



A.D. MDLXII

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI

Scuola di Dottorato di Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche
"Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Direttore: Prof. Bruno Masala

XXIV ciclo

**Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i
livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi**

Tutor:

Prof. Luca Deiana

Tesi di Dottorato di:

Dr.ssa Patrizia Occhineri

Anno Accademico 2011-2012

Indice

INDICE	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUZIONE.....	5
PREMESSA	6
METALLI PESANTI E METALLOIDI	6
SELENIO	9
RUOLO BIOLOGICO DEL SELENIO	10
METABOLISMO DEL SELENIO.....	13
INCORPORAZIONE DEL SELENIO NELLE SELENIOPROTEINE.....	16
FUNZIONE DELLE SELENIOPROTEINE	20
CADMIO	24
METABOLISMO DEL CADMIO.....	27
MECCANISMO D'AZIONE DEL CADMIO	30
SINTOMI	32
PIOMBO	33
METABOLISMO DEL PIOMBO.....	36
SINTOMI	41
TOSSICITÀ ACUTA.....	41
EFFETTI CON ALTRI METALLI.....	44
PROGETTO AKEA	45
PROPRIETÀ NUTRACEUTICHE DEGLI ALIMENTI.....	51
CARATTERISTICHE DELLE PERE	52
CARATTERISTICHE DEL FORMAGGIO	55
CARATTERISTICHE DEI VINO	56
SCOPO DEL LAVORO.....	59
MATERIALI E METODI.....	62
FRUTTA.....	63
TECNICHE DI PRELIEVO PERE	65
FORMAGGIO	66
PREPARAZIONE CAMPIONE PER LETTURA AAS.....	72
SPETTROFOTOMETRIA AD ASSORBIMENTO ATOMICO (AAS)	73
MISURA DEL PIOMBO, CADMIO E SELENIO (ASSORBIMENTO ATOMICO A FORNETTO DI GRAFITE)	74
CAMPIONI DI PLASMA.....	75
PRINCIPIO DEL SAGGIO ELISA PER GPX3	77

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER SF-ICP-MS.....	78
<u>RISULTATI.....</u>	82
<u>DISCUSSIONE.....</u>	93
<u>BIBLIOGRAFIA.....</u>	98

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

ABSTRACT

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Abstract

Stili di vita, fattori genetici e abitudini alimentari possono influire sul processo di invecchiamento in buona salute. La Sardegna è nota per la sua elevata incidenza di centenari ed ultracentenari.

Alcuni alimenti consumati dagli anziani sardi (vino, formaggio, frutta, verdura) possiedono proprietà nutraceutiche, antiossidanti che contribuiscono alla conservazione dell'integrità e della stabilità fisiologica, suggerendo una interazione dieta-geni. Per contro negli stessi potrebbero essere presenti sostanze con proprietà dannose per l'organismo come i metalli pesanti e di transizione che possono causare danni da accumulo. I campioni di plasma analizzati provengono dal progetto di ricerca AKeA finanziato con L. R. 7 / 2007 e dalla L. R. 2 / 2007. I vini e i formaggi sono tutti di produzione propria mentre la frutta è autoctona. Dalle analisi del plasma si è osservata una correlazione positiva fra Cd e Se ($r_s = 0.21$, $p < 0.05$), e una correlazione negativa fra Se e bevitori ($r_s = -0.15$, $p < 0.05$). Non sono state osservate differenze significative tra i livelli di Cd e Se nel sangue nei soggetti non fumatori e fumatori ($p > 0.05$).

I valori plasmatici di Mg, Fe, Cu, Zn e Ca nel plasma si trovano all'interno dei valori di riferimento, anche l'attività della GPX3 è nella norma.

Negli alimenti le concentrazioni di Cd, Se e Pb non superano i limiti massimi consentiti dal regolamento. Appaiono quindi rassicuranti sotto il profilo del rischio di contaminazione del suolo e dell'aria.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Capitolo 1

INTRODUZIONE

Premessa

La presente ricerca è stata resa possibile perchè il Professor Luca Deiana ha concesso la disponibilità dei campioni biologici essendo il responsabile scientifico del progetto AKeA e titolare dei fondi di ricerca derivanti dai progetti finanziati con L. R. 7 Agosto 2007 dal titolo "La biodiversità degli alimenti autoctoni della Sardegna nella longevità: ricerca proteomica, metabolomica e di biologia molecolare sui campioni biologici dei centenari sardi e sui campioni della dieta" (B. Al. AkeA) e dal progetto di ricerca "Marcatori della salute e della longevità dei Sardi - l'isola dei centenari - L.R. n°2 del 29 maggio 2007.

Metalli pesanti e metalloidi

I metalli pesanti sono elementi con caratteristico aspetto lucido, buoni conduttori di elettricità, che si comportano nelle reazioni chimiche da ioni positivi (cationi). Un metalloide è invece un elemento che a seconda delle condizioni presenta proprietà e aspetto fisico pur comportandosi chimicamente come un non metallo (As, B, Si, Ge, Sb, Te, Se). Metalli e metalloidi si ritrovano nella crosta terrestre in forma cristallina. I me-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

talli sono quindi naturalmente presenti nell'aria, nell'acqua, nel suolo e di conseguenza anche negli alimenti. Tuttavia l'attività umana rappresentata dalle industrie, dagli insediamenti urbani (intesi in particolare come scarichi di reflui e di impianti di depurazione degli stessi), dalle attività di miniera e agricole, comportano un rilascio (nell'aria, nel terreno e nelle acque) di notevoli quantitativi di metalli (in particolare Cd, Zn, Pb, e Hg), che passano direttamente, per dilavamento dai terreni o legati ai sedimenti, nei bacini acquatici. Qui possono subire trasformazioni biologiche e chimiche, che ne comportano un accumulo nell'ambiente (sotto forma di sedimenti) e negli organismi, sia vegetali che animali, esplicando così la loro azione inquinante. Sebbene attualmente l'esposizione a fonti antropiche risulti di prevalente importanza tossicologica, l'esposizione alle fonti naturali (da dilavamento ed erosione delle rocce e successivo passaggio nelle acque e nei terreni) è risultata fondamentale per lo sviluppo, negli organismi viventi, di meccanismi di detossificazione, eliminazione ed utilizzo volti a ridurre, se non ad abbattere, la pericolosità dei metalli. Tali meccanismi consentono ad alcune specie animali di sopportare elevate concentrazioni tessutali, che viceversa possono risultare tossiche per altre, senza subire alcun danno(1).

Sia i metalli essenziali che quelli non essenziali, nell'uomo se ingeriti in quantità sufficientemente elevata e per un certo periodo di tempo, sono potenzialmente tossici

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

e possono danneggiare tessuti ed organi. Sono quindi importanti ai fini della potenzialità del danno la dose del metallo, la durata dell'esposizione, la via di assorbimento e la vita media del metallo (2, 3, 4).

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

Quando si parla di inquinamento da metalli pesanti, normalmente ci si riferisce a quattro di questi elementi, che sono i maggiori responsabili dei danni ambientali, ossia: l' Hg, il Cd, il Pb e l'Al (5). Le proprietà tossiche sono elevate sia per l'uomo che per tutte le specie viventi in quanto si legano alle strutture cellulari in cui si depositano, ostacolando lo svolgimento di determinate funzioni vitali, per cui gli organismi spesso non sono in grado di eliminarli (6, 7).

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Selenio

Il selenio fu scoperto dal chimico svedese J. J. Berzelius nel 1817. Egli scelse tale nome, che deriva dal greco “selene” e significa luna, perché si trova spesso associato al Tellurio, il cui nome significa terra (dal latino “tellus”). Fino agli anni '50 del secolo scorso, fu considerato un elemento tossico, responsabile di malattie comunemente dette *alkali disease* o *blind stagger disease* (8,9). Queste malattie, caratterizzate da depressione, affaticamento, perdita di capelli e fragilità delle unghie, erano considerate endemiche nelle zone in cui il suolo era particolarmente ricco di selenio (10,11). In seguito, nel 1954, Pinsent osservò che alcuni batteri crescevano più velocemente in terreni di coltura arricchiti di questo elemento (12). Nel 1957 Swartz e Folz scoprirono che il selenio era contenuto nel “fattore 3”, un composto isolato dal rene di maiale in grado di prevenire, nel ratto, la necrosi epatica indotta da una dieta a base di saccarosio e lievito *torula* (13); in seguito si dimostrò che tale fattore poteva essere sostituito da diverse forme organiche e inorganiche di selenio (14). Da questo momento, il selenio fu considerato un oligoelemento essenziale nella nutrizione. Dieci anni più tardi si scoprì che, nell'uomo, la seleno-deficienza poteva predisporre o essere causa di specifiche malattie, quali la malattia di Keshan, una grave forma di cardiomiopatia in alcuni casi fatale, e la malattia di Kashin-Beck, un'osteoartrite deformante, patologie descritte per la

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: “Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica”

Università degli Studi di Sassari

prima volta in alcune aree rurali della Cina, dove la concentrazione di selenio nel suolo è particolarmente bassa (15). Attualmente, si ritiene che un adeguato apporto alimentare di selenio possa avere effetti benefici e ritardare processi fisiopatologici, quali invecchiamento, malattie cardiovascolari, cancro, e garantire appropriate funzioni immunitarie, endocrine e, nel maschio, la funzione riproduttiva. Questi distinti effetti biologici non possono evidentemente essere spiegati solamente sulla base delle caratteristiche chimiche del selenio e dei suoi composti inorganici. In natura la biosintesi di molti composti organici del selenio segue, per la maggior parte, la stessa via che porta alla formazione dei composti organici contenenti zolfo. Il selenoproteoma umano è stato definito di recente e contiene venticinque selenoproteine; di queste, cinque sono glutatione perossidasi (GPxs) (16, 17)

Ruolo biologico del selenio

Il selenio è un oligoelemento chimico caratterizzato da un peso atomico di 78.96, un numero atomico di 34 appartenente al IV gruppo della tavola periodica; è un non metallo tossico presente nei composti organici ed inorganici in diversi stati di ossidazione. Si presenta con valenze variabili da -2 a $+6$, tra queste i 3 stati di ossidazione principali sono: -2 (selenuri di idrogeno), $+4$ (seleniti) e $+6$ (selenati) (18). I selenati sono compo-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

sti relativamente solubili e altamente tossici, simili ai solfati, mentre i selenti sono praticamente insolubili tanto da poter essere considerati come forme di deposito del selenio, quei pochi che sono invece solubili sono altamente tossici e formano con ferro e alluminio dei composti stabili (19). La formazione e la stabilità dei selenati (stato di ossidazione +6), è favorita da un ambiente alcalino e ossidante. Nella sua valenza -2, (selenuro di idrogeno), il selenio è un gas altamente tossico (1-4 ppb nell'aria) e reattivo, che in presenza di ossigeno si decompone rapidamente in selenio elementare e acqua. Nella forma elementare (stato di ossidazione 0), invece, il selenio è insolubile, non tossico, quando bruciato si ossida a diossido di selenio, che sublima e quando disciolto in acqua, forma acidi selenosi (20). Il Se forma con i metalli pesanti, come il cobalto, dei composti stabili e insolubili. Anche altri selenuri metallici come i selenuri di arsenico, rame o cadmio sono caratterizzati da una scarsa solubilità che influenza l'assorbimento, la ritenzione e la distribuzione del corpo del selenio e del metallo pesante (19). L'insolubilità di questi composti potrebbe essere alla base della detossificazione da metilmercurio con dieta a base di selenio (21). Il selenio è largamente distribuito in natura e la composizione del suolo condiziona il contenuto di selenio degli alimenti. Esistono aree geografiche dove il terreno è povero dell'oligoelemento ed in queste regioni si sono riscontrate le manifestazioni della selenodeficienza. La sua con-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

centrazione nei suoli varia da meno di 0,1µg/g in alcune aree a più di 1mg/g in altre; eccetto alcune zone molto carenti ed altre molto ricche in selenio, la maggior parte dei suoli contengono una concentrazione compresa tra 1,0µg/g e 1,5µg/g. Le principali forme organiche di selenio, introdotte con la dieta, sono selenometionina e selenocisteina (22). La prima, assunta esclusivamente con la dieta, è la fonte di selenio maggiormente rappresentata in lievito, cereali, legumi e soia. È assorbita a livello intestinale, grazie al trasportatore della metionina; è immagazzinata in vari organi, quali muscolo scheletrico, pancreas, fegato, rene, stomaco, eritrociti, e successivamente, è utilizzata per la sintesi proteica (23). Al contrario, la selenocisteina presente nelle selenoproteine non deriva direttamente dall'alimentazione, ma deve essere sintetizzata dall'organismo attraverso un meccanismo complesso, operante cotraduzionalmente: per questo motivo la selenocisteina è a pieno titolo il "ventunesimo aminoacido" (24)

Il selenio influenza tre aree della biochimica cellulare: la funzione antiossidante, lo status redox e il metabolismo degli ormoni tiroidei. I ruoli biologici attribuiti al selenio includono: la prevenzione del cancro, delle malattie cardiovascolari, capacità di ritardare processi fisiopatologici, quali invecchiamento. In aggiunta, elementi in traccia di selenio sono essenziali per ottimizzare la funzione immunitaria, endocrina, per moderare la risposta infiammatoria e la funzione riproduttiva (21,25).

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

L'importanza del selenio nel sistema endocrino è messa in evidenza dal fatto che molti tessuti endocrini hanno evoluto dei meccanismi tali da mantenere a livelli relativamente alti le concentrazioni di selenio anche quando c'è una sua deficienza nel regime dietetico. Il selenio quindi può agire modificando la funzione tiroidea, l'omeostasi del glucosio e la fertilità (26).

Da ricordare che il selenio è un componente chiave di diversi enzimi: nella glutatione perossidasi il selenio svolge insieme alla vitamina E, un ruolo nella protezione delle membrane biologiche dai danni provocati dai perossidi. Diversi studi dimostrano che il Se è capace di contrastare la tossicità del Cadmio(27,28.)

Metabolismo del selenio.

Le principali forme organiche del selenio, introdotte con la dieta, sono la selenometionina e la selenocisteina (29). La selenometionina è assorbita nell'intestino ad opera del trasportatore della metionina, mentre la selenocisteina è veicolata da un trasportatore specifico. Il selenio è assorbito anche in forma inorganica come supplemento: il selenito, Se con valenza 4+, è assorbito passivamente (30, 31) mentre il selenato, Se con valenza 6+, segue la via di assorbimento dello zolfo. Non esiste nell'uomo un controllo omeostatico dell'assorbimento duodenale del selenio, che varia dal 55% al 70%

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

in funzione della forma somministrata. In condizioni di apporto ottimale la concentrazione ematica di selenio è pari a circa 100 ng/ml e il selenio è legato alle proteine del plasma ed ai globuli rossi.

