è prodotto in casa: con questa domanda intendiamo l'eventuale produzione in proprio (campo, orto, allevamento all'aperto o in stalla) di latte, frutta, verdura, pollame e uova, NON la loro preparazione a casa. Ad esempio, se si consuma pane o pizza fatti in casa con farina acquistata al supermercato non si deve barrare la casella "prodotto in casa", mentre se il pane o la pizza vengono fatti con farina prodotta nel proprio campo si.*

*Prima di iniziare legga attentamente le varie categorie di frequenza e gli alimenti indicati nel questionario e tenga poi conto del tempo che impiegherà per la sua compilazione.*

### **ECCO ALCUNI ESEMPI**

#### **Domande di carattere generale**

*Indichi la sua risposta a ciascuna domanda facendo una croce sul numero ad essa corrispondente oppure cerchiandone il numero.*

Esempio:

Sesso:

1. Maschio oppure 1. Maschio  
~~2~~ Femmina ~~2~~ femmina

### Questionario alimentare

IN GENERALE, le frequenze di consumo degli alimenti devono essere intese come medie e devono tener conto della porzione consumata.

- se una persona mangia un PIATTO DI PASTA o RISO AL POMODORO 3 volte alla settimana e il consumo non varia durante il periodo considerato, la frequenza di consumo sarà di 2-4 volte alla settimana

- se una persona mangia un GELATO 1 volta al mese per tutto il periodo considerato, la frequenza di consumo sarà di 1-3 volte al mese

- se una persona mangia mediamente 1 FRITTATA, fatta con 1 uovo, 1 volta alla settimana, la frequenza di consumo da indicare sarà di 1 volta alla settimana.

- se una persona mangia invece 1 FRITTATA, fatta con 2 uova, 1 volta alla settimana, la frequenza di consumo da indicare sarà di 2-4 volte alla settimana.

- se una persona mangia mediamente 2 PANINI al giorno, la frequenza di consumo da indicare sarà 2-3 volte al giorno.

### **ESEMPIO**

	FREQUENZA									Anche prodotto In casa?
	mai	meno di 1 v mese	1-3 volte al mese	1 volta a sett.	2-4 volte a sett.	5-6 volte a sett.	1 volta al giorno	2-3 volte al giorno	più di 3 volte al giorno	
Pasta o riso al pomodoro (1 p	1	2	3	4	<del>5</del>	6	7	8	9	SI'
Gelato	1	2	<del>3</del>	4	5	6	7	8	9	SI'
Uova fritte, frittata, omelette (	1	2	3	4	<del>5</del>	6	7	8	9	<del>SI'</del>
Pane (1 panino)	1	2	3	4	5	7	7	<del>8</del>	9	SI'

Nella sezione **AL TRI ALIMENTI** vanno inseriti, con il maggior dettaglio possibile, gli alimenti consumati almeno una volta alla settimana che non compaiono nelle domande precedenti. Ad esempio alcuni piatti regionali come gli gnocchi con le prugne, il frico, la brovada, i Cjarsòns, la Iota, etc. Altri alimenti tipici regionali quali la minestra d'orzo o orzotto possono essere assimilati ad altri che presentano le stesse caratteristiche (orzotto = minestra di altri cereali). In caso di dubbio inserire sempre l'alimento nella sezione aperta.



**Stato civile:**

1. coniugata|convivente
2. vedova
3. separata|divorziata
4. single|nubile| mai sposata

**DATI ANTROPOMETRICI**

Altezza (in cm) |\_|\_|\_|

Peso (in kg) prima della gravidanza |\_|\_|\_| al parto |\_|\_|\_|

**TITOLO DI STUDIO**

1. nessuno
2. licenza elementare
3. licenza media
4. diploma superiore
5. laurea|laurea breve

**OCCUPAZIONE**

**Attualmente lei è:**

1. occupata in maternità|aspettativa
2. occupata lavoratrice
3. casalinga
4. alla ricerca di occupazione
5. studentessa
6. ritirata dal lavoro
7. altre condizioni (specificare)

\_\_\_\_\_ |\_|\_|\_|\_|\*

**Se ha lavorato durante la gravidanza, indichi per esteso la sua occupazione**

\_\_\_\_\_ |\_|\_|\_|\_|\*

**e il settore** \_\_\_\_\_ |\_|\_|\_|\_|\*

**A quale categoria appartiene ?**

1. Dirigenti|imprenditori
2. Professioni intellettuali, scientifiche e di elevata specializzazione
3. Professioni tecniche (compresi tutti gli insegnanti)
4. Impiegati
5. Commessi
6. Artigiani
7. Operai specializzati
8. Operai non specializzati
9. Forze armate
10. Agricoltori|allevatori
11. Pescatore

Fino a che mese ha lavorato ? |\_|

## MARITO|CONVIVENTE

Nazione di nascita

\_\_\_\_\_||\_||\_||\_||\_||\_||\*

Titolo di studio

1. nessuno
2. licenza elementare
3. licenza media
4. diploma superiore
5. laurea | laurea breve

Attualmente è:

1. occupato in paternità|in aspettativa
2. occupato lavoratore
3. casalingo
4. alla ricerca di occupazione
5. studente
6. ritirato dal lavoro
7. altre condizioni (specificare)

\_\_\_\_\_||\_||\_||\_||\_||\_||

Se lavora|lavorava, indichi per esteso la sua occupazione

\_\_\_\_\_||\_||\_||\_||\_||\_||\*

e il settore

\_\_\_\_\_||\_||\_||\_||\_||\_||\*

A quale categoria appartiene ?