Il selenio plasmatico è associato all' albumina, alla Glutazione Perossidasi plasmatica (pGPx) e alla Selenoproteina P. Nella Glutazione Perossidasi plasmatica e nella Selenoproteina P il selenio si trova in forma di selenocisteina, mentre nell'albumina è in forma di selenometionina. Normalmente circa il 60% del selenio plasmatico è legato alla Selenoproteina P, mentre il resto è distribuito uniformemente tra pGPx ed albumina. Se viene somministrata selenometionina (sottoforma di estratti di lievito arricchito) aumenta soprattutto il selenio legato alla albumina, mentre la supplementazione con selenio inorganico incrementa ulteriormente la percentuale del selenio contenuto nella Selenoproteina P a scapito della quota legata all'albumina. La percentuale che comunque non varia è quella legata alla pGPx. La attività di questo enzima può essere quindi considerata buon indice del selenio corporeo (32). La selenoproteina P e il glutationeperossidasi plasmatica sono indicatori dello stato nutrizionale del selenio.

Nei globuli rossi il selenio è legato all'emoglobina e soprattutto alla Glutazione Perossidasi cellulare (cGPx): a seconda della forma di assunzione varia la percentuale riferibile all'una o l'altra di queste due proteine. La selenometionina si trova prevalentemente

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

associata all'emoglobina, mentre invece il selenato porta ad incorporazione in ugual misura tra emoglobina e Glutathione Perossidasi.

L'attività della Glutathione Perossidasi è proporzionale alla concentrazione ematica del selenio solo in condizioni di seleno-deficienza. In caso di seleno-adequatezza (a livelli ematici di selenio attorno a 100 ng/ml) la concentrazione ematica dell'oligoelemento e l'attività della GPx sono indipendenti. La selenometionina assorbita entra a far parte del *pool* della metionina, e può essere utilizzata nella sintesi proteica al posto di quest'ultima: in questo modo il selenio viene introdotto nelle proteine in modo aspecifico. Al contrario l'introduzione della selenocisteina nelle proteine avviene in modo controllato, attraverso il cosiddetto "metabolismo regolato del selenio" (33).

Il metabolismo del selenio è volto sia a garantire l'adeguata sintesi delle selenioproteine che a mantenere bassa la concentrazione di selenocisteina e selenio inorganico per evitarne l'accumulo che risulterebbe tossico per la cellula. La concentrazione della selenocisteina è determinata dal suo assorbimento, dalla sua liberazione per idrolisi delle selenioproteine e dalla conversione della selenometionina per trans-sulfurazione. Essa viene scissa dall'enzima SeCys- β -liasi che libera selenio. Questo viene poi ridotto a selenuro (acido selenidrico H₂Se). Il selenio inorganico (selenato e selenito) viene ridotto ad acido selenidrico attraverso la formazione di selenodiglutathione. L'acido selenidrico

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

(H₂Se) è il composto centrale da cui dipende l'omeostasi del selenio: esso infatti rappresenta l'intermedio nel quale viene trasformato il selenio di varia provenienza ed è il composto di partenza per i diversi destini metabolici (34).

Per contro il selenio tende a rimpiazzare lo zolfo formando seleno-analoghi degli aminoacidi solforati con inibizione dei sulfidril-enzimi, in particolare di alcune deidrogenasi come la succinico-deidrogenasi. I seleniti possono reagire con i gruppi tiolici della cisteina o del coenzima-A formando selenosolfuri e rendendo inutilizzabili importanti cofattori. Si è formulata un'ipotesi di legame reversibile con i gruppi -SH dell'acetil-CoA e del malonil-CoA del selenito (35). Tutto danneggerebbe i sistemi di respirazione cellulare che comporta una ridotta produzione di ATP (32). Quantità tossiche di selenio provocano anche una diminuzione del glutathione ridotto, in particolare a livello epatico(36).

Incorporazione del selenio nelle selenioproteine

La forma biologicamente attiva del selenio (Fig.1), selenocisteina, viene incorporata nelle proteine co-traduzionalmente durante la sintesi proteica.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

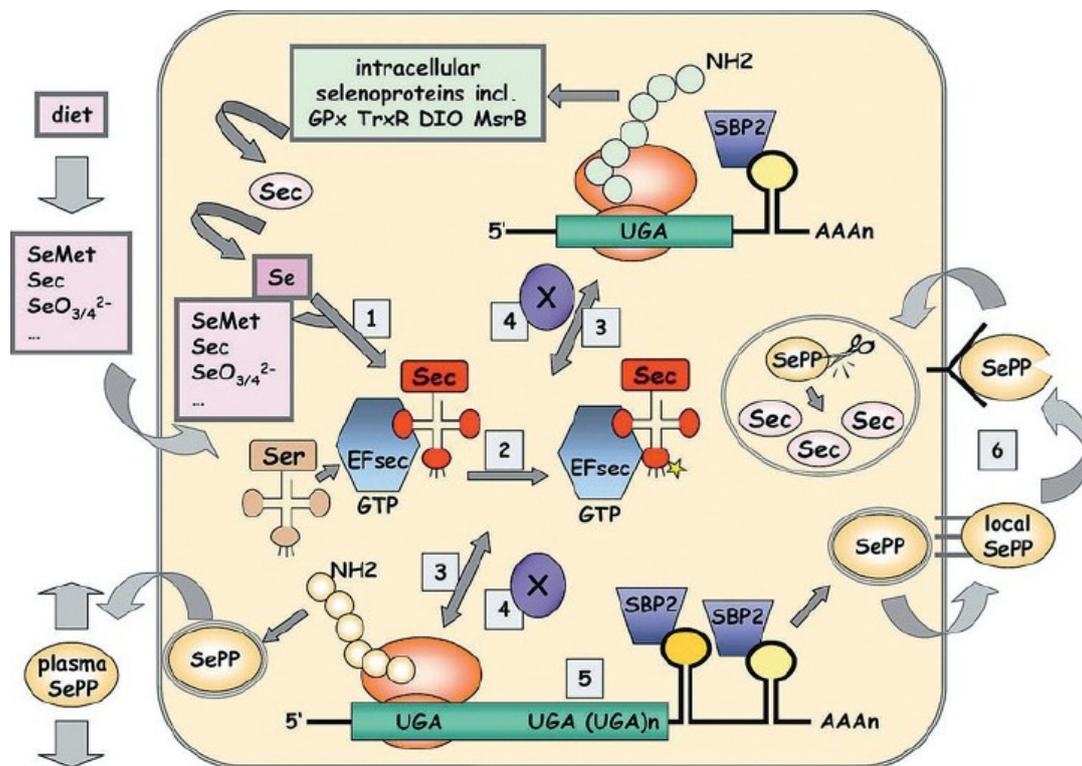


Figura 1. Sintesi del selenio: *pathway* metabolico (Schomburg *et al.*, 2004)

Il meccanismo completo, è stato chiarito nel dettaglio solo nei procarioti ma non completamente negli eucarioti. Esso richiede contemporaneamente la presenza dei prodotti di quattro geni: *SelA*, *SelB*, *SelC* e *SelD* ed il riconoscimento di uno specifico codone (UGA), che normalmente è il codone di stop per la sintesi proteica e che in questo caso funge da segnale per l'inserimento della selenocisteina. A livello di mRNA, è pre-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

sente una particolare struttura a forcina, SECIS (*Selenocysteine Inserting Sequence*), che permette il riconoscimento del codone UGA(37). Tale struttura, nei procarioti, è situata a valle del codone UGA, mentre negli eucarioti giace a livello della regione 3' non tradotta dell'mRNA (3' UTR) (38).

Il primo passaggio nella biosintesi di selenocisteina è la formazione di selenofosfato (SeP) a partire da acido selenidrico ed ATP, ad opera dell'enzima selenofosfato sintetasi, una selenioproteina prodotta dal gene *SeI*D (39).

Il selenofosfato è essenziale per la formazione di selenocistena, a partire da L-serina, mentre l'aminoacido è legato ad uno specifico tRNA (seril-tRNASeCys), per azione dell'enzima selenocisteina sintetasi. Il seril-tRNASeCys è prodotto a sua volta dal gene *seI*C. La selenocisteina sintetasi, prodotto del gene *SeI*A, possiede un residuo di piridossalfosfato che forma una base di Schiff con l'amino gruppo del seril-tRNASeCys. Segue l'aggiunta di selenio, donato da selenofosfato. Si forma così un tRNA caricato con selenocisteina (selenocisteil-tRNASeCys). *SeI*B costituisce un fattore di elongazione specifico, capace di riconoscere la sequenza SECIS a valle del codone UGA e di formare un complesso con selenocisteil-tRNASeCys e con il ribosoma, in modo da inserire la selenocisteina nella proteina nascente. Questo meccanismo, studiato originariamente nei procarioti(40), è stato riconosciuto anche negli eucarioti, in cui l'inserzione co-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

traduzionale di selenocisteina richiede la presenza del “Complesso d’inserzione della selenocisteina” (41). Tale complesso è costituito dal codone UGA, codificante per selenocisteina, dall’ mRNA SECIS della regione 3’ UTR, dal selenocisteil-tRNA^{Sec}, dal fattore di elongazione specifico per la selenocisteina (eEF^{Sec}) e dalla proteina legante l’elemento SECIS, SBP2 (*SECIS Binding Protein 2*), specifica per ciascuna selenioproteina (42).

La disponibilità di selenio condiziona la sintesi delle selenioproteine in modo diverso nei diversi organi. Secondo alcuni Autori (43) questo dipenderebbe dagli elementi SECIS responsabili di una diversa affinità per il complesso di traduzione della selenocisteina e quindi della diversa entità di sintesi delle selenioproteine specialmente quando la disponibilità di selenio è limitata. Altri elementi in grado di condizionare l’espressione delle selenoproteine sono la distanza del codone UGA dall’elemento SECIS e il tipo di basi che stanno immediatamente vicine al codone UGA (44). L’espressione dell’enzima Glutathione Perossidasi è regolata anche dalla stabilità del suo mRNA: in condizioni di selenodeficienza e di ridotta disponibilità di selenocisteil tRNA^{[Ser]Sec} il messaggero dell’enzima ha un turnover aumentato perchè il codone UGA viene interpretato come codone non senso e innesca il meccanismo di degradazione del mRNA mediato dai codoni non senso. Attraverso queste diverse modalità di regolazione della

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: “Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica”

Università degli Studi di Sassari

espressione si crea una vera e propria “gerarchia delle selenoproteine” caratteristica per ciascun organo per cui, anche in condizioni di selenodeficienza, l’espressione di alcune viene privilegiata rispetto l’espressione di altre(45)

Funzione delle selenoproteine

Nei mammiferi sono state identificate venticinque selenoproteine, suddivisibili in gruppi in base alla posizione della selenocisteina nella sequenza (46). Il primo gruppo include selenoproteine in cui la selenocisteina si trova nella parte amminoternale, a livello di un piccolo dominio funzionale. Rientrano in questo gruppo le cinque glutatione perossidasi (GPxs) ed altre sette selenoproteine con varie funzioni.

Gruppo delle glutatione perossidasi:

1. **glutazione perossidasi citosolica** (cGPx o GPx-1), omotetramerica ed ubiquitaria, è stata la prima selenoproteina scoperta, e la forte correlazione osservata tra la concentrazione di selenio negli eritrociti e l’attività dell’enzima glutatione perossidasi (GSHPx), ha fornito il primo marcatore biochimico funzionale dello stato del selenio. GSHPx è presente nel citosol, dove agisce come antiossidante attraverso la riduzione diretta del perossido di idrogeno (H₂O₂) ad acqua ed alcoli.

2. **glutazione perossidasi intestinale** (GI-GPx o GPx-2), omotetramerica, presente nel tratto gastrointestinale, protegge i mammiferi dalla tossicità degli idroperossidi.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: “Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica”

Università degli Studi di Sassari

In studi condotti sugli animali è stato osservato che la carenza di selenio induce una riduzione dell'attività dell'enzima, mentre nell'uomo non è stato riscontrato nessun effetto di questo tipo. GPx2 è la più importante selenoproteina antiossidante presente nel colon, e poiché lo stress ossidativo è un evento critico nella genesi tumorale, questo enzima rappresenta un'importante difesa contro il cancro del colon.

3. **glutazione perossidasi plasmatica** (pGPx o GPx-3), tetrameric, presente nel plasma in forma glicosilata, secreta dal rene, esclusivamente extracellulare è un'altra selenoproteina con un potenziale antiossidante sia nei reni, che nel plasma sanguigno(47, 48).

4. **fosfolipide idroperossido glutazione perossidasi** (PHGPx o GPx-4), monomeric; questo enzima, associato alle membrane cellulari, è responsabile della riduzione distruttiva degli idroperossidi lipidici, degli idroperossidi solubili, nonché del metabolismo del colesterolo, che viene così trasformato in lipoproteine ossidate a bassa densità. Se gli idroperossidi lipidici non vengono ridotti a idrossidi lipidici, possono innescare incontrollate reazioni a catena dei radicali liberi. Vista la sua importanza, l'attività dell'enzima GPx4 è preservata anche quando i tessuti presentano bassi livelli di selenio.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

5. **glutatione perossidasi 6** (GPx-6), recentemente identificata grazie all'analisi *in silico*; nell'uomo è una selenoproteina ma nei roditori presenta una cisteina al posto di una selenocisteina; il trascritto è stato identificato nell'embrione, ma nell'adulto la sua espressione sembra essere limitata all'epitelio olfattivo.

Le glutazione perossidasi rispondono in modo diverso alla seleno-deficienza: GPx-1 e GPx-3 diminuiscono con grande prontezza, mentre GPx-2 e GPx-4 sono risparmiate e vengono rapidamente ripristinate con la seleno-supplementazione.

Gruppo delle tioredossina reduttasi:

Sono enzimi contenenti selenocisteina che catalizzano la riduzione NADPH dipendente della tioredoxina ed hanno anche un ruolo regolatore della sua attività metabolica, infatti, poiché la tioredoxina stimola la proliferazione di cellule normali e tumorali, ed in quest'ultime è presente in alte concentrazioni, un aumento dell'attività dell'enzima TR, potrebbero giocare un importante ruolo nella prevenzione di alcuni tipi di cancro.

Queste sono:

1. **tioredossina reduttasi citosolica** (TR1), ubiquitaria, riduce anche l'acido lipico, la vitamina K3 e l'acido deidroascorbico; potrebbe essere coinvolta nei meccanismi che portano all'apoptosi.

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

2. **tioredossina reduttasi (TR2)**, espressa esclusivamente nel testicolo, a partire dalla pubertà.

3. **tioredossina reduttasi mitocondriale (TR3)**.

Gruppo delle deiodinasi:

1. **iodotironina deiodinasi di tipo I (DI1)**, converte T4 (3, 5, 3', 5'-tetraiodotironina) in T3 (3, 3', 5'-triiodotironina) o in rT3 (3, 3', 5'-triiodotironina), si trova soprattutto in tiroide, ipofisi, rene e fegato; in caso di ipotiroidismo la sua espressione a livello tiroideo aumenta.