1. Dirigenti|imprenditori
2. Professioni intellettuali, scientifiche e di elevata specializzazione
3. Professioni tecniche (compresi tutti gli insegnanti)
4. Impiegati
5. Commessi
6. Artigiani
7. Operai specializzati
8. Operai non specializzati
9. Forze armate
10. Agricoltori|allevatori
11. Pescatore

Altezza (in cm) |\_|\_|\_|

Peso (in kg) |\_|\_|\_|

## CONDIZIONI DI VITA

La casa in cui Lei vive è:

1. di proprietà
2. in affitto
3. comodato d'uso gratuito (ospite)
4. vivo con i genitori|con i suoceri

Quante camere da letto ci sono nella Sua casa? |\_|

Qual è la superficie della Sua casa?

1. Meno di 50 m<sup>2</sup>
2. Tra i 50 ed i 100 m<sup>2</sup>
3. Più di 100 m<sup>2</sup>

Quante persone vivono nella Sua casa (incluse Lei e Suo figlio|a)?

Adulti (maggioresenni) |\_|

Bambini (minoresenni) |\_|

Nella Sua famiglia, quante automobili avete? (se nessuna scriva 0) |\_|

## INFORMAZIONI SUL BAMBINO

Cognome e nome \_\_\_\_\_

Data di nascita: gg |\_|\_| mm |\_|\_| aaaa |\_|\_|\_|\_|

Età gestazionale alla nascita (in settimane): |\_|\_|

### Sesso

1. Maschio
2. Femmina

Peso alla nascita gr |\_|\_|\_|\_|

Lunghezza alla nascita cm |\_|\_|

Il parto è stato:

1. Spontaneo
2. Indotto con farmaci
3. Taglio cesareo programmato
4. Taglio cesareo d'urgenza
5. Con ventosa
6. Con rivolgimento
7. Con forcipe

Dopo la nascita si sono verificate uno e più delle seguenti condizioni?

	SI	NO
Ittero	1	2
Infezioni	1	2
Difficoltà respiratorie	1	2
Convulsioni	1	2

Dopo la nascita è stato necessario sottoporre Suo figlio|a a ricovero in ospedale?

1. Sì
2. No

Se SI, la preghiamo di indicare i dettagli relativi a ciascun ricovero in ospedale:

Età (in mesi)	Motivo del ricovero	Reparto ed ospedale	Trattamento

Escludendo i ricoveri in ospedale, Suo figlio|a ha avuto bisogno di trattamenti medici?

1. SI
2. NO

Se Si, la preghiamo di indicare i dettagli relativi a ciascun episodio:

Problema	Trattamento

## STATO DI SALUTE E STORIA GINECOLOGICA ED OSTETRICA

Quella attuale è la Sua prima gravidanza?

1. Sì
2. No

Se no, quante gravidanze ha avuto precedentemente? |\_|

In che anno si sono verificate e che esito hanno avuto?

Gravidanza	Anno	Nato vivo a termine	Nato vivo sottopeso	Nato vivo pretermine	Nato vivo con malformazioni sindromi genetiche	Aborto spontaneo	Nato morto
1	_ _ _ _	1	2	3	4	5	6
2	_ _ _ _	1	2	3	4	5	6
3	_ _ _ _	1	2	3	4	5	6
4	_ _ _ _	1	2	3	4	5	6
5	_ _ _ _	1	2	3	4	5	6

**Qual è l'attuale stato di salute di:**

Padre del bambino	1. vivo in buono stato di salute
	2. vivo con malattia: _____
	3. deceduto: causa _____
	Età al decesso: anni  __ __
<b>Altri bambini (escluso il bambino partecipante all'indagine)</b>	
Bambino 1	1. vivo in buono stato di salute
	2. vivo con malattia: _____
	3. deceduto: causa _____
	Età al decesso anni  __ __
Bambino 2	1. vivo in buono stato di salute
	2. vivo con malattia: _____
	3. deceduto: causa _____
	Età al decesso: anni  __ __
Bambino 3	1. vivo in buono stato di salute
	2. vivo con malattia: _____
	3. deceduto: causa _____
	Età al decesso: anni  __ __
Bambino 4	1. vivo in buono stato di salute
	2. vivo con malattia: _____
	3. deceduto: causa _____
	Età al decesso: anni  __ __

Prima o durante la gravidanza ha sofferto di:

	No, mai	Sì, solo in gravidanza	Sì, solo prima della gravidanza	Sì, sia prima che durante la gravidanza
Diabete	1	2	3	4
Asma	1	2	3	4
Allergia	1	2	3	4
Epilessia	1	2	3	4
Ipertensione (pressione alta)	1	2	3	4
Vomito	1	2	3	4
Ipotiroidismo	1	2	3	4
Iperitiroidismo	1	2	3	4
Lupus	1	2	3	4
Malattie reumatologiche	1	2	3	4
Infezioni urinarie	1	2	3	4
Infezioni	1	2	3	4
Febbre	1	2	3	4
Convulsioni	1	2	3	4
Anemia	1	2	3	4
Malattie cardiovascolari	1	2	3	4
Malattie neurologiche	1	2	3	4
Malattie genetiche	1	2	3	4
Tumori	1	2	3	4

Ha assunto farmaci - con regolarità - durante la gravidanza?

1. Sì
2. No

Se sì, quali?

Nome commerciale	Per quale motivo?	dal mese	al mese	volte al giorno

Quante visite di controllo ginecologiche-ostetriche ha fatto durante la gravidanza? |\_|\_|

Quante ecografie ha fatto durante la gravidanza? |\_|\_|

Durante la gravidanza ha fatto visite dentistiche?

1. Sì
2. No

Se sì, le sono state praticate otturazioni dentarie?

1. Sì
2. No

**Quante otturazioni ha?**

1. meno di 3
2. da 3 a 5
3. da 6 a 9
4. 10 o più
5. non so

## FUMO

Lei è fumatrice?

1. No, non ho mai fumato
2. Sì, fumo
3. Ex-fumatrice: fumavo, ma ho smesso prima dell'ultima gravidanza
4. Ex-fumatrice: fumavo, ma ho smesso durante l'ultima gravidanza al |\_| mese
5. Ex-fumatrice: fumavo, ma ho smesso dopo l'ultima gravidanza

Se fuma o fumava, a che età ha iniziato? |\_|\_|

Quanto fuma|fumava mediamente al giorno?

	Prima di quest'ultima gravidanza	In questa gravidanza	Adesso
Sigarette	_ _	_ _	_ _
Sigari	_ _	_ _	_ _
Pipa	_ _	_ _	_ _

Se è un'ex-fumatrice, a che età ha smesso di fumare? |\_|\_|

Si identifica con una o più delle seguenti situazioni?

	Prima di quest'ultima gravidanza	In questa gravidanza	Adesso
Convivo con fumatori	Sì	Sì	Sì
Lavoro in un ambiente in cui fumano molte persone	Sì	Sì	Sì

## Allattamento

Com'è stato allattato fino ad ora il Suo bambino, considerando ciascuna settimana ?

Tipo di allattamento	Sett. 1	Sett. 2	Sett. 3	Sett. 4	Sett. 5	Sett. 6
<b>ALLATTAMENTO <u>ESCLUSIVO</u></b> Latte materno direttamente dal seno o estratto manualmente ("tiralatte"), gocce o sciroppi medicinali (vitamine, minerali e farmaci) e nient'altro	1	1	1	1	1	1
<b>ALLATTAMENTO <u>PREDOMINANTE</u></b> Latte materno direttamente dal seno o estratto manualmente ("tiralatte"), gocce o sciroppi medicinali (vitamine, minerali e farmaci) con aggiunta di liquidi non nutritivi (acqua semplice o zuccherata, bevande acquose come tè, camomilla, tisane, infusioni, soluzioni per reidratazione orale)	2	2	2	2	2	2
<b>ALLATTAMENTO <u>PARZIALE</u></b> Latte materno direttamente dal seno o estratto manualmente ("tiralatte"), gocce o sciroppi medicinali (vitamine, minerali e farmaci) con aggiunta di alimenti nutritivi liquidi (latte liquido o in polvere)	3	3	3	3	3	3
<b>ALLATTAMENTO <u>ARTIFICIALE</u></b> Alimentazione senza latte materno	4	4	4	4	4	4

## CARATTERISTICHE GENERALI DELLE ABITUDINI ALIMENTARI

Durante la gravidanza Le è capitato di mangiare diversamente dal solito per un periodo?

1. Sì
2. No

**Se sì, per quale motivo (estraneo alla gravidanza) ?**

1. ho cambiato lavoro
2. seguivo una dieta particolare (specificare il motivo della dieta ..... )
3. ero malata
4. altro, specificare .....

**Se sì, per quale motivo (collegato alla gravidanza) ?**

1. nausea
2. vomito
3. mal di stomaco | acidità di stomaco
4. altro, specificare.....

	Mai	Meno di 1 volta a sett.	1 volta a sett.	2-4 volte a sett.	5-6 volte a sett.	7-8 volte a sett.	9-10 volte a sett.	11-12 volte a sett.	più di 12 volte a sett.
Con quale frequenza consuma il <b>pranzo o la cena</b> fuori casa? (ad es. al lavoro, in mensa, al bar, al ristorante, in casa di altri, ecc.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9

In gravidanza ha usato integratori vitaminici e/o minerali o altre supplementazioni?

1. Sì
2. No

Se Sì, indichi il nome esatto dell'integratore	Uso non regolare	Uso regolare (indichi la dose giornaliera in numero compresse o gocce o mL)			Per quanti mesi l'ha preso?				
		<i>Compresse</i>	<i>Gocce</i>	<i>mL</i>	<1 mese	1-3 mesi	4-6 mesi	7-9 mesi	Non lo so
	Sì	_ _	_ _	_ _	1	2	3	4	5
	Sì	_ _	_ _	_ _	1	2	3	4	5
	Sì	_ _	_ _	_ _	1	2	3	4	5
	Sì	_ _	_ _	_ _	1	2	3	4	5

Nei 3 mesi precedenti la gravidanza ha assunto acido folico (folati)?

1. Sì
2. No

Periodo	Se Sì, indichi il nome esatto dell'integratore	Uso non regolare	Uso regolare (indichi la dose giornaliera in numero compresse o gocce o mL)		
			<i>Compresse</i>	<i>Gocce</i>	<i>mL</i>
3 mesi prima della gravidanza		Sì	_ _	_ _	_ _
2 mesi prima della gravidanza		Sì	_ _	_ _	_ _
1 mese prima della gravidanza		Sì	_ _	_ _	_ _

Quali oli e/o grassi usava di solito per le seguenti preparazioni (anche più di un tipo):	Olio di oliva	Olio di oliva extravergine	Olio di sansa	Olio di girasole, di mais o di soia	Olio di arachide	Olio di semi vari	Burro	Margarina spalmabile	Margarina in panetto	Panna, besciamella	Lardo o strutto
Non ne uso	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Sul pane	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Per condire la verdura cruda	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Per condire la verdure cotta o per cucinare la verdura	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Per cucinare la carne	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Per cucinare il pesce	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Per friggere	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Per condire la pasta o il riso	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Per cucinare il sugo per la pasta o il riso	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Per preparare i dolci	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Non lo so	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì

Saprebbe dire quanto olio di oliva <u>vergine o extravergine</u> mangiava al giorno, sia cotto che crudo? Consideri tutti i piatti cucinati, le verdure, le insalate, e l'olio aggiunto al momento (es. su minestre, verdure, sul pane etc.).	Non ne consumavo	Meno di un cucchiaino	1-3 cucchiaini	4-6 cucchiaini	Piu' di 6 cucchiaini	Non lo so	Anche prodotto in casa?
	1	2	3	4	5	6	Sì

Saprebbe dire quante spezie/erbe mangiava ogni giorno? Consideri tutti le spezie fresche (es. prezzemolo, timo, origano, salvia, rosmarino, aneto, basilico, ecc.) aggiunte durante la cottura o al tavolo (es. nell'insalata o in altri cibi crudi, ecc.).	Non ne consumavo	Meno di un cucchiaino	1-3 cucchiaini	4-6 cucchiaini	Piu' di 6 cucchiaini	Non lo so	Anche prodotto in casa?
	1	2	3	4	5	6	Sì

Alcuni tipi di frutta possono venire consumati con o senza buccia. In quale modo consuma abitualmente i seguenti tipi di frutta?