2. **iodotironina deiodinasi di tipo II (DI2)**, regola la concentrazione di T3 a livello ipofisario e controlla la secrezione di TSH, si trova in tiroide, cervello, grasso bruno e muscolo scheletrico; aumenta in caso di ipotiroidismo.

3. **iodotironina deiodinasi di tipo III (DI3)**, inattiva T3, è localizzata in cervello, pelle e tessuti fetali; si riduce in caso di ipotiroidismo.

Selenofosfato sintetasi: è l'enzima che catalizza la sintesi di selenofosfato, il substrato donatore di selenio nelle reazioni biologiche.

Seloproteine a funzione ignota:

1. **selenoproteina di 15 kDa**, espressa soprattutto in prostata, fegato, rene, cervello e testicolo, anche in condizioni di seleno-deficienza; secondo alcuni Autori po-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

trebbe essere associata all'azione protettiva del selenio nei confronti dell'insorgenza del cancro.

2. **selenoproteina P**, possiede molte selenocisteine nella struttura primaria; è presente nel plasma ed in alcuni organi e potrebbe svolgere funzione di trasporto del selenio.

3. **selenoproteina W**, si trova nel muscolo e sembra sia implicata nella degenerazione muscolare che ha luogo in caso di selenodeficienza.

Cadmio

Il cadmio è un minerale presente in natura in traccia, tossico, che ha una struttura molto simile a quella dello zinco. Non ha nessuna funzione biologica nel corpo umano ed i suoi effetti tossici nell'organismo vengono tenuti sotto controllo dallo zinco (49).

Circa tre-quarti del cadmio è usato in batterie (soprattutto batterie Ni-Cd) e la maggior parte del quarto restante è usato soprattutto in pigmenti, rivestimenti e placcatura, e come stabilizzatori per plastica. Il cadmio è stato usato specialmente per placcare l'acciaio in cui una pellicola di cadmio spesso soltanto 0.05 millimetri assicura completa protezione contro il mare. Il cadmio ha la capacità di assorbire neutroni, quindi è usato come barriera per controllare la fissione nucleare. Il cadmio negli alimenti si trova principalmente in quelli raffinati come la farina, il riso e lo zucchero bianco. E' presente

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

anche nell'aria, nel fumo di sigaretta e nelle zone inquinate come quelle intorno alle fabbriche di zinco. Inoltre, l'acqua più dolce contiene di solito maggiori quantità di cadmio rispetto all'acqua più dura in quanto assorbe il cadmio dalle tubature metalliche degli acquedotti. Il fumo delle sigarette contiene quantità notevoli di cadmio. Un pacchetto di sigarette deposita da 2 a 4 milligrammi (mg) di cadmio nei polmoni di un fumatore. Una parte del fumo rimane nell'aria e viene inalata nello stesso modo da fumatori e non fumatori. La concentrazione totale di cadmio nell'organismo umano aumenta con l'età e varia nelle diverse aree geografiche. L'assunzione giornaliera di cadmio è stata valutata tra i 13 ed i 24 microgrammi (μg). L'eliminazione giornaliera è di 10 μg /litro. Viene assorbito molto poco, quindi in circostanze normali dal punto di vista alimentare e ambientale, non rappresenta un problema. Il fegato e i reni sono le zone in cui si deposita maggiormente. L'intossicazione da cadmio può essere combattuta col selenio.

Lo zinco è un antagonista naturale del cadmio. Quando si presenta una carenza di zinco nell'alimentazione, il corpo può reagire accumulando il cadmio al suo posto. Se l'assunzione giornaliera di zinco è elevata, lo zinco sarà immagazzinato e il cadmio verrà invece espulso. L'intossicazione da cadmio può essere combattuta col selenio e con gli arginati, contenuti nelle alghe che, combinandosi col cadmio, lo eliminano dal cor-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

po, un procedimento che può prevenire l'avvelenamento. Il cadmio è biopersistente il suo tempo di dimezzamento è di circa 30 anni e può facilmente accumularsi in quantità che provocano sintomi di avvelenamento. L'esposizione prolungata al cloruro di cadmio può causare il cancro. Il cadmio presenta un pericolo di effetti cumulativi nell'ambiente a causa della sua tossicità acuta e cronica. I principali effetti sulla salute constatati sono: disfunzione renale, disturbi della crescita, danni allo scheletro e carenze riproduttive.

È un probabile cancerogeno per l'uomo. Fra gli esposti è stato notato un aumento di tumori della prostata e del polmone.

Le persone sono esposte al cadmio ingerendo cibi contaminati o inalando particelle di cadmio. Quest'ultimo caso si verifica in particolare durante l'esposizione professionale. I paesi industrializzati registrano un assorbimento di cadmio particolarmente elevato nella popolazione generale. Gli studi hanno mostrato che in alcuni paesi, come il Belgio, circa il 10% della popolazione generale presenta concentrazioni di cadmio nel corpo sufficienti a provocare disfunzioni renali. Studi hanno mostrato che le concentrazioni di cadmio nei terreni agricoli, nel grano, nelle ossa umane e nei reni sono aumentate in modo significativo nell'ultimo secolo. Concentrazioni più basse di cadmio con periodi di esposizione più lunghi possono causare avvelenamento cronico da cadmio con

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

conseguenti varie disfunzioni fisiologiche. Sulla base di indagini effettuate su più di 1000 persone nel corso di un periodo di 10 anni, uno studio recente ha confermato che l'esposizione bassa-moderata al cadmio è associata alla demineralizzazione dello scheletro. Ciò porta ad una maggiore fragilità delle ossa e al rischio di fratture(50).

Si sospetta che il cadmio provochi il cancro al fegato, ai polmoni e alla prostata. L'Agenzia internazionale per le ricerche sul cancro (International Agency for Research on Cancer - IARC) ha classificato il cadmio come sostanza cancerogena per le persone (categoria I) (51).

Metabolismo del cadmio

Il metabolismo del Cd possiede innumerevoli eccezionali sfaccettature, mentre l'assorbimento di tale ione mostra un preciso e ben delineato pathway. Soltanto circa il 5% di una dose ingerita viene assorbita dal tratto gastro-intestinale mentre l'assorbimento del Cd nei polmoni è molto alto, così tanto che il 90% della dose viene assorbita negli alveoli polmonari. Una volta assorbito, il Cd viene rapidamente passato nel sangue e concentrato nei vari tessuti(52).

Le principali vie di assorbimento per l'uomo e gli animali sono rappresentate da quella inalatoria e gastroenterica; la prima riveste particolare importanza soprattutto per

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

l'uomo, che può risultare esposto all'elemento per motivi occupazionali(53). L'entità dell'assorbimento del cadmio varia in funzione della via di esposizione, tanto da risultare pari ad un 5% nell'uomo e ad un 1-6% negli animali(54,55,56).

Una volta assorbito il cadmio si lega alle proteine plasmatiche, in maniera preponderante alle albumine e secondariamente alla tioneina circolante, per essere poi distribuito in tutti i tessuti molli, in particolare fegato e rene, nei quali è possibile reperire circa un 50% del contenuto totale (57). Tale accumulo preferenziale è fondamentalmente legato alle elevate concentrazioni di tioneina riscontrabili in questi substrati, le cui cellule possono sintetizzare elevate quantità di proteina. A livello renale i complessi cadmio-tioneina (metallotioneina) (MT), proteine con alta affinità per il Cd, circolanti vanno incontro a fenomeni di pinocitosi, che ne comportano un ingresso all'interno delle cellule tubulari, un catabolismo della frazione proteica ed un successivo legame del cadmio alla tioneina sintetizzata in loco. La tioneina è un α -globulina ricca di cisteina e quindi di radicali sulfidrilici per il quale il metallo ha grande affinità (58).

La Mt è una proteina di trasporto a basso peso molecolare altamente specifica, che veicola il Cd al fegato e da questo ad altri organi, soprattutto ai reni per i quali ha un tropismo elettivo molto stabile conferendo al Cd la sua lunga emivita biologica. Data la sua elevata capacità di legare il Cd e lo Zn, la Mt sequestra il metallo impedendo il le-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

game a siti funzionali più delicati, riducendone considerevolmente la tossicità. Nel sangue l'azione tossica si manifesta con il blocco dei gruppi sulfidrilici di enzimi essenziali e conseguente inibizione della biosintesi dell'eme; ha un'emivita di oltre due ore, si accumula negli eritrociti ed è causa, ad alti dosaggi, di una caduta del contenuto emoglobinico e di una riduzione del numero dei globuli rossi. La Mt ha quindi lo scopo di proteggere il sistema enzimatico cellulare ed è il principale mezzo di trasporto del Cd nel corpo in quanto il legame è altamente selettivo per questo metallo(59).

Il metallo non subisce alcun tipo di reazione metabolica ed i processi di detossificazione che si realizzano nell'organismo consistono fondamentalmente in una segregazione, sotto forma di chelati nei vari distretti. Il fenomeno comporta un'emivita del cadmio che per l'uomo è stata valutata in circa 30 anni, il che porta ad un costante aumento delle sue concentrazioni tessutali nell'arco della vita. Lo scarso assorbimento che il cadmio presenta in sede gastroenterica rende ragione del reperimento nelle feci di circa il 95% del metallo assunto per via orale, ma resta comunque difficile definire la quota realmente allontanata per un mancato assorbimento intestinale e quella connessa con una vera e propria escrezione del metallo assorbito, che può pervenire nel lume intestinale anche tramite la secrezione biliare. Secondo Nordberg et al. (1985) solo lo 0.01-0.02% del carico corporeo viene escreto quotidianamente per via fecale o urina-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

ria. Al proposito va ricordato come la quantità di cadmio effettivamente escreta con le feci e la bile risulti dipendente dalla concentrazione corporea e come ancora la sua presenza a livello urinario assuma significativa importanza solo nell'evenienza di episodi di tossicosi, quando il danno renale che il metallo arreca ne determina un'eliminazione attraverso questa via.

Meccanismo d'azione del cadmio

Il cadmio è in grado di legarsi fortemente ai numerosi ligandi di molecole proteiche enzimatiche, con conseguente alterazione della loro struttura e funzionalità. In particolare Kägi e Hapke (60) hanno delineato una scala di affinità per i diversi ligandi che in ordine decrescente può essere così schematizzata: tiolico (RS-), fosforico (RPO-), > cloridrico (RCI-), > carbossilico (RCOO-). Tale affinità è direttamente proporzionale ai siti leganti presenti sulle molecole interessate, e si dimostra pertanto più elevata per glutathione e metallothioneina. A livello cellulare l'azione del metallo può comportare inibizione delle ossidasi a funzione mista, alterazioni di alcune attività di calcio e del suo trasporto transmembrana, blocco della fosforilazione ossidativa dei mitocondri e variazioni della funzionalità di vari metalloenzimi, quali alcool deidrogenasi, carbossipeptidasi; delta-ALA deidrase, superossido dismutasi (61).

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Le interferenze a carico delle attività si applicano tramite il rilascio ai siti di deposito intracellulare ed un aumento dei livelli di inositol-fosfatasi, probabilmente a seguito di un'interazione con un recettore di membrana (62).

Al proposito va altresì ricordato come il cadmio possa sostituirsi al calcio nel legame alla calmodulina, proteina preposta alla regolazione di numerosi processi calcio-dipendenti, il che si traduce in un'azione calcio-agonista da parte del metallo, che può determinare, in funzione della sua concentrazione, un'attivazione o un'inibizione degli enzimi calmodulino-sensibili, quali la fosfodiesterasi e l'adenosin-trifosfatasi Ca/Mg dipendente; il fenomeno trova convalida nel fatto che un trattamento con calmodulina-inibitori si dimostra in grado di apportare miglioramenti al quadro tossico (63).

La sostituzione dello zinco da parte del cadmio rende invece ragione della sua azione sui metalloenzimi, come comprovato dal fatto che carenze di zinco si traducono in un aggravamento degli effetti tossici (64).

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

L'esposizione al cadmio comporta infine un aumento nella formazione di radicali supe-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

rossido, suscettibili di indurre rotture del singolo filamento di DNA e perossidazione lipidica in vitro e nei tessuti target (65,66).

Sintomi

L'assunzione prolungata di cadmio, anche in piccole dosi, può provocare fenomeni di tossicità cronica. Una volta che è stata introdotta nell'organismo attraverso il cibo, parte di questa sostanza viene assorbita a livello gastro-enterico, per poi accumularsi a livello renale ed epatico. Nonostante il cadmio venga lentamente eliminato attraverso le urine e le feci, se si raggiungono elevate concentrazioni si possono manifestare effetti tossici. Uno dei primi casi di intossicazione da cadmio è quello avvenuto a Fuchu, in Giappone, dove la popolazione, dopo aver consumato per anni del riso contaminato ha sviluppato una sindrome morbosa che è stata denominata "Itai.itai". Tale malattia si caratterizzava per intensi dolori muscolari, disturbi nella deambulazione e danni all'apparato scheletrico. Anche gli organi di accumulo (fegato e rene) avevano subito danni consistenti per via della presenza del tossico nell'organismo. Gli effetti che si hanno a livello dei tessuti ossei è dovuto allo sconvolgimento che il cadmio provoca nei confronti del metabolismo del calcio determinando patologie quali l'osteoporosi e l'osteomalacia(67). Sono state descritte in altri casi anche alterazioni cardiovascolari

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

(ipertensione), cefalea, perdita di appetito, caduta dei capelli, diarrea, anemia e deficit immunologici.

Piombo

Il piombo è l'82° elemento nella tavola periodica di colore grigio-bluastro. Il suo numero atomico è 82 e il peso atomico 207,19 . E' un metallo noto dall'antichità ed è relativamente abbondante sulla crosta terrestre 15-16 mg/kg , dove si trova nel minerale galena (PbS). Il cristallo ha una struttura cubica a facce centrate. Il piombo è un metallo lucido e bluastro; è piuttosto morbido, molto malleabile e duttile ed è un mediocre conduttore di elettricità. E' molto resistente alla corrosione, ma al contatto con l'aria si ossida e annerisce. Tubature di piombo, che portano le insegne dell'impero romano e venivano usate come scarichi dei bagni, sono tuttora funzionanti.

Il piombo ha molteplici utilizzi, che recentemente si cerca di limitare a causa della consapevolezza della sua tossicità e del danno indotto dalla sua dispersione non controllata nell'ambiente(68).