	<b>Mela</b>	<b>Pera</b>	<b>Pesca</b>	<b>Pescanoce, (nettarina), prugna</b>	<b>Albicocca</b>	<b>Uva</b>	<b>Fico</b>
<b>Con la buccia</b>	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
<b>Senza la buccia</b>	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì

## ABITUDINI ALIMENTARI

BEVANDE CALDE - LATTE - DOLCIFICANTI	Mai	Meno di 1 volta al mese	1-3 volte al mese	1 volta a sett	2-4 volte a sett	5-6 volte a sett	1 volta al giorno	2-3 volte al giorno	Più di 3 volte al giorno	Anche prodotto in casa?
Te' (1 tazza)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Tisane, camomilla, te' deteinato, etc. (1 tazza)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Caffè (1 tazzina)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Caffè decaffeinato (1 tazzina)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Latte aggiunto nel caffè o nel te' (1 cucchiaino)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Si
Cappuccino o Caffelatte (1 tazza)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Cioccolata calda (1 tazza)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Latte di vacca, intero (1 tazza 1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Si
Latte di vacca parz. scremato o scremato (1 tazza 1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Si
Latte di capra (1 tazza 1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Si
Latte di soia (1 tazza 1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Yogurt intero bianco o alla frutta (1 vasetto)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Si
Yogurt parz. scremato o scremato bianco o alla frutta (1 vasetto)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Si
Zucchero, aggiunto a bevande a altri cibi (1 cucchiaino)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Dolcificanti artificiali (saccarina, aspartame, fruttosio, ecc.) (1 bustina, 1 compressa)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Cioccolato in polvere (tipo nesquik) (1 cucchiaino)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

<b>PANE - CEREALI - PRIMI PIATTI</b>	Mai	Meno di 1 volta al mese	1-3 volte al mese	1 volta a sett	2-4 volte a sett	5-6 volte a sett	1 volta al giorno	2-3 volte al giorno	Più di 3 volte al giorno	<b>Anche prodotto in casa?</b>
Pane bianco (1 panino, 50g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Si
Pane, di tipo integrale (1 panino, 50g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Si
Crackers (1 pacchetto), grissini (n. 5), fette biscottate (n. 3)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Crackers (1 pacchetto), grissini (n. 5), fette biscottate (n. 3) di tipo integrali	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Cereali per la prima colazione (corn flakes, etc) (1 porz, circa 30 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Pizza (1 al piatto o 1 trancio)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Si
Polenta (1 fetta)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Si
Pasta o riso in bianco, risotto (1 piatto)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Pasta o riso al pomodoro (1 piatto)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Pasta o riso con ragù di carne (1 piatto)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Pasta o riso con verdure (broccoli, zucchini, etc.) (1 piatto)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Lasagna, cannelloni, tortellini, moussaka etc. di carne (1 piatto)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Lasagna, cannelloni, tortellini, moussaka etc. di magro (1 piatto)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Minestrina in brodo - anche con pasta e riso (1 piatto)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Minestrone di verdura, pasta e fagioli (1 piatto)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Minestre o altri primi piatti con cereali tipo orzo, faro, miglio (1 piatto)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Formaggio grattugiato, su primi asciutti e minestre (1 cucchiaino)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

<b>SECONDI PIATTI</b>	Mai	Meno di 1 volta al mese	1-3 volte al mese	1 volta a sett	2-4 volte a sett	5-6 volte a sett	1 volta al giorno	2-3 volte al giorno	Più di 3 volte al giorno	Anche prodotto in casa?
Uovo sodo, in camicia, alla coque o crudo (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Uova fritte, frittata, omelette (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Pollo o tacchino, poco condito o lessso (200 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Pollo o tacchino arrosto, fritto o in umido (200 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Coniglio, preparato in qualsiasi modo (200 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Carne magra di manzo, vitello, cavallo ( <i>roast beef, bistecca, lessso, filetto, carne tritata magra, etc</i> ) (120g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Spezzatino (gulasch), brasato, polpette, cotolette, arrosto di manzo, vitello o cavallo (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Carne di capra, preparata in qualsiasi modo (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Carne di maiale, preparata in qualsiasi modo (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Carne di agnello, preparata in qualsiasi modo (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Fegato, di qualsiasi animale (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Altre frattaglie: cuore, cervello, rognone, trippa, ecc. (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Prosciutto crudo, bresaola, speck (4 fette)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Prosciutto cotto (4 fette)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Salame, mortadella, pancetta, etc. (50 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Salsicce, würstel, cotechino, ( <i>Cevapcici, musetto, etc</i> ) (3 fette, 120 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Selvaggina ( <i>cervo, fagiano, capriolo, etc</i> ) (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	

<b>SECONDI PIATTI</b>	<b>Mai</b>	<b>Meno di 1 volta al mese</b>	<b>1-3 volte al mese</b>	<b>1 volta a sett</b>	<b>2-4 volte a sett</b>	<b>5-6 volte a sett</b>	<b>1 volta al giorno</b>	<b>2-3 volte al giorno</b>	<b>Più di 3 volte al giorno</b>
Pesce: bollito, alla griglia, al forno (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Crostacei (aragosta, astice, gamberi, scampi, etc) bolliti, alla griglia, al forno (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Molluschi (polpo, calamari, vongole, cozze, etc) bolliti, alla griglia, al forno (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pesce fritto (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Crostacei (aragosta, astice, gamberi, scampi, etc), fritti (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Molluschi (polpo, calamari, vongole, cozze, etc), fritti (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tonno, sgombro, sardine sott'olio (1 scatoletta, 80g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Formaggi freschi (ricotta, mozzarella, caciotta, etc) come secondo piatto (100 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Feta, come secondo piatto (80 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Altri formaggi (grana, latteria, fontina, emmenthal, groviera, etc) come secondo piatto (80 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Formaggi (tutti i tipi) come snack (25 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9

<b>VERDURE - CONTORNI</b>	<b>Mai</b>	<b>Meno di 1 volta al mese</b>	<b>1-3 volte al mese</b>	<b>1 volta a sett</b>	<b>2-4 volte a sett</b>	<b>5-6 volte a sett</b>	<b>1 volta al giorno</b>	<b>2-3 volte al giorno</b>	<b>Più di 3 volte al giorno</b>	<b>Anche prodotto in casa?</b>
Spinaci, bieta, cicoria, tarassaco (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Carote (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Carciofi (n. 1), cardi (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Cavolfiore (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Cavoli, verze, broccoli, broccoletti di Bruxelles, etc (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Cipolle, crude o cotte, porri (n. 1) (escludendo quelle usate per i soffritti o in altre preparazioni)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Finocchi, crudi o cotti (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Funghi (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Insalata verde o rossa (indivia, scarola, radicchio, etc) (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Insalata mista con carote, pomodori, cetrioli, etc. (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Fagiolini verdi (tegoline, piattoni) (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Fagioli, freschi e secchi (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Piselli, freschi e secchi (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Altri legumi (ceci, lenticchie, fave, etc) (freschi e secchi) (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Melanzane (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Patate: lesse o in purea (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Patate: fritte o arrosto (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Peperoni (rossi, gialli e verdi) (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Pomodori (1, medio)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Soia e prodotti derivati (fagioli, germogli, tofu, etc) (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Zucchine (1 porzione)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì

<b>FRUTTA</b>	<b>Mai</b>	<b>Meno di 1 volta al mese</b>	<b>1-3 volte al mese</b>	<b>1 volta a sett</b>	<b>2-4 volte a sett</b>	<b>5-6 volte a sett</b>	<b>1 volta al giorno</b>	<b>2-3 volte al giorno</b>	<b>Più di 3 volte al giorno</b>	<b>Anche prodotto in casa?</b>
Mele (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Pere (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Arance (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Mandarini, (n. 2), clementine (n. 3), altri agrumi (mapo, etc) (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Pompelmo (mezzo)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Limone: ad ese sulla verdure, su te o altro (1 spruzzata)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Spremute di agrumi (1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Anguria (1 fetta)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Banana (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Fragole (1 tazza, 150 gr)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Ciliegie (n.15, 150 gr)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Kiwi (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Melone (2 fette)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Pesche (n. 1), peschenoci (n. 1), albicocche (n. 2)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Prugne (n. 2)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Fichi (n. 2, medi)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Uva (1 grappolo)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Ananas (2 fette)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Altra frutta esotica _____ (1 pezzo, 1 fetta)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Frutta cotta zuccherata (1 coppetta)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Frutta secca in guscio: mandorle, noci, nocciole, etc. (1 manciata)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì
Frutta essiccata: prugne secche, fichi secchi, albicocche secche, uvetta, etc. (1 manciata)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	Sì

<b>DOLCI - ALIMENTI VARI</b>	<b>Mai</b>	<b>Meno di 1 volta al mese</b>	<b>1-3 volte al mese</b>	<b>1 volta a sett</b>	<b>2-4 volte a sett</b>	<b>5-6 volte a sett</b>	<b>1 volta al giorno</b>	<b>2-3 volte al giorno</b>	<b>Più di 3 volte al giorno</b>
Biscotti (tutti i tipi eccetto gli integrali) (n. 7)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Biscotti integrali (n. 7)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Brioche, croissant o bomboloni krapfen senza crema, merendine tipo Pan di Spagna, torta Margherita, dolci lievitati, panettone gubana, etc (n. 1 o 1 fetta)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pasticcini alla crema (1 grande o 3 mignon) Bomboloni krapfen alla crema (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Crostata alla frutta o alla marmellata (1 fetta) Pasticcini alla frutta (1 grande o 3 mignon)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Budino, crème caramel, dolci al cucchiaio (1 coppetta)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cioccolata (1 quadretto, 10 g), cioccolatino (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Snack al cioccolato tipo Mars, Kit-Kat, Bounty, etc. (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Caramelle normali (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Caramelle light (senza zucchero) (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gomme da masticare -normali (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gomme da masticare -light (senza zucchero) (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Gelato (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Marmellata o miele (1 cucchiaino)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Burro sul pane (5 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Olio di oliva sul pane (10 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Olive verdi o nere (al naturale o in salamoia) (n. 3)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Maionese, salsa rosa, salsa tonnata, etc. (1 cucchiaio)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sottaceti (cetrioli, cipolline, peperoni, giardiniera, etc) (50 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Patatite fritte in sacchetto, salatini, etc. (1 pacchetto, 25 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pop corn (1 tazza, 8 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9