Viene impiegato negli accumulatori, nelle munizioni, nelle tubature, in vernici come il minio, come schermo contro le radiazioni, e in leghe con lo stagno per saldature. Inoltre il piombo può essere prodotto e diffuso come inquinante nell'atmosfera durante l'estrazione e la lavorazione industriale di altri metalli, come argento e oro, bismuto.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Nell'ambiente si rilevano concentrazioni di piombo molto più elevate nei sedimenti (47 mg/kg), nel suolo (16 mg/kg) e nelle acque interstiziali dei primi (36 µg/kg) rispetto a quelle riscontrabili nell'atmosfera e nelle acque libere, per cui i sedimenti devono essere riguardati come i più importanti depositi ambientali. Nelle acque, dove il metallo può pervenire a seguito del dilavamento dei suoli o delle piante, oltre che per un inquinamento diretto, la presenza del piombo, ne comporta una rapida precipitazione sotto forma di carbonati o idrossidi e come chelati con anioni diversi. Quando la corrente dell'acqua è lenta, l'entità di questa presenza raggiunge valori superiori, mentre un flusso elevato comporta un aumento di concentrazioni del metallo nel particolato o in forma libera (69, 70,71).

Il rilascio del metallo dai sedimenti è favorito da un acidità delle acque e dalla loro composizione ionica, mentre una temperatura elevata, un pH basso e una presenza di attività microbiche agevolano la sua organizzazione che si rende responsabile di un'alchilazione che investe non più del 10% del piombo presente e non sembra dipendere dalla concentrazione del metallo (72,73).

Il piombo è un elemento che può agire come veleno esplicando interferenza con svariati sistemi metabolici in particolar modo nelle forme di intossicazione ad andamento cronico e come agente mutageno, cancerogeno e teratogeno, mentre non esiste alcu-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

na segnalazione, reperibile in letteratura, che ne indichi un ruolo fisiologico (74). Episodi di intossicazione cronica da piombo, o saturnismo, vengono riportati già dagli antichi Greci e dei medici arabi (2500 a.c.) ed i primi casi di encefalopatia da esposizione professionale risalgono al 400 a.c. circa (75).

Il piombo è pressoché ubiquitario ed è utilizzato in una grande varietà di prodotti. (76) Nella benzina, ha una funzione di antidetonante in forma di piombo tetraetile ($PbEt_4$) anche se oggi questa va rivestendo importanza sempre minore in ragione di una sua ridotta presenza nei carburanti (74, 77).

Il suo impiego nei pallini di piombo costituisce motivo di accumulo nelle aree aperte all'attività venatoria, ed in particolare nelle zone umide. L'abitudine, tipica di tutte le specie aviarie, di ingerire piccoli sassi per agevolare i processi digestivi nel ventriglio, può determinare nelle specie acquatiche un'ingestione involontaria dei pallini che, oggetto di corrosione a livello gastrico possono rendersi responsabili di massivo rilascio del metallo. Il fenomeno comporta un'elevata mortalità da saturnismo, che può colpire anche i rispettivi predatori, in quanto possono alimentarsi con gli esemplari defedati o deceduti a causa dell'intossicazione (74).

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Metabolismo del piombo

La principale via di assorbimento, attraverso la quale si realizzano la maggior parte delle intossicazioni, è rappresentata dall'apparato gastroenterico, nonostante l'assorbimento per tale via risulti lento ed incompleto, limitazione dell'assorbimento in gran parte dovuta alla formazione di composti insolubili nell'intestino. Tutto questo indipendentemente dal dosaggio, con la sola eccezione dell'uomo, nel quale un suo incremento può comportare un'accentuazione della quota assorbita, che può giungere fino ad un 7%, quando invece il fenomeno opposto sembra verificarsi nel ratto (78,79). L'assorbimento del piombo risulta altresì influenzato dall'attività peristaltica che, quando di entità elevata, si rivelano in grado di ridurre il fenomeno, che subisce viceversa un incremento ad opera della vitamina D (80).

L'assorbimento per via inalatoria interessa soprattutto i lavoratori dell'industria dove il Pb si trova sottoforma di polveri o fumi. In sede broncopolmonare l'assorbimento del metallo pare notevolmente influenzato dalle dimensioni delle particelle inalate. Infatti, mentre le particelle di diametro superiore ai 5 μm si depositano nelle prime vie aeree con successivo allontanamento ad opera del sistema mucociliare, che ne comporta un

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

possibile passaggio nel tratto gastrointestinale e assorbimento per via orale, quelle di dimensioni inferiori raggiungono gli alveoli a livello dei quali vanno incontro ad assorbimento piuttosto rapido che si completa nell'arco delle prime 24 h dopo l'esposizione (81,82,83).

Infine, la somministrazione parenterale di sali di piombo è stata dimostrata, da indagini sperimentali, essere in un loro parziale assorbimento, a causa della persistenza che presentano nella sede di iniezione (84).

Una volta assorbito il piombo si riversa nel torrente circolatorio, proveniente anche dal circolo linfatico, inizialmente a livello plasmatico per poi penetrare rapidamente negli eritrociti, a questo livello si lega all'emoglobina e ad altri componenti cellulari, per una quota che all'equilibrio ammonta al 99% (85).

La distribuzione tessutale del metallo è pari, inizialmente, grazie alla frazione plasmatica libera, ad un 60% nel tessuto osseo, ad un 25% in quello epatico e ad un 4% nel rene; successivamente, invece, la quantità di piombo nelle ossa ammonta al 90%, questo dimostra che la distribuzione iniziale è oggetto di una successiva redistribuzione verso il tessuto osseo; si tratta del cosiddetto "steady state level". Va sottolineato, nel considerare la distribuzione organica del piombo, che questo elemento si dimostra capace di attraversare la barriera placentare, raggiungendo, nel feto, concentrazioni ematiche e

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

tessutali uguali a quelle della madre. Le principali vie d'escrezione del metallo sono quelle urinaria e fecale. L'aliquota di metallo filtrata a livello glomerulare od escreta per trasporto transtubulare costituisce la quota presente nelle urine e la sua entità sembra dipendere, seppure non proporzionalmente, dalla sua concentrazione plasmatica (86,87).

Nelle feci, invece, è reperibile un'aliquota costituita sia dalla frazione di piombo non assorbita che da quella eliminata con la bile quest'ultima sembra poter rappresentare, sulla base dei risultati conseguiti dopo somministrazione endovenosa di piccole quantità di piombo, circa un 80% della dose. Il piombo tetraetile (TEL), grazie alla sua liposolubilità ed alla sua elevata diffusibilità, presenta un rapido assorbimento gastroenterico, respiratorio e cutaneo. Il composto, nell'organismo, viene in piccola parte metabolizzato, con rilascio del metallo e successivo accumulo nei tessuti molli, mentre, come tale, si accumula prevalentemente nel tessuto cerebrale, dato l'elevato tenore di lipidi di questa struttura (75).

Il piombo interferisce con il rame nella sintesi delle catecolamine (adrenalina, dopamina) provocando, soprattutto nei bambini, difficoltà di concentrazione e memorizzazione, oltre che danni cromosomici e minore resistenza alle infezioni. Nell'adulto può causare anemie: inoltre è da prendere in considerazione come fattore di rischio per impor-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

tanti patologie degenerative del sistema nervoso centrale (Parkinson), insonnia, epilessia e patologie di rilevanza psichiatrica (schizofrenia, comportamenti devianti) (88).

Gli studi eseguiti nell'uomo e in animali da laboratorio delineano, al proposito, come il cervello fetale o quello di soggetti giovani sia estremamente più sensibile rispetto all'adulto, in quanto le cellule endoteliali immature che formano i capillari della barriera emato-encefalica del cervello in via di sviluppo presentano una maggior sensibilità agli effetti lesivi del metallo il quale, a seguito anche della minor efficacia della barriera stessa, può raggiungere le cellule cerebrali in formazione in quantità più elevate, ed indurre pertanto danni più rilevanti (19).

Il piombo inibisce rame e ferro nel ciclo di Krebs e quindi può ostacolare la produzione di energia nelle nostre cellule: innalza i livelli di acidi urici dei reni, può inattivare gli ormoni tiroidei.

Il piombo, quindi, lega fortemente i gruppi tiolici (SH), fosforici (PO₄) e carbossilici (COOH) di numerosi ligandi di natura proteica ed in particolare degli enzimi presenti nei globuli rossi, con conseguenti alterazioni funzionali e strutturali. Il legame alle proteine eritrocitarie comporta infatti un aumento di fragilità osmotica dei globuli, in seguito ad un'alterata permeabilità di membrana e di un blocco dell'ATPasi Na/K, queste portano non tanto ad una vera e propria alterazione del metabolismo cellulare, quan-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

to, piuttosto, a decrementi delle dimensioni globulari, per perdita di potassio ed acqua (89,90).

L'azione inibente l'attività di enzimi interessati alla sintesi dell'eme, quali la deidratasi dell'acido δ -aminolevulinico (ALAD), la coproporfirinogeno decarbossilasi e la ferrochelatasi (eme sintetasi), che caratterizzano rispettivamente la trasformazione dell'acido δ -aminolevulinico in porfobilinogeno, del coproporfirinogeno in protoporfirina e di quest'ultima in eme, rinforza l'influenza espletata dal piombo sulla crasi ematica. L'accumulo plasmatico di acido δ -aminolevulinico e di coproporfirina, con conseguente loro escrezione urinaria, nonché l'incremento del contenuto eritrocitario di protoporfirina sono le conseguenze di questa attività (91).

Un decremento a carico dell'attività della ALAD, che può risultare anche del 90%, associato ad una stimolazione della sintetasi dell'acido δ -aminolevulinico, con conseguente suo incremento plasmatico, rappresentano un rilievo caratteristico in corso di intossicazione (92).

Gli studi condotti da Markovac e Goldstein, hanno dimostrato che il metallo è in grado di sostituirsi al calcio nell'attivazione della proteinchinasi C, mentre gli studi condotti su soggetti umani delineano una riduzione delle concentrazioni di eme, responsabile di un'inibizione della triptofano pirrolasi, con conseguente aumento dei livelli di triptofa-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

no, serotonina e acido 5-idrossiindolacetico, il che spiega la neurotossicità del metallo.(93)

Sintomi

Il piombo figura al 2° posto nella lista delle sostanze pericolose indicate dall' ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) nel 1999. La tossicità del piombo è nota da lunghissimo tempo e l'importanza tossicologica del metallo, a differenza di quanto riscontrato in passato, oggi giorno va riguardata prevalentemente da un punto di vista a lungo termine. La composizione della dieta viene segnalata tra i fattori che possono modificare il comportamento tossicologico del piombo, infatti, quote elevate di proteine, di vitamina D, di acido ascorbico e nicotinico, di calcio e di fosfati risultano in grado di diminuire la sensibilità degli animali alle intossicazioni, al contrario, bassi tenori di ferro e calcio favoriscono la mobilizzazione del metallo e carenze di vitamina E si dimostrano in grado di potenziarne l'effetto emolitico (94).

Tossicità acuta

La sintomatologia che caratterizza l'intossicazione acuta da piombo nei mammiferi è la risultante degli interessamenti espliciti a carico del sistema nervoso centrale, gastroenterico e muscolo-scheletrico. A carico del primo si rilevano: alterazioni comportamentali, deambulazione incoordinata, crisi convulsiformi con manifestazioni di pseudo-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

cecità, alternate a fasi stuporose con prostrazione profonda, coma e morte. I principali riscontri connessi con le azioni lesive esplicate a livello gastroenterico sono, invece, anoressia, vomito, diarrea o costipazione, dolori colici e melena. Infine mioclonie e tremori muscolari rappresentano sostanzialmente le conseguenze dell'interessamento muscolo-scheletrico (95).

Il quadro dell'intossicazione cronica è essenzialmente caratterizzato da una riduzione operata a carico dell'attività di vari organi, dell'accrescimento e della durata della vita, nonché da alterazione della funzione renale, riproduttiva, del sistema emopoietico e dell'attività cerebrale. Gli effetti sul rene conseguenti ad esposizioni a lungo termine si manifestano sottoforma di una nefropatia irreversibile, quando invece il disturbo causato da una esposizione acuta, riscontrato soprattutto in soggetti giovani, è di tipo reversibile. Clinicamente si manifesta una sindrome tipo Fanconi accompagnata da proteinuria, ematuria e cilindruria. La nefropatia da piombo è accompagnata inoltre, più frequentemente di quanto succede in altre disfunzioni renali croniche, da iperuricemia e gotta (96). A carico della funzionalità renale si rilevano, inoltre, fenomeni nefritici e aminoaciduria, glicosuria e fosfaturia possono essere rilevate già per concentrazioni ematiche pari a 1.5 ppm. Indagini condotte al proposito delineano danni strutturali nei mitocondri che esitano in un alterato utilizzo dell'energia con aumentato consumo di

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

ossigeno per una riduzione dei livelli di citocromo nelle cellule renali (97, 98). I riscontri autoptici mettono in evidenza erosione e riduzione del tessuto renale. La nefropatia da piombo è caratterizzata, istologicamente, da tipiche inclusioni nucleari nelle cellule circostanti il tubulo prossimale, costituite da complessi piombo-proteina che compaiono precocemente e che si dissolvono dopo terapia con agenti chelanti, imputabili, quindi, al meccanismo detossificante del metallo. Rispetto agli effetti che si realizzano a carico del sistema emopoietico a seguito di esposizioni a lungo termine, l'anemia viene ritenuta effetto tossico meno grave, soprattutto qualora se ne consideri la reversibilità. Alterata produzione di emoglobina, stimolazione dell'eritropoiesi nel midollo osseo con ritardo nella maturazione dei globuli rossi, alterazioni morfologiche a carico delle cellule del midollo e conseguente incremento delle cellule basofile con anomalie nucleari e degli eritrociti anormali circolanti rappresentano le conseguenze determinate dal piombo a livello emopoietico (99). Infine, l'azione del piombo a carico del sistema nervoso determina demielinizzazione e degenerazione assonale, alla quale si associano alterata permeabilità vasale con edema cerebrale, essudazione sierosa ed alterazione del metabolismo energetico delle cellule. Il nucleo striato, i lobi occipitali, il midollo spinale e i nervi motori e sensoriali risultano particolarmente interessati (100).

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Effetti con altri metalli.

Il Cd ostacola il metabolismo del Ca alterando il metabolismo della vitamina D nel rene.

Un apporto adeguato di Ca può aiutare o revertire l'osteomalacia indotta dal Cd. Da segnalare l'azione inibitrice del Cd sull'assorbimento del Fe. Il Cd lega anche il GSH deprotonando il gruppo SH, eliminando la difesa antiossidante operata dal glutatiene.

Nell'organismo umano il magnesio è presente nelle ossa (il 60% circa del totale) e nei muscoli. La carenza di magnesio provoca una tetania causata da un'alterata trasmissione neuromuscolare. Gli ioni magnesio sono antagonisti a quelli del calcio, favorendo la depressione del sistema nervoso centrale e periferico: un abbassamento dei valori di magnesio (con calcio nella norma) aumenterebbe la produzione di acetilcolina diminuendone anche la velocità di idrolisi con aumento dell'irritabilità neuromuscolare. Il piombo interferisce con il rame nella sintesi delle catecolamine (adrenalina, dopamina), inoltre inibisce rame e ferro nel ciclo di Krebs e quindi può ostacolare la produzione di energia nelle nostre cellule: innalza i livelli di acidi urici dei reni, può inattivare gli ormoni tiroidei.