<b>BEVANDE ANALCOLICHE</b>	Mai	Meno di 1 volta al mese	1-3 volte al mese	1 volta a sett	2-4 volte a sett	5-6 volte a sett	1 volta al giorno	2-3 volte al giorno	4-5 volte al giorno	Più di 5 volte al giorno
Coca-Cola, Pepsi-Cola, Chinotto (1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Altre bevande gassate (aranciata, acqua brillante, Sprite etc), compresi gli aperitivi analcolici (1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Bevande gassate "light" (senza zucchero) (1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Succhi di frutta commerciali (1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Acqua minerale (con o senza anidride carbonica) (1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Acqua potabile - di acquedotto (1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Acqua potabile - di pozzo (1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

<b>BEVANDE ALCOLICHE</b>	Mai	Meno di 1 volta al mese	1-3 volte al mese	1 volta a sett	2-4 volte a sett	5-6 volte a sett	1 volta al giorno	2-3 volte al giorno	4-5 volte al giorno	Più di 5 volte al giorno
Vino bianco, spumante, champagne (1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Vino rosso o rosato (1 bicchiere)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Birra (1 lattina)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aperitivi alcolici: es. vermouth, Campari, marsala, etc. (n. 1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Amari, digestivi, liquori dolci (1 bicchierino)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Whisky, cognac, brandy, grappa, vodka, acquavite, tequila etc. (1 bicchierino)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

**SEZIONE SPECIALE. Le domande si riferiscono al Suo consumo di particolari varietà di pesce ed alla loro provenienza.**

Piatti a base di:	FREQ UENZA								TIPO e/o PROVENIENZA					
	Mai	Meno di 1 volta al mese	1-3 volte al mese	1 volta a sett	2-4 volte a sett	5-6 volte a sett	1 volta al giorno	Più di 2 volte al giorno	Fresco - regionale	Fresco - non regionale	Fresco - origine non nota	Congelato  surgelato	In scatola	Non lo so
Zuppa di pesce Brodeto	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Anguilla	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Branzino o Spigola	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Orata	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Cefalo	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Riboni o Pagello	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Sogliola	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Tonno	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Moli Melù	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Asià	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Sgombro	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Palombo	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Platessa	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Coda di rospo	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Vitello di mare	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Pesce San Pietro	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Acciughe	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Sarde Sardine	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Sardoni Cheppie	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Trota Salmone	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Merluzzo Nasello	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì
Altro (specificare)	1	2	3	4	5	6	7	8	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì	Sì

**Durante la gravidanza, quante volte in media ha mangiato pesce al ristorante?**

1. mai
2. meno di 1 volta al mese
3. 1-3 volte al mese
4. 1 volta alla settimana
5. 2-4 volte alla settimana
6. più di 4 volte alla settimana

**Se sta allattando, con che frequenza mangia pesce?**

	Mai	Meno di 1 volta al mese	1-3 volte al mese	1 volta a sett.	2-4 volte a sett.	5-6 volte a sett.	1 volta al giorno	2-3 volte al giorno	Più di 3 volte al giorno
Pesce (tutti i tipi di pesce eccetto crostacei e molluschi): lessato, alla griglia o al forno (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Crostacei (aragosta, granchio, gamberetti): lessati, alla griglia o al forno (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Molluschi (calamaro, seppia, vongola ecc.): lessati, alla griglia o al forno (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pesce fritto (tutti i tipi di pesce eccetto crostacei e molluschi) (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Crostacei fritti (aragosta, granchio, gamberetti, ecc.) (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Molluschi fritti (calamaro, seppia, vongola ecc.) (150 g)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Tonno, sgombri, sardine sott'olio (1 scatola piccola, porzione singola)	1	2	3	4	5	6	7	8	9

**Dove si è rifornita di pesce fresco durante l'inverno ( i 2 principali) ?**

1. Non acquisto pesce fresco
2. Mercato o banco pescheria al supermercato
3. Pescheria
4. Supermarket
5. Direttamente dal pescatore
6. Pescato in proprio
7. Altro:.....

**Può indicare il luogo (Comune, frazione, Provincia) del Suo fornitore abituale di pesce fresco in inverno? ( i 2 principali)**

1. Comune|frazione \_\_\_\_\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\*  
Provincia \_\_\_\_\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\*

Provincia \_\_\_\_\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\*

2. Comune|frazione \_\_\_\_\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\*  
Provincia \_\_\_\_\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\*

Provincia \_\_\_\_\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\*

**Dove si è rifornita di pesce fresco durante l'estate ( i 2 principali) ?**

1. Non acquisto pesce fresco
2. Mercato o banco pescheria al supermercato
3. Pescheria
4. Supermarket
5. Direttamente dal pescatore
6. Pescato in proprio
7. Altro:.....

**Può indicare il luogo (Comune, frazione, Provincia) del Suo fornitore abituale di pesce fresco in estate? ( i 2 principali)**

1. Comune|frazione \_\_\_\_\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|\*



ALTRI ALIMENTI consumati almeno una volta alla settimana Specificare l'alimento:	F R E Q U E N Z A						
	1 volta a sett	2-4 volte a sett	5-6 volte a sett	1 volta al giorno	2-3 volte al giorno	4-5 volte al giono	Più di 5 volte al giorno
	1	2	3	4	5	6	7
	1	2	3	4	5	6	7
	1	2	3	4	5	6	7
	1	2	3	4	5	6	7
	1	2	3	4	5	6	7
	1	2	3	4	5	6	7

In generale, con che frequenza consumava una porzione dei seguenti alimenti ?	F R E Q U E N Z A								
	Mai	Meno di 1 volta a sett	1 volta a sett	2-4 volte a sett	5-6 volte a sett	1 volta al giorno	2-3 volte al giorno	4-5 volte al giono	Più di 5 volte al giorno
Primi piatti asciutti (es pastasciutta, risotto, ecc.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Primi piatti in brodo (es minestre, passati di verdura, ecc.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Secondi piatti a base di pollo tacchino cucinati in tutti i modi	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Secondi piatti a base di carne cucinati in tutti i modi	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Secondi piatti a base di pesce cucinati in tutti i modi	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Una porzione di affettati salumi	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Una porzione di formaggio	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Verdure cotte o crude, compresa l'insalata	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Frutta fresca	1	2	3	4	5	6	7	8	9

## **STORIA RESIDENZIALE DEGLI ULTIMI 5 ANNI**

Da quanto tempo vive nell'attuale abitazione?

dal: m |\_|\_| a |\_|\_|

**In quale parte della città vive?**

1. Centro
2. Periferia
3. Area rurale

**La Sua abitazione dista meno di 1 chilometro da:**

**Industrie**

1. Sì. Specificare nomi \_\_\_\_\_
2. No

**Autostrada**

1. Sì
2. No

**Strada statale**

1. Sì
2. No

**Strada provinciale**

1. Sì
2. No

**Altre strade trafficate**

1. Sì
2. No

**Ferrovia**

1. Sì
2. No

**Aeroporto**

1. Sì
2. No

**Da casa Sua ha mai avvertito odori provenienti dalle seguenti fonti ?**

	<b>Mai</b>	<b>A volte</b>	<b>Spesso</b>
<b>Agricola (ad es. per la vicinanza a campi concimati o a allevamenti bovini, di maiali o di volatili, etc)</b>	1	2	3
<b>Industriale (ad es. per la vicinanza ad acciaierie, concherie, industrie chimiche, etc)</b>	1	2	3

**Nel corso degli ultimi 5 anni, ha mai cambiato casa?**

1. Sì
2. No

**Se "SÌ", La preghiamo di descrivere le Sue precedenti abitazioni partendo dalla più recente. Consideri solo le abitazioni dove ha vissuto per almeno 6 mesi.**

**1^ ABITAZIONE PRECEDENTE**

**Per quanto tempo vi ha abitato?**

dal: m |\_|\_| a |\_|\_| al: m |\_|\_| a |\_|\_|

**In quale parte della città vive?**

1. Centro
2. Periferia
3. Area rurale

**La Sua abitazione dista meno di 1 chilometro da:**

**Industrie**

1. Sì. Specificare nomi \_\_\_\_\_
2. No

**Autostrada**

1. Sì
2. No

**Strada statale**

1. Sì
2. No

**Strada provinciale**

1. Sì
2. No

**Altre strade trafficate**

1. Sì
2. No

**Ferrovia**

1. Sì
2. No

**Aeroporto**

1. Sì
2. No

Da casa Sua ha mai avvertito odori provenienti dalle seguenti fonti ?

	<b>Mai</b>	<b>A volte</b>	<b>Spesso</b>
<b>Agricola (ad es. per la vicinanza a campi concimati o a allevamenti bovini, di maiali o di volatili, etc)</b>	1	2	3
<b>Industriale (ad es. per la vicinanza ad acciaierie, concherie, industrie chimiche, etc)</b>	1	2	3

## 2^ ABITAZIONE PRECEDENTE

Per quanto tempo vi ha abitato?

dal: m |\_|\_| a |\_|\_| al: m |\_|\_| a |\_|\_|

In quale parte della città vive?

1. Centro
2. Periferia
3. Area rurale

La Sua abitazione distava meno di 1 chilometro da:

**Industrie**

1. Sì. Specificare nomi \_\_\_\_\_
2. No

**Autostrada**

1. Sì
2. No

**Strada statale**

1. Sì
2. No

**Strada provinciale**

1. Sì
2. No

**Altre strade trafficate**

1. Sì
2. No

**Ferrovia**

1. Sì
2. No

**Aeroporto**

1. Sì
2. No

Da casa Sua ha mai avvertito odori provenienti dalle seguenti fonti ?

	Mai	A volte	Spesso
Agricola (ad es. per la vicinanza a campi concimati o a allevamenti bovini, di maiali o di volatili, etc)	1	2	3
Industriale (ad es. per la vicinanza ad acciaierie, conerie, industrie chimiche, etc)	1	2	3

### 3^ ABITAZIONE PRECEDENTE

Per quanto tempo vi ha abitato?

dal: m |\_|\_| a |\_|\_| al: m |\_|\_| a |\_|\_|

In quale parte della città vive?

1. Centro
2. Periferia
3. Area rurale

La Sua abitazione distava meno di 1 chilometro da:

**Industrie**

1. Sì. Specificare nomi \_\_\_\_\_
2. No

**Autostrada**

1. Sì
2. No

**Strada statale**

1. Sì
2. No

**Strada provinciale**

1. Sì
2. No

**Altre strade trafficate**

1. Sì
2. No

**Ferrovia**

1. Sì
2. No

**Aeroporto**

1. Sì
2. No

Da casa Sua ha mai avvertito odori provenienti dalle seguenti fonti ?

	Mai	A volte	Spesso
Agricola (ad es. per la vicinanza a campi concimati o a allevamenti bovini, di maiali o di volatili, etc)	1	2	3
Industriale (ad es. per la vicinanza ad acciaierie, concherie, industrie chimiche, etc)	1	2	3

## **STORIA OCCUPAZIONALE DEGLI ULTIMI 5 ANNI**

Negli ultimi 5 anni ha svolto almeno una attività lavorativa?

1. Sì
2. No

Se sì, descriva le attività che ha svolto per almeno 6 mesi.

**LAVORO PIU' RECENTE**  $\Rightarrow$  (Lavoro numero 0)

Da quanto tempo lavora (ha lavorato) per questa azienda, ufficio, ecc.?

dal: m |\_|\_| a |\_|\_| al: m |\_|\_| a |\_|\_|

Qual è (era) la principale attività (mansione) che vi svolge(va)?

\_\_\_\_\_ |\_|\_|\_|\_|\_|\*

Qual è (era) l'attività principale dell'azienda, ufficio, ecc.?