Il Cu è necessario all'utilizzazione del Fe per la sintesi dell'emoglobina. La sua carenza dà quindi anemia, specialmente nei bambini. Tale evenienza è tuttavia rara, soprattutto negli adulti, perché l'apporto dietetico è, di norma, sufficiente. Il selenio protegge

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

dai danni causati da metalli pesanti, favorisce la chelatura (rimozione e metabolizzazione)dei metalli tossici come piombo, cadmio, mercurio, arsenico.

Progetto AKea

Gli studi finora condotti dalla Cattedra di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica dell'Università degli Studi di Sassari nel campo della longevità umana si propongono di ottenere dati epidemiologici, biologici e genetici essenziali per comprendere quali fattori incidono maggiormente nello sviluppo delle malattie età correlare e quali, al contrario, promuovono il cosiddetto invecchiamento con successo. Tale progetto, avviato nel 1997, è conosciuto in tutto il mondo con il nome AKeA, acronimo di "A Kent'Annos", affermazione diffusa in tutta la Sardegna che augura una lunga vita, oltre cent'anni, è considerato di notevole importanza nel campo della medicina dell'invecchiamento ed è diretto dal Prof. Luca Deiana. Lo studio ha consentito di individuare finora oltre 1.800 sardi ultracentenari, tra vivi e morti, e di inserirli in un "Archivio di Longevità della Sardegna". L'obiettivo generale del progetto di ricerca proposto è quello di determinare parametri ed analiti biologici e genetici di salute e longevità nella popolazione sarda, caratterizzata da un indice di longevità tra i più elevati al mondo. Lo studio è in continua estensione e integrazione di ricerche condotte dal

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

gruppo di Studio AKeA e da altri gruppi coinvolti nello studio della longevità umana (101).

I risultati che potranno derivare dallo studio, oltre a consentire una migliore comprensione del fenomeno “longevità” da un punto di vista multidisciplinare, saranno utilizzabili ai fini di un miglioramento delle condizioni di salute della popolazione sarda. In particolare, a livello istituzionale, sono state coinvolte, insieme all’Università degli Studi di Sassari e alla Regione Autonoma della Sardegna, le Province, i Comuni, le Comunità Montane, gli Enti Locali e l’Ordine Regionale dei Medici, la Chiesa Cattolica per la ricerca di approfondimento nella consultazione dei “libri” esistenti nelle parrocchie della Sardegna, anche in relazione ai contributi che essi potranno fornire in termini di coinvolgimento e condivisione delle popolazioni, al perseguimento delle finalità del progetto, nonché di apporto tecnico-operativo nelle attività di ricerca documentale, demografica, statistica e genealogica. Nonostante la longevità umana sia attualmente oggetto di numerose ricerche in tutto il mondo i fattori che stanno alla base di tale fenomeno sono in gran parte sconosciuti. Vi sono ipotesi che, sia fattori genetici che ambientali, concorrano nel selezionare questo carattere. Data la lunga storia di isolamento dalle altre popolazioni e bassa immigrazione, il pool genico sardo può essere considerato molto stabile. Insieme ad uno stile di vita relativamente uniforme in tutta l’isola, que-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: “Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica”

Università degli Studi di Sassari

ste caratteristiche danno alla Sardegna un particolare vantaggio nello studio dei centenari. La nostra ricerca ha avuto come oggetto il censimento di tutti i centenari viventi in Sardegna. I risultati di tale studio, rappresentativo dell'intera popolazione sarda, hanno dimostrato chiaramente che in tale popolazione la prevalenza di centenari è tra le più alte al mondo e negli ultimi dieci anni oltre 40 soggetti hanno superato i 105 anni e tre individui di sesso maschile hanno addirittura oltrepassato la soglia dei 110 anni (supercentenari). In alcune zone interne, soprattutto nelle aree montuose e isolate, la prevalenza è di 15 centenari per 100.000 abitanti, pari a due volte circa quella dei paesi scandinavi, da tempo ritenuti tra i paesi a più alta longevità in Europa, e il rapporto donne/uomini è estremamente basso. In particolare nell'area centrale della Sardegna, con una popolazione di 200-300mila abitanti, la mortalità maschile dopo gli 85 anni è addirittura inferiore a quella femminile. Se nel resto d'Italia ed in occidente il rapporto donne/uomini è di 1 a 4, se non addirittura di 1 a 7, nell'Isola è generalmente al di sotto di 1 a 2, per diventare paritetico nelle aree interne. Si tratta di peculiarità non ancora del tutto spiegate e l'ipotesi è che tali differenze non siano dovute solo ai geni ma anche a fattori ambientali. Come è noto, la popolazione sarda è unica per quanto riguarda gli aspetti genetici, numerosi studi hanno da tempo chiarito che la popolazione sarda è caratterizzata da deriva genetica, basso flusso immigratorio ed elevate abitudini-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

ni endogamiche, e presenta di conseguenza un pool genico più omogeneo rispetto a quello di altre popolazioni europee. Inoltre in questa popolazione esistono malattie genetiche specifiche quali α - e β -talassemia, carenza di glucosio-6-fosfato deidrogenasi, diabete mellito di tipo I, malattia di Wilson e sclerosi multipla con prevalenza particolarmente elevata. Nel corso dello studio effettuato nell'Istituto di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica dell'Università di Sassari, sono state reclutate tutte le persone viventi in Sardegna, nate prima del 1° gennaio 1898 sulla scorta delle liste anagrafiche disponibili presso i 377 comuni sardi. Sono state contattate le famiglie dei centenari sia direttamente sia attraverso il medico di base. La data di nascita dei centenari è stata confermata attraverso i registri dell'archivio di stato civile, i registri battesimali dell'archivio diocesano, con un documento della previdenza sociale e con la testimonianza diretta dei familiari. Lo studio a tutt'oggi continua e consta di due fasi: una prima fase nella quale, utilizzando i registri di stato civile e le liste anagrafiche dei 377 comuni sardi, sono stati identificati i luoghi di residenza delle persone più longeve dell'intera regione, un campione di individui anziani di origine sarda appartenenti a varie fasce di età. In particolare il campione nella sua complessità comprendeva tutti gli ultracentenari viventi di ambo i sessi, e una corrispondente coorte di anziani appaiati per sesso e nati rispettivamente nel 1907, 1912 e 1922. Gli individui che hanno accon-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

sentito di partecipare alla ricerca sono stati intervistati. Durante l'intervista veniva utilizzata una cartella clinica standardizzata che mirava a raccogliere i dati demografici, informazioni sulla composizione della famiglia, sullo stile di vita e le patologie correlate alla famiglia stessa, informazioni sull'esposizione a tradizionali fattori di rischio e anamnesi patologica remota e prossima dell'individuo oggetto di studio il più possibile accurata, anamnesi farmacologia, al termine dell'intervista veniva eseguito un esame obiettivo e una valutazione dello stato cognitivo; successivamente e previo accertamento del consenso dell'intervistato o di un familiare responsabile, veniva eseguito un prelievo di sangue dal quale veniva poi estratto il DNA genomico. In Sardegna sono presenti delle aree geografiche nelle quali il fenomeno della longevità è presente in misura particolarmente rilevante; in tali aree è verosimile che esistano fattori genetici o ambientali che tendono a favorire la longevità. Sono situate nella parte centro-settentrionale dell'isola e attualmente il nostro gruppo è impegnato a definirne con precisione l'estensione geografica e i caratteri biodemografici. Si sta effettuando un'analisi delle statistiche di mortalità. Si è rilevato che la provincia di Nuoro è la sola in tutta l'Italia nella quale la mortalità maschile è inferiore a quella femminile oltre gli 85 anni e che i circa 120 comuni della zona centrale della Sardegna costituiscono una zona nella quale la mortalità maschile oltre gli 80 anni è inferiore a quella femminile.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Viene quindi eseguita una raccolta di dati clinico-biologici nella popolazione bersaglio. A tale proposito si utilizza una cartella clinica informatizzata, già sperimentata nella prima fase dello studio. I dati epidemiologici, biologici e genetici che il nostro progetto di ricerca si propone di ottenere sono essenziali per comprendere quali fattori incidono maggiormente nello sviluppo delle malattie età-correlate e quali, al contrario, promuovono il cosiddetto invecchiamento con successo. Essendo stata la Sardegna definita «l'isola dei centenari» (102), questo progetto potrà avere una notevole ricaduta sul territorio, portando a conoscenza fattori che promuovono la salute. La raccolta di variabili demografiche e geriatriche relative a soggetti che hanno raggiunto un'età molto avanzata, consentirà di pianificare al meglio gli interventi di strategia sanitaria che competono più specificamente all'amministrazione regionale. Inoltre questo studio, orientato verso gli aspetti biologici e genetici dell'invecchiamento umano, si colloca all'interno di una serie di iniziative cui partecipano numerosi gruppi scientifici impegnati nella ricerca dei cosiddetti "geni della longevità". Per spiegare tali particolarità, sono state formulate molte ipotesi, come fattori genetici, la qualità della vita o un particolare regime alimentare, i quali, in concomitanza con i fattori ambientali, potrebbero svelare il segreto di tale longevità.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Proprietà nutraceutiche degli alimenti

E' ampiamente riconosciuto che vari prodotti alimentari aiutino a mantenere un buono stato di salute e a prevenire malattie croniche (103). E' noto inoltre che alcuni alimenti propri della filiera sarda (vino, olio, formaggio, frutta e verdura) possiedono proprietà nutraceutiche (nutrienti e terapeutiche assieme), antiossidanti ed antineoplastiche. Diversi studi hanno dimostrato chiaramente che c'è una correlazione tra il consumo di frutta e di ortaggi e, riduzione delle patologie cardiache, di forme comuni di cancro ed altre malattie degenerative, così come l'invecchiamento (104,105). Le evidenze più importanti riguardano il ridotto rischio di cancro nel cavo orale nella faringe, nell'esofago, nella milza, nel colon e nello stomaco. I dati disponibili, inoltre, forniscono un grosso supporto al ruolo protettivo della frutta e dei vegetali contro il cancro del pancreas, della vescica e del seno (106, 107). Questi effetti benefici sono attribuiti al fatto che questi alimenti possedano allo stato fresco un mix ottimale di antiossidanti naturali, di fibre ad altri composti. Per quanto riguarda la categoria dei germoplasmi, le pere sarde hanno la caratteristica di avere maggiori proprietà antiossidanti e migliori caratteristiche organolettiche al momento dell'ammazzamento.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Quest'ultimo è un processo di ulteriore maturazione della frutta dopo il raccolto, a seguito del quale la polpa diventa bruna, molle e zuccherina, spesso necessario per renderla gradita.

La frutta analizzata, è diffusa nelle aree geografiche ove è stata riscontrata una elevata incidenza di ultra-centenari e sono il risultato di una millenaria co-evoluzione e selezione da parte della popolazione locale. Dall'intervista effettuata su ogni soggetto è risultato che la frutta in esame assieme al vino e al formaggio venivano consumati quasi quotidianamente. Per quanto riguarda le pere il consumo si effettuava durante il periodo di maturazione (giugno-novembre) rappresentando una parte importante nella dieta. Inoltre, la conservazione in ambiente fresco (cantina, scantinati, soffitta etc.) di alcune qualità con maturazione tardiva (fine settembre-inizio novembre), ne consentiva il consumo fino alla primavera successiva.

Caratteristiche delle pere

La pera è un frutto apprezzato da un'ampia schiera di consumatori per gusto, fragranza e succosità. A livello nutritivo contiene una buona quantità di zuccheri semplici (fruttosio di rapida assimilazione), tannino, sali minerali, acido malico e citrico, oltre che

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

composti fenolici ad azione antiossidante. Di grande digeribilità, la pera svolge un'azione diuretica, stomachica, rinfrescante e lassativa è particolarmente indicata nell'alimentazione di giovani ed anziani.

Le pere sono fonti eccellenti di fibre idrosolubili, (forniscono circa il 16% delle fibre necessarie al nostro fabbisogno quotidiano) fra cui la pectina. Questa è una fibra capace di indurre un senso di sazietà, infatti, unendosi all'acqua, forma una consistente massa all'interno dello stomaco, bloccando così la sensazione della fame, e facilitando di conseguenza il rispetto dei regimi alimentari. La pectina inoltre, regolando il passaggio del glucosio dall'intestino al sangue, contribuisce a tenere sotto controllo il livello di glicemia e ne assicura un lento ma continuo assorbimento evitando bruschi innalzamenti. Aiuta la muscolatura intestinale a spingere i residui lungo l'intestino; inoltre lega ed elimina le tossine presenti in esso, favorisce la perdita di peso, abbassa il colesterolo favorendo in tal modo una maggiore fluidità del sangue. L'elevato contenuto di potassio, fa della pera un alimento molto utile ai fini di prevenire disturbi quali tensione arteriosa, depressione, stanchezza. La pera è costituita per l'85% da acqua; per questo motivo l'assunzione di questo frutto rappresenta un valido ausilio per soddisfare il fabbisogno giornaliero di liquidi del nostro organismo (un litro di acqua al giorno). Il calcio ed il fosforo, presenti anch'essi in grande quantità, svolgono un'azione protettiva sulle ossa,

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

prevenendo o aiutando a combattere l'osteoporosi. Le proprietà diuretiche della pera, derivano dall'elevato contenuto di potassio, associato alla scarsità di sodio e rafforzate dal notevole tenore di acqua. Il succo di pera produce un effetto depurativo, diuretico, eliminatore dell'acido urico e rimineralizzante; è consigliato a chi soffre di anemia o di sovraffaticamento.

Importante è quindi l'aspetto nutrizionale e funzionale che può aver contribuito al preservare la perdita della biodiversità delle pere sarde (108). Infatti, se consideriamo i moderni criteri adottati per i programmi di miglioramento genetico basati quasi esclusivamente sull'aspetto estetico e produttivo, come è avvenuto negli ultimi 20-40 anni, la maggior parte delle accessioni autoctone della Sardegna sarebbero da tempo scomparse. Tanto è vero che l'erosione delle varietà autoctone Sarde, un tempo molto diffuse, ha avuto inizio solamente in questi ultimi 40 anni (109, 110). Per il pero sardo, il fenomeno dell'ammezzimento, noto come 'internal breakdown' (imbrunimento interno), è ritenuto un processo degenerativo e come tale tutte le varietà portatrici del carattere sono state escluse dai programmi di miglioramento genetico dando luogo ad una rapida erosione varietale. Questo processo non è altro che un'ulteriore maturazione della frutta dopo la raccolta, a seguito del quale la polpa diventa bruna, molle e zuccherina, spesso necessario per renderlo gradito (111).

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Caratteristiche del Formaggio

Nei secoli il comparto lattiero caseario sardo si è evoluto e trasformato, accettando suggerimenti esterni, ha ripensato la propria tradizione, avendo cura delle usanze custodite nella memoria dei suoi anziani.

In Sardegna ciò che non è mutato è l'ambiente naturale, da cui provengono le materie prime ed il latte in particolare. Mettendo in tavola i propri prodotti ogni popolazione spiega la cultura dalla quale proviene. In Sardegna è così forse ancor più che in altre parti del mondo. Dai tempi arcaici dei nuraghi e delle domus de janas, la pastorizia ha costituito la sola forma di sopravvivenza di una popolazione forte e schietta, per la quale le greggi rappresentavano la ricchezza di generazioni. In Sardegna capi ovini e bovini vengono ancora allevati in un territorio dove l'inquinamento atmosferico e del suolo registra tassi assolutamente nulli. I sardi sono maestri nel produrre formaggi: è così sin dai tempi dei cartaginesi, dei fenici e dei romani. La loro sapienza casearia s'incontra con quella che si può definire una paleobiologia ambientale. Infatti agricoltura e pastorizia sarde sono attualissime da millenni perché i principi delle metodologie biologiche, sono gli stessi che hanno da sempre determinato i canoni di coltivazione dei campi e di produzione di alimenti base in tutta la Sardegna che assieme al vino e

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

alla frutta formano un'inseparabile triade di cibi antichissimi e proprio per questo attualissimi. I formaggi stagionati sono inoltre ricchi di oligoelementi (zinco, rame, selenio) indispensabili agli enzimi spazzini (scavengers) che neutralizzano i cancerogeni.

Caratteristiche dei Vino

La Sardegna e il vino, possiedono un legame forte e antico che affonda le sue origini nel passato nuragico e forse anche più in là. Recenti studi su reperti archeologici rinvenuti in alcuni siti nuragici propongono l'affascinante tesi della presenza di attività enologiche già in quell'epoca. Altri studi definiscono l'importante ruolo svolto dalla Sardegna nella domesticazione della vite selvatica, a cui contribuirono i popoli che, giungendo in quest'isola nel corso dei secoli, introdussero l'arte di pratiche agronomiche ancora sconosciute(112).

In Sardegna il vigneto è parte integrante del paesaggio. E' presente quasi ovunque, dalle pianure più fertili vicino al mare sino all'alta collina e alle zone più interne dove spesso la coltivazione della vite è ancora magicamente legata ad antiche tradizioni. La vitivinicoltura ha sempre svolto un ruolo importante nell'economia agricola sarda.

La particolare conformazione orogenetica e territoriale di questa regione consente una viticoltura moderatamente intensiva, caratterizzata da una produzione enologica di e-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

levata qualità che in alcune aree particolarmente favorite raggiunge spesso l'eccellenza. E' quasi certo che la vitis vinifera, al pari dell'olivo, sia in Sardegna una pianta indigena, selvatica, tanto che i popoli sopraggiunti non portarono il ceppo o il sarmento, bensì l'arte dell'innesto, della coltivazione, e le tecniche di produzione e di conservazione del vino. Studi clinici hanno evidenziato che il consumo regolare e moderato di bevande fermentate come il vino (uno o due bicchieri al giorno) è associato a minore incidenza di malattie cardiovascolari (CVD) (113, 114) l'ipertensione, diabete e di alcuni tipi di cancro, tra cui quello al colon, alle ovaie, e il carcinoma prostatico. Benefici dovuti principalmente alla componente non alcolica (polifenoli). che determina un aumento della capacità antiossidante e anti-infiammatoria. Sono stati riscontrati inoltre cambiamenti nel profilo lipidico, dovuti agli effetti prodotti da questa bevanda alcolica (99). Il vino rosso è una miscela complessa contenente numerosi composti fenolici. Ciò solleva la questione delle entità chimiche effettivamente responsabili degli effetti benefici. Ci sono prove che in particolare il resveratrolo sia in grado di fornire benefici per la salute. Naturalmente esistono grandi differenze tra i diversi vini rossi, che hanno proprietà nutraceutiche anche a seconda delle uve e della zona in cui sono cresciute.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Capitolo 2

SCOPO DEL LAVORO

Questo lavoro si inserisce nell'ambito del progetto di ricerca dal titolo "La biodiversità degli alimenti autoctoni della Sardegna nella longevità: ricerca proteomica, metabolomica e di biologia molecolare sui campioni biologici dei centenari sardi e sui campioni della dieta" (B. Al. AkeA) L. R. 7 Agosto 2007.

L'obiettivo di questo studio è quello di verificare, la presenza di alcuni metalli pesanti, come cadmio e piombo, e di metalloidi, come il selenio in alcuni alimenti sardi di produzione propria sicuramente presenti nella dieta dei soggetti studiati. In una seconda fase ci si è occupati dello studio dei tre metalli nel plasma dei soggetti che hanno fatto uso dei suddetti alimenti, con particolare riferimento ad un range di età compreso tra i 60 ed i 100 anni e più. Lo studio è stato esteso con la quantificazione di altri metalli presenti nel plasma. Con la valutazione enzimatica della glutatione perossidasi plasmatica abbiamo voluto osservare meglio l'attività antiossidante selenio-dipendente.

I campioni di plasma da noi analizzati provengono dalla "biobanca della longevità" e tutti i dati riguardanti età, sesso, stili di vita dei soggetti studiati sono stati estrapolati "dall'archivio della longevità" appartenente al progetto AKeA.

Com'è noto il nostro gruppo di ricerca si occupa da anni di studiare sia il profilo genetico che l'impatto ambientale sulla longevità della popolazione Sarda. Da sempre il progetto AKeA ci ha impegnato nella valutazione anche clinica dei centenari sardi. da porre potenzialmente in correlazione con le abitudini di vita ed alimentari.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Capitolo 3

Materiali e Metodi

Frutta

Le accessioni autoctone di pero, studiate, nell'ambito del progetto, sono state scelte tenendo conto della diffusione e dell'importanza che rivestivano in passato nell'alimentazione.

Tutte le qualità sotto esame erano diffuse nelle aree geografiche ove è stata riscontrata una elevata incidenza di ultra-centenari e sono il risultato di una millenaria co-evoluzione e selezione da parte della popolazione locale. La frutta in esame veniva consumata quotidianamente durante il periodo di maturazione (giugno-novembre per le pere) rappresentando una parte importante nella dieta. Inoltre, la conservazione in ambiente fresco (cantina, scantinati, soffitta etc.) di alcune pere con maturazione tardiva (fine settembre-inizio novembre), ne consentiva il consumo fino alla primavera successiva.

La particolarità che rende differenti le cultivar da frutto attualmente commercializzate (per esempio: 'Coscia', 'Decana' etc.) da quelle autoctone è la netta superiorità delle proprietà funzionali e nutrizionali (elevata attività antiossidante, proprietà antisettiche, elevato contenuto in polifenoli totali etc.) di queste ultime. Particolare attenzione va data alle accessioni di pero, caratterizzate da un elevato contenuto in tannini (causa

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

dell'astringenza) e dal presentare il fenomeno dell'ammezzimento durante la conservazione (Figura 2). Oggi, eccezion fatta per alcune accessioni (Camusina, Miali, Appio, Limoninca), la maggior parte di esse sono reperibili *in situ* solamente in pochi esemplari. Sicuramente, la selezione è avvenuta tenendo conto dell'adattamento ambientale, della resistenza alle malattie e della facilità di propagazione. Non va comunque sottovalutato l'aspetto nutrizionale e funzionale che può aver contribuito al preservare la perdita della biodiversità. Infatti, se consideriamo i moderni criteri adottati per i programmi di miglioramento genetico basati quasi esclusivamente sull'aspetto estetico e produttivo, come è avvenuto negli ultimi 20-40 anni, la maggior parte delle accessioni autoctone della Sardegna sarebbero da tempo scomparse.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari



Figura 2 Fenomeno dell'ammazzamento

Tecniche di prelievo pere

I frutti sono stati raccolti *in situ*. La raccolta è avvenuta quando i frutti avevano raggiunto la maturazione di consumo o per alcune pere quando avevano raggiunto la maturazione fisiologica (dimensioni, colore, forma tipica dell'accessione). Per le pere astringenti, l'epoca di raccolta risulta anticipata rispetto al momento del consumo. In questi casi le pere sono state conservate fino alla totale scomparsa dell'astringenza ('De Su Duca', 'Vacchesa', 'Natalina') o in alcuni casi fino al completo ammezzimento ('Meana', 'Olzale'). I frutti sono stati suddivisi in 3 repliche omogenee tenendo conto della posizione nell'albero, dimensione, grado di maturazione e albero da cui erano stati prelevati i singoli frutti. In tale modo si è garantito che ogni replica rappresentasse

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

effettivamente un campione omogeneo dell'accessione. I frutti sono stati pesati, snocciolati, tagliati in e immediatamente congelati in azoto liquido e liofilizzati. Dopo la liofilizzazione sono stati confezionati sotto vuoto e conservati a -35°C fino alle analisi.

Le analisi hanno riguardato anche la % di sostanza secca e delle ceneri.

Tecniche di prelievo formaggi

Il campionamento, e la modalità di prelievo e di utilizzazione dei campioni di formaggio è stata eseguita secondo riferimento bibliografico (G.U., 1986).

Per l'effettuazione delle analisi chimiche non è necessario che l'attrezzatura e i contenitori siano sterili. I contenitori possono essere recipienti o involucri in fogli, entrambi costituiti da materiali impermeabili all'acqua ed ai grassi e devono essere tali da non alterare l'odore, il sapore o la composizione del campione.

Il numero di prelievi deve essere sufficiente a dare un campione globale di almeno 1000g da suddividere in 5 aliquote omogenee di almeno 200g ciascuna.

A seconda del tipo di formaggio, della consistenza e delle dimensioni della forma, del peso, del tipo e del grado di maturazione e tenore di umidità è necessario utilizzare

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

tecniche (taglio di una fetta, prelievo con una sonda o prelievo del formaggio intero) e attrezzi differenti.

Per i formaggi a pasta dura o di sufficiente consistenza sono consigliate le seguenti tecniche:

Prelievo con coltello;

Prelievo con sonda;

Prelievo di una forma intera od unità di vendita.

Il prelievo con sonda è preferibile nel caso di prodotti a pasta dura di grossa pezzatura o spediti in recipienti.

Prelievo con coltello

Con un coltello si praticano due tagli radiali a partire dal centro del prodotto se a base circolare, o paralleli allo scalzo se a base rettangolare, in modo da ottenere due spicchi contrapposti (Figura 3).

Prelievo con sonda

In base alle dimensioni del formaggio viene inserita una sonda di opportuno diametro. La sonda viene fatta ruotare in modo da fare un giro completo e ritirata una volta riempita (Figura 4).

Prelievo di forme intere

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Questo metodo viene applicato a prodotti di piccole dimensioni o a porzioni confezionate ed impacchettate in piccoli contenitori; vengono prelevati un numero di porzioni sufficienti ad ottenere un campione globale il cui peso sia almeno di 1000g.

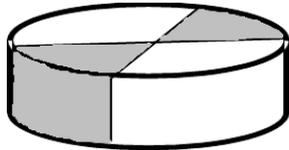


Figura 3; Campionamento da forma a sezione trasversale circolare

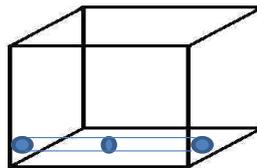
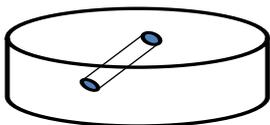


Figura 4; Campionamento da forma cilindrica e forma cubica per mezzo sonda.

Confezionamento del campione

Il campione globale di almeno 1000g, (tasselli, spicchi, piccole porzioni intere ecc.,) subito dopo il prelievo viene suddiviso in 5 aliquote omogenee di almeno 200g ciascuna e confezionato in appositi contenitori.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Trasporto del campione

I campioni devono pervenire in laboratorio entro 24 ore dal prelievo in contenitori refrigerati e coibentati a temperature non superiori a 10°C. Se il prodotto è deperibile facilmente il trasporto deve essere effettuato a temperature comprese tra 0°C e 5°C.

Conservazione dei campioni in laboratorio

Se le analisi vengono eseguite subito i campioni devono essere tenuti in frigorifero ad una temperatura tra 0°C e 5°C, altrimenti ciascun campione va congelato tempestivamente ad una temperatura inferiore a -10°C. In ogni caso è consigliabile effettuare le analisi il più presto possibile.

Preparazione del campione per l'analisi

Prodotti duri e semiduri

Eliminare la crosta, la vernice e lo strato superficiale di muffa del prodotto in modo da ottenere un campione rappresentativo e sminuzzarlo con un apparecchio adatto (grattugia o macinino elettrico).

Prodotti molli

Utilizzare un mortaio di porcellana se necessario per omogeneizzare, rimescolando ripetutamente con il pestello.

Come per le pere i campioni di formaggio dopo la preparazione sono stati pesati, e immediatamente congelati in azoto liquido e liofilizzati. Dopo la liofilizzazione sono

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

stati confezionati sotto vuoto e conservati a -35°C fino al successivo passaggio di incenerimento.

Preparazione dei campioni di frutta e formaggi per la determinazione degli elementi minerali

L'analisi dei campioni per i metalli pesanti è stata eseguita presso il Laboratorio di Igiene nel Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università degli Studi di Sassari.

I campioni sono pervenuti nei nostri laboratori già liofilizzati e pronti per essere inceneriti.

Le ceneri sono state preparate in accordo con la G.U. n° 229 del 02-10-1986.

Il metodo si basa sull'incenerimento di una aliquota del campione da analizzare. Il processo avviene in ambiente ossidante (all'aria) alla temperatura di $550-560^{\circ}\text{C}$ e si effettua fino alla completa combustione della sostanza organica fino al raggiungimento di una massa costante.

Procedimento:

1) Pesata del campione in una capsula tarata, per i formaggi si fa una preriscaldamento per almeno 4 ore a 105°C , per i campioni vegetali tale pre-riscaldamento non è necessario;

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

2) Pre-incenerimento, il campione nella capsula viene sottoposto a bruciatura lentamente favorendo una lenta combustione del materiale ed evitando la fuoriuscita del campione;

3) Incenerimento: le capsule con i campioni bruciati vengono posti nel forno (muffola) a 550-560 °C fino alla completa combustione delle particelle carboniose. L'incenerimento si completa in 6 ore. Tab. 1

Tabella 1 Rampa temperature incenerimento muffola

Tempo	Temperature
2 ore	90 °C
2 ore	150 °C
2 ore	300 °C
6 ore	550°C

Le capsule vengono tolte dal forno e messe a raffreddare in un essiccatore fino a raggiungimento della temperatura ambiente, a quel punto si effettua rapidamente la pesata della capsula evitando che le ceneri acquistino umidità dall'aria. Le pesate sono sta-

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

te fatte con la bilancia di precisione, la pesata è stata ripetuta dopo 15 min di riscaldamento in stufa a 105°C e il peso risulta la media delle due pesate.