Attività: ..... |\_|\_|\_|\_|\_|\*

Nome: ..... |\_|\_|\_|\_|\_|\*

Comune: ..... |\_|\_|\_|\_|\_|\*

Provincia|Stato estero: ..... |\_|\_|\_|\_|\_|\*

Svolge(va) un secondo lavoro?  $\Rightarrow$  (Lavoro numero 5)

1. Sì. Quale: \_\_\_\_\_ |\_|\_|\_|\_|\_|\*
2. No

Dal: m |\_|\_| a |\_|\_| al: m |\_|\_| a |\_|\_|

**1° LAVORO PRECEDENTE**  $\Rightarrow$  (Lavoro numero 1)

Per quanto tempo ha lavorato per questa azienda, ufficio, ecc.?

dal: m |\_|\_| a |\_|\_| al: m |\_|\_| a |\_|\_|

Quale era la principale attività (mansione) che vi svolgeva?

\_\_\_\_\_ |\_|\_|\_|\_|\_|\*

Quale era l'attività principale dell'azienda, ufficio, ecc.?

Attività: ..... |\_|\_|\_|\_|\_|\*

Nome: ..... |\_|\_|\_|\_|\_|\*

Comune: ..... |\_|\_|\_|\_|\_|\*

Provincia|Stato estero: ..... |\_|\_|\_|\_|\_|\*

**2° LAVORO PRECEDENTE** (Lavoro numero 2)



Per quanto tempo ha lavorato per questa azienda, ufficio, ecc.?

dal: m |\_|\_| a |\_|\_| al: m |\_|\_| a |\_|\_|

Quale era la principale attività (mansione) che vi svolgeva?

\_\_\_\_\_

|\_|\_|\_|\_|\_\*

Quale era l'attività principale dell'azienda, ufficio, ecc.?

Attività: .....

|\_|\_|\_|\_|\_\*

Nome: .....

|\_|\_|\_|\_|\_\*

Comune: .....

|\_|\_|\_|\_|\_\*

Provincia|Stato estero: .....

|\_|\_|\_|\_|\_\*

**3° LAVORO PRECEDENTE** (Lavoro numero 3)



Per quanto tempo ha lavorato per questa azienda, ufficio, ecc.?

dal: m |\_|\_| a |\_|\_| al: m |\_|\_| a |\_|\_|

Quale era la principale attività (mansione) che vi svolgeva?

\_\_\_\_\_

|\_|\_|\_|\_|\_\*

Quale era l'attività principale dell'azienda, ufficio, ecc.?

Attività: .....

|\_|\_|\_|\_|\_\*

Nome: .....

|\_|\_|\_|\_|\_\*

Comune: .....

|\_|\_|\_|\_|\_\*

Provincia|Stato estero: .....

|\_|\_|\_|\_|\_\*

**4° LAVORO PRECEDENTE** (Lavoro numero 4)



Per quanto tempo ha lavorato per questa azienda, ufficio, ecc.?

dal: m |\_|\_| a |\_|\_| al: m |\_|\_| a |\_|\_|

Quale era la principale attività (mansione) che vi svolgeva?

\_\_\_\_\_

|\_|\_|\_|\_|\_\*

Quale era l'attività principale dell'azienda, ufficio, ecc.?

Attività: .....

|\_|\_|\_|\_|\*

Nome: .....

|\_|\_|\_|\_|\*

Comune: .....

|\_|\_|\_|\_|\*

Provincia|Stato estero: .....

|\_|\_|\_|\_|\*

**ESPOSIZIONI OCCUPAZIONALI**

Lavora o ha mai lavorato in uno dei seguenti settori?

	Sì	No	Non lo so	Durante quale lavoro ? Indichi il numero del lavoro a cui si riferisce
Dentista o assistente alla poltrona	1	2	3	
Orafo	1	2	3	
Riproduzione fotografica	1	2	3	
Impiego in impianti chimici cloro- alcalini	1	2	3	
Produzione o utilizzo di vernici a base di metalli	1	2	3	
Estrazione di metalli	1	2	3	
Produzione o utilizzo di dispositivi elettrici e/o elettromedicali (es. termometri, sfigmomanometri, o altri dispositivi contenenti mercurio)	1	2	3	
Industria della carta	1	2	3	
Industria farmaceutica	1	2	3	
Industria dell'inchiostro	1	2	3	
Impiego a contatto con il traffico (es. vigile urbano, dipendenti di stazioni di servizio)	1	2	3	
Agricoltura	1	2	3	

Durante il lavoro, o nel Suo tempo libero<sup>1</sup>, ha mai utilizzato o è entrata in contatto con:

	Sì	No	Non lo so	Durante quale lavoro ? Indichi il numero del lavoro a cui si riferisce
Piombo e prodotti del piombo	1	2	3	
Mercurio	1	2	3	
Mercurio Cromo	1	2	3	
Oro (utilizzo industriale o artistico)	1	2	3	
Metalli	1	2	3	
Cromo o prodotti del cromo	1	2	3	
Solventi	1	2	3	
Vernici, pigmenti, colori a base di metalli	1	2	3	
PCB - policlorobifenili	1	2	3	
Vecchi trasformatori e condensatori	1	2	3	
Radiazioni o isotopi radioattivi	1	2	3	
Fumo dalla fusione del ferro	1	2	3	
Amalgama dentale	1	2	3	

È mai entrata in contatto con il mercurio in seguito alla rottura di un termometro o altri prodotti medici?

1. Sì
2. No
3. Non lo so

Se sì, quando: mm |\_|\_| aaaa |\_|\_|\_|\_|

Per favore descriva le circostanze e le possibili modalità di contatto cutaneo o di ingestione

---

<sup>1</sup>Per tempo libero si intende la pratica di specifici hobby (es. camera oscura, pittura, creazione di gioielli, ecc.)