Il contenuto in ceneri come % viene calcolato come segue:

$$\text{Ceneri} = m_1/M_0 \times 100$$

m_1 = massa in grammi del residuo;

M_0 = massa, in grammi dell'aliquota del campione sottoposto all'incenerimento.

Preparazione campione per lettura AAS

La determinazione del cadmio, piombo e selenio è stata effettuata mediante spettrofotometria di assorbimento atomico (Perkin Elmer, AS-71) con fornello di grafite pirolitica, e correzione del fondo per effetto Zeeman longitudinale (4100 ZL) equipaggiata con auto campionatore e piattaforma di L' v o v.

La procedura delle determinazioni prevede l'uso del modificatore di matrice preparato precedentemente miscelando 2000mg/l di $\text{NH}_4 \text{H}_2\text{PO}_4$ e 207 mg/l di $\text{Mg}(\text{NO}_3)_6\text{H}_2\text{O}$.

Per la determinazione dei metalli il vino è stato utilizzato tal quale secondo il protocollo usato da Zsolt et al (115).

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

I campioni di ceneri di frutta e formaggi da analizzare sono stati sospesi in HNO₃ e acqua milli-Q.

La soluzione così preparata è stata poi trasferita negli alloggiamenti dell'autocampionatore.

Il metodo prevede che ogni campione vengano effettuate tre ripetizioni lette in doppio.

Le concentrazioni dei metalli pesanti è stata espressa in milligrammi per chilo peso umido (mg/Kg wet wt).

Spettrofotometria ad Assorbimento Atomico (AAS)

La spettrofotometria di assorbimento atomico si basa sull'assorbimento, da parte degli atomi degli elementi, di alcune radiazioni di una determinata lunghezza d'onda. L'assorbimento atomico, seguito da un processo di rilassamento che avviene per via non radiante (termica) o radiante (emissione di radiazioni), è direttamente proporzionale all'intera popolazione di atomi presenti nel cammino ottico e quindi alla concentrazione dell'elemento nel campione. Lo spettrometro per assorbimento atomico funziona per emissione di un raggio che attraversa il sistema di atomizzazione (Fig. 4), dove è contenuto il campione analita allo stato di gas atomico, e arriva al monocroma-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

tore (M), che elimina le radiazioni che non interessano. Infine la radiazione monocromatica passa al rivelatore (R). La luce dalla sorgente viene modulata mediante un chopper. La modulazione viene fatta in modo da distinguere la luce emessa dalla lampada dalla luce emessa dall'atomo eccitato.

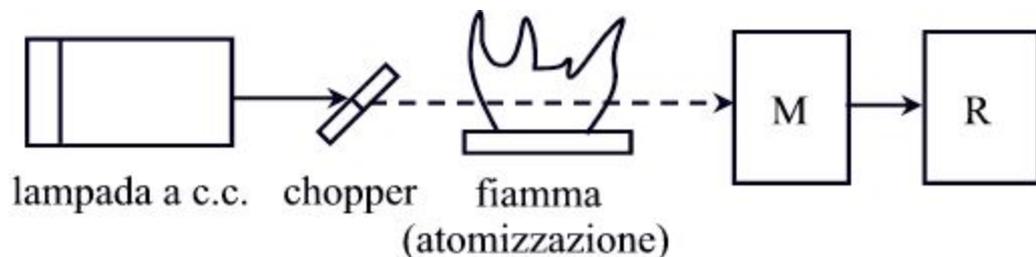


Fig. 4: Rappresentazione schematica del funzionamento di uno spettrometro ad assorbimento atomico

Misura del Piombo, Cadmio e Selenio (Assorbimento atomico a fornello di grafite)

Il sistema di atomizzazione è un a fornello di grafite. Si tratta di un sistema che consente di abbassare notevolmente (1000 volte) i limiti di rilevabilità rispetto ai metodi classici da atomizzazione a fiamma, consentendo di lavorare su aliquote molto piccole

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

di campione. Un piccolo volume di campione viene introdotto nel tubo di grafite che si trova posto sul cammino ottico della radiazione emessa dalla sorgente. Nel tubo fluisce un gas inerte, che espelle l'aria rendendo l'atmosfera non ossidante e quindi adatta a far rimanere gli atomi del campione allo stato fondamentale. Il tubo viene riscaldato elettricamente secondo un programma a tre stadi (evaporazione, incenerimento, atomizzazione) condotti a temperature crescenti. La misura di assorbimento viene fatta sui vapori atomici che si liberano rapidamente nello stadio finale del riscaldamento. Il segnale che si ottiene è un picco la cui area (altezza) è direttamente proporzionale alla massa dell'analita. Per l'analisi del Piombo è stata utilizzata una linea di assorbimento di 283.3 nm, mentre per il Cadmio 228.8 nm, per il Selenio 196 nm.

Campioni di plasma

Si è partiti inizialmente dall'osservazione della distribuzione dei centenari in tutta la Sardegna. Ci siamo poi concentrati nell'area dove la percentuale di soggetti longevi era maggiore. Lo studio è stato condotto in una zona della Sardegna centrale. La composizione etnica dell'area in studio è stabile essendo composta in massima parte da nativi. Sono stati reclutati 173 soggetti di cui, 95 femmine e 78 maschi, di età compresa tra i 60 e i 100 anni, sono stati sottoposti al prelievo ematico usando un BD vacutainer contenente EDTA e con un ago in acciaio inossidabile. Una parte del campione (sangue in-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

tero) è stata conservata a -80°C e una parte (plasma), dopo la centrifugazione, è stato anch'esso conservato a -80° fino all'analisi.

Ogni partecipante, dopo aver firmato il consenso informato, ha risposto ad un questionario. Sono stati rilevati i seguenti dati personali: età, sesso, peso, altezza e possibili fattori di rischio: attività lavorativa, abitudini di vita, fumo, alcool, hobby, zona di residenza, anamnesi familiare, tipologie di farmaci usati.

Si è rivolta particolare attenzione all'acquisizione di dati inerenti la dieta attraverso molteplici domande del questionario.

Nel nostro lavoro abbiamo preso in considerazione le categorie appartenenti ai fumatori e ai bevitori di vino.

Su un campione totale di 173 soggetti 28 dichiarano di essere fumatori mentre 11 sono ex fumatori, 2 fufano tabacco e tutti bevono vino.

Glutatione perossidasi plasmatica GPX3.

È una selenioproteina che catalizza la reazione di detossificazione degli idroperossidi (H_2O_2 o ROOH) in presenza di glutatione (GSH). Il sangue umano contiene, oltre agli enzimi eritrocitari (Se-GPX), una glutatione perossidasi plasma-specifica (pl-GPX). La *glutatione perossidasi plasma-specifica* è un tetramero di circa 94-100 kDA. Ogni unità contiene un sito attivo con un residuo di Selenocisteina. Questa selenioproteina diffe-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

risce dall'altra glutatione perossidasi per la sua sequenza primaria, la sua regione N-terminale glicosilata e la sua dislocazione extracellulare. Inizialmente è stata riscontrata solamente dal plasma, ma poi è stata rilevata anche nel latte umano.

Il glutatione perossidasi plasmatica GPX3 è immunologicamente distinta da quella presente negli eritrociti presenta inoltre alcune differenti proprietà fisiche e cinetiche

L'analisi della misurazione nel siero di GPX3 può dare alcuni vantaggi per la diagnosi di alcune malattie metaboliche.

Preparazione dei campioni per saggio ELISA per GPX3

Il Kit GPX3 (human, AdipoGen) è usato per l'analisi quantitativa della GPX3 in fluidi biologici. Un anticorpo policlonale specifico è presente all'interno dei 96 pozzetti. Dove vengono poste diverse concentrazioni di standard e i campioni. Durante l'incubazione a 37°C per un'ora gli anticorpi specifici si legano alla GPX3 presente nel campione di plasma. Dopo incubazione si effettuano diversi lavaggi per rimuovere l'eccesso. La GPX3 è riconosciuta con l'aggiunta di uno specifico anticorpo policlonale purificato (anticorpo di rilevazione). Dopo rimozione dell'eccesso viene aggiunto l'anticorpo policlonale coniugato HRP anti-IgG (Detector Labeled Streptavidin). A seguito di un lavaggio finale, l'attività perossidasi è quantificata mediante l'aggiunta di 3,3', 5,5'-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

tetrametilbenzidina (TMB). La reazione avviene con cambiamento di colore che viene quantificato a 450 nm dopo acidificazione. Il valore dell'assorbanza ottenuto è direttamente proporzionale alla concentrazione di GPX3 nei campioni.

Preparazione dei campioni per SF-ICP-MS

Tutti campioni di plasma sono stati diluiti con acqua deionizzata (fattore di diluizione 1 a 20).

Le soluzioni così ottenute sono state analizzate tramite la tecnica della spettrometria di massa a plasma accoppiato induttivamente, SF-ICP-MS (ThermoFischer, Brema, Germania), (SF-ICP-MS Sector Field Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry).

Il cadmio e il piombo sono stati quantificati usando, rispettivamente, le masse 114 e 208. In entrambi i casi la quantificazione è stata effettuata usando la modalità della bassa risoluzione ($m/\Delta m=300$). in quanto le due masse analitiche sono libere da interferenze ioniche o isobariche provenienti dal plasma, reagenti e matrice.

Il selenio è stato quantificato usando la massa 82. In questo caso, la sua determinazione è stata ottenuta usando la modalità della alta risoluzione ($m/\Delta m=10000$). L'uso di tale risoluzione si è resa necessaria perché la massa 82 è interferita da specie poliatomiche (es. $^{40}\text{Ar}^{42}\text{Ca}$) non separabili dal segnale del selenio a risoluzioni minori.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

La standardizzazione interna con indio (In) alla massa 115 alla concentrazione di 1 µg/l in soluzione e la curva di calibrazione costruita usando un pool dei campioni stessi sono state usate per controllare la deriva strumentale e gli effetti matrice.

E' stato analizzato, inoltre, un materiale di riferimento certificato a base di plasma (Plasma control della serie ClinChek Control, Recipe, Monaco, Germania). Il recupero era compreso tra il 88% e 98%.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Tabella 2. Condizioni operative per l'analisi tramite e SF-ICP-MS

Strumento	ELEMENT, Thermo Finnigan, Brema, Germania
Radiofrequenza	1200 W
Nebulizzatore pneumatico	Meinhard con camera di raffreddamento di tipo Scott
Flussi dei gas (L min ⁻¹)	plasma, 13; ausiliario, 0,5; nebulizzatore, 0,7
Risoluzione (m/ Δ m)	BR,300; MR,3000
Finestra di massa	BR, 150%; MR, 100%
Finestra di ricerca	BR, 100%; MR, 80%
Finestra di integrazione	BR, 80%; MR, 60%
Numero di scansioni	25 per ciascuna risoluzione

BR: bassa risoluzione; MR: media risoluzione

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Capitolo 4

RISULTATI

Il campione era composto da 173 soggetti di cui 78 maschi e 95 femmine con età compresa tra 60 e 100 anni. I partecipanti sono stati divisi in base al sesso, età, abitudine al fumo, e consumo di vino. L'associazione tra questi è stata analizzata con il coefficiente di correlazione da cui è emersa una correlazione negativa fra Se e bevitori ($r = -0.15$, $p < 0.05$).

Non sono state osservate differenze significative tra i livelli di Cd, Se, Pb nel sangue nei soggetti non fumatori e fumatori. Sono stati calcolati anche i coefficienti di correlazione tra i vari metalli.

Sono presenti correlazioni positive fra Cd e Se ($r = 0,206$, $p < 0.05$), Cd e Pb ($r = 0,485$; $p < 0.01$), Cd e Fe ($r = 0,253$; $p < 0.01$) e Cd e Ca ($r = 0,0347$; $p < 0.01$), fra Se e Fe ($r = 0,361$; $p < 0.01$) Se e Ca ($r = 0,425$; $p < 0.01$) e fra Pb e Fe ($r = 0,371$; $p < 0.01$), Ca e Pb ($r = 0,312$; $p < 0.01$). Mentre vi è correlazione negativa fra Cu e Fe ($r = - 0,279$; $p < 0.01$) (Tab.3)

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Tabella 3. Coefficiente di correlazione per tutti i metalli

		Fe	Cu	Ca	Se	Cd	Pb
Mg	Pearson Correlation	,239**	,068	,099	,105	,050	,113
	Sig. (2-tailed)	,002	,373	,195	,168	,512	,139
	N	173	173	173	173	173	173
Fe	Pearson Correlation	1	-,279**	,317**	,361**	,253**	,371**
	Sig. (2-tailed)		2,044E-04	2,104E-05	1,097E-06	,001	4,883E-07
	N	173	173	173	173	173	173
Zn	Pearson Correlation	,242**	-,065	,321**	,092	,765**	,463**
	Sig. (2-tailed)	,001	,395	1,649E-05	,230	1,704E-34	1,359E-10
	N	173	173	173	173	173	173
Ca	Pearson Correlation	,317**	,062	1	,415**	,347**	,312**
	Sig. (2-tailed)	,000	,416		1,365E-08	2,838E-06	2,940E-05
	N	173	173	173	173	173	173
Se	Pearson Correlation	,361**	-,056	,415**	1	,206**	,043
	Sig. (2-tailed)	,000	,465	,000		,006	,578
	N	173	173	173	173	173	173
Cd	Pearson Correlation	,253**	-,035	,347**	,206**	1	,485**
	Sig. (2-tailed)	,001	,652	,000	,006		1,306E-11
	N	173	173	173	173	173	173

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

I valori plasmatici di Cd, Se e Pb si trovano all'interno dei limiti di riferimento. I campioni sono stati suddivisi in fasce di età per osservare meglio il comportamento di tali metalli. Si è notato che le concentrazioni di Cd per tutte le fasce di età nei soggetti studiati sono statisticamente significative rispetto ai controlli sessantenni.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

I valori dei centenari a loro volta sono statisticamente significativi rispetto a tutte le altre fasce di età avendo valori di Cd più alti. Tab. 4, Fig. 3.

Tabella 4: IC- 95% per il Cd

Cd	mean	std. Er.	95% conf.intrv.
60 a	0,388	0,041	0,3-0,47
80 a	0,153	0,005	0,14-0,16
90 a	0,155	0,005	0,14-0,16
95 a	0,144	0,006	0,13-0,15
100 a	0,21	0,017	0,17-0,24

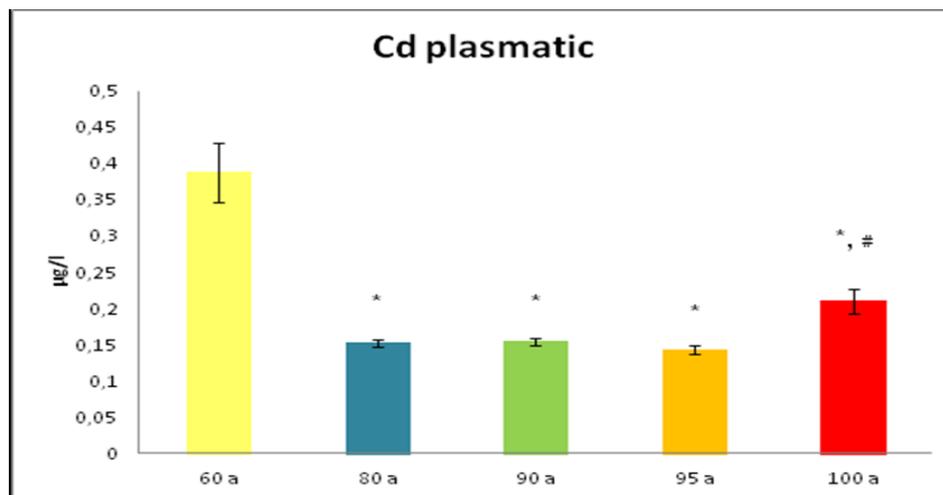


Figura 3. Valori del Cd plasmatico per fasce di età

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

I valori dei livelli plasmatici di Se risultano significativi nelle fasce di età dei novantacinquenni e dei centenari. Tab 5, Fig. 4.

Tabella 5: IC- 95% per il Se

Se	mean	std. Er.	95% conf.intrv.
60 a	112,6	5,12	102,02-123,17
80 a	102,5	4,27	93,67-111,34
90 a	96,57	3,4	89,55-103,58
95 a	89,19	3,83	81,31-97,08
100 a	84,625	2,28	80,08-89,16

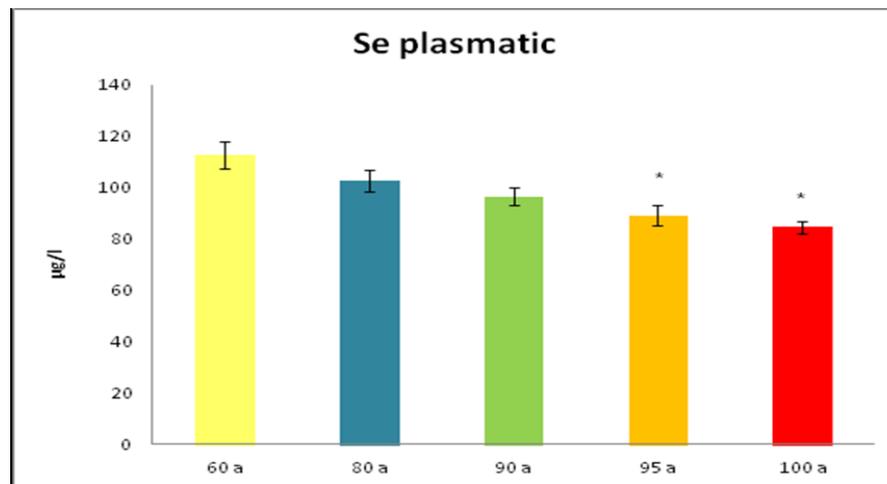


Figura 4. Valori di Se plasmatico per fasce di età

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Sono risultati significativi anche i valori del piombo nei novantacinquenni e nei centenari.

Tab. 6, Fig. 5.

Tabella 6: IC-95% per il Pb.

Pb	mean	std. Er.	95% conf.intrv.
60 a	0,424	0,029	0,37-0,477
80 a	0,2	0,023	0,158-0,250
90 a	0,182	0,017	0,146-0,218
95 a	0,249	0,033	0,184-0,315
100 a	0,329	0,0268	0,27- 0,38

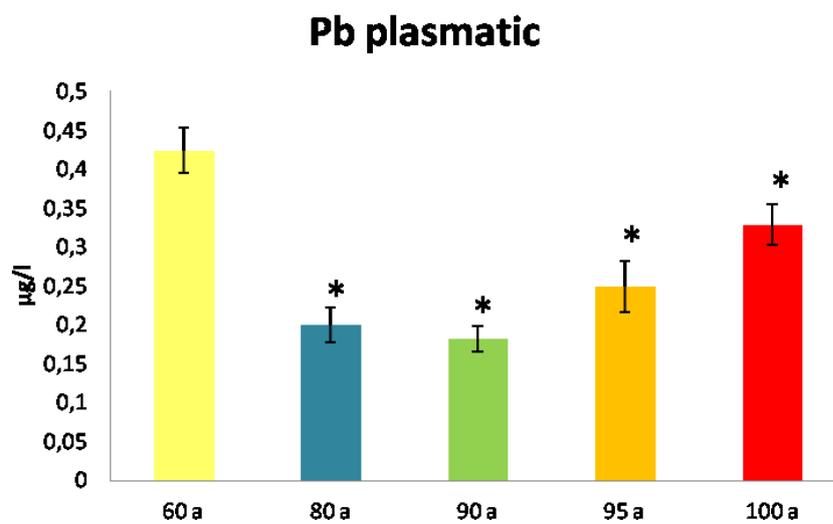


Figura 5. Valori di Pb plasmatico per fasce di età

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Analizzando la concentrazione dei metalli negli alimenti, i risultati mostrano che i valori ottenuti sono conformi a quanto prescritto dal Regolamento (CE) n. 629/2008. I metalli contenuti nel vino sardo, risultano essere generalmente più bassi rispetto ai valori di altri vini europei ed extraeuropei trovati in letteratura.

Da uno studio condotto in Ungheria le concentrazioni dei metalli nei vini si trovano all'interno di un range compreso tra 6-90 µg/l per il Pb e tra 0,05-10,5 µg/l per il Cd.

(115). (Tab 7).

Tabella 7. Valori medi dei metalli negli alimenti analizzati.

Variable	mean	Std.Dev	Min	Max
Pb pere mg/kg	0,006128	0,007393	0	0,028
Cd pere mg/kg	0,000343	0,00036	0,00003	0,0018
Pb vino µg/l	14,48534	18,48534	0,2	75
Cd vino µg/l	0,125	0,05	0,1	0,2
Pb formaggio mg/kg	0,076	0,072	0,0189	0,223
Se formaggio mg/kg	0,08	0,0546	0,016	0,16

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Dal saggio enzimatico effettuato per la GPX3 i risultati sono in linea con i valori di Se nel plasma (Fig 6).

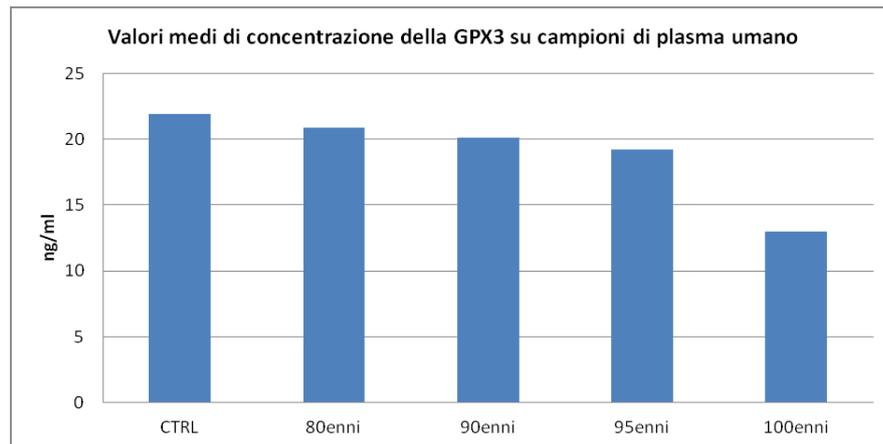


Figura 6. Valori medi GPX3 nel plasma.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Determinazione IC 95% per Mg, Fe, Cu e Ca

Sono stati inoltre calcolati gli intervalli di confidenza IC 95% per tutti gli altri metalli nel plasma. (Tab:8, 9, 10, 11)

Tabella 8. CI 95% per il Mg

Mg	mean	std. Er.	95% conf.intrv.
60 a	23524,67	730,26	21251,9-25797,43
80 a	19566,4	359,9	18888,01-20244,79
90 a	20186,4	388,4	19409,93-20962,87
95 a	19203,08	464,7	18292,24-20113,91
100 a	20630,45	401,7	19814,6-21446,29

Tabella 9. CI 95% per il Fe

Fe	mean	std. Er.	95% conf.intrv.
60 a	1319,2	95	1149,19-1489,206
80 a	946,7	53,1	844,73-1048,701
90 a	833,5	58,38	716,80-950,23
95 a	838,53	69,15	702,98-974,088
100 a	800,89	44,55	710,42-891,36

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Tabella 10. CI 95% per il Cu

Cu	mean	std. Er.	95% conf.intrv.
60 a	1148,73	46,6	1065,024-1232,442
80 a	1164,8	46,21	1076,054-1253,706
90 a	1214,8	39,41	1135,97-1293,625
95 a	1145,8	45,91	1055,858-1235,835
100 a	1219,7	27,78	1163,37-1276,203

Tabella 11. CI 95% per il Ca

Ca	mean	std. Er.	95% conf.intrv.
60 a	93783,33	1769,3	90617,58-96949,09
80 a	87684,8	1311	85170,93-90198,67
90 a	87236	1433,7	84371-90102,51
95 a	88556,9	1556,8	85505,5-91608,34
100 a	87556,1	892,7	85743,39-89368,85

Dall'elaborazione dei dati è risultato che le concentrazioni di tali metalli nel plasma rientrano nei limiti di riferimento. Nel Fe e nel Ca i valori risultano statisticamente significativi rispetto ai controlli per tutte le fasce di età.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

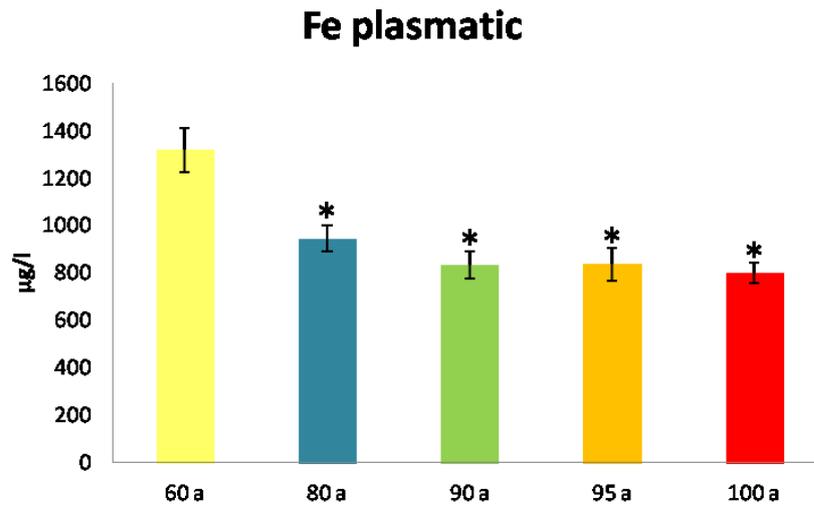


Figura 7: Valori di Fe nel plasma

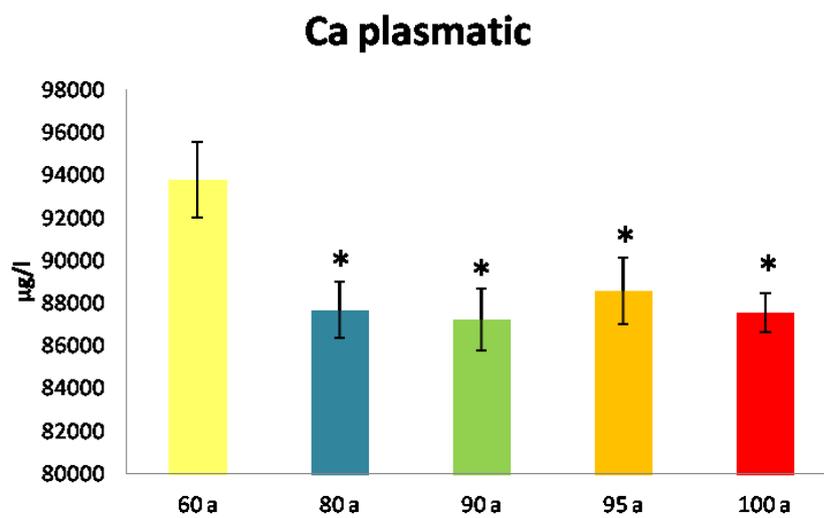


Figura 8. Valori di Ca nel plasma

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Capitolo 5

DISCUSSIONE

Il progetto AKeA ci ha impegnato nella valutazione anche clinica dei centenari sardi. Negli ultimi anni in particolare ci siamo soffermati altresì sulla valutazione e correlazione dello stato di salute dei centenari con le abitudini di vita ed alimentari. È noto che alcuni alimenti possiedono proprietà nutraceutiche che possono offrire una protezione dai danni causati dall'invecchiamento. Nel nostro corpo possono entrare in tracce attraverso acqua, aria e cibo arrecando danni da accumulo. Alcuni di questi elementi, come rame, selenio e zinco, sono essenziali per mantenere un corretto metabolismo nelle cellule eucariotiche, tuttavia in concentrazioni maggiori sono tossici.

Dalla quantificazione di metalli come, Cd, Pb e Se in alcuni alimenti della filiera sarda (vino, formaggi e frutta) presenti nella dieta dei soggetti studiati e lo studio degli stessi metalli nel plasma dei pazienti che hanno fatto uso dei suddetti alimenti, emerge come le aree monitorate risultino poco contaminate da questi elementi.

Non sono presenti nei fumatori differenze significative di livelli plasmatici di Cd, Se, Pb ($p > 0.05$), mentre è emersa una correlazione negativa fra Se e bevitori ($r = -0.15$, $p < 0.05$). Poiché il campione da noi scelto fa uso abituale di frutta e durante la stagione, in particolare pere sarde, questi risultati potrebbero giustificare eventuali meccanismi responsabili del ruolo benefico della frutta (116) che ha la proprietà ormai note di aumentare le concentrazioni plasmatiche di antiossidanti naturali. Diversi studi hanno trovato una correlazione inversa tra l'assunzione di vitamine antiossidanti e di tossicità di cadmio (117, 118).

Studi epidemiologici dimostrano un'associazione inversa tra il fumo di sigaretta e l'insorgenza Morbo di Parkinson (119, 120). A tal riguardo, sono stati evidenziati diversi meccanismi con cui la nicotina potrebbe avere un ruolo protettivo: stimolare il rilascio di dopamina (121), stimolare direttamente i recettori nicotinici presinaptici, inibire enzimi come la monoammino-ossidasi e preservare i neuroni nigrali da metaboliti tossici prodotti enzimaticamente (122).

Il Cd, Pb e Se interagiscono a livello metabolico anche con altri elementi. Il Cd ad esempio può sostituirsi al calcio nel legame alla calmodulina, proteina preposta alla regolazione di numerosi processi calcio-dipendenti, il che si traduce in un'azione calcio-agonista da parte del metallo, che può determinare, in funzione della sua concentra-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

zione, un'attivazione o un'inibizione degli enzimi calmodulino-sensibili, quali la fosfo-diesterasi e l'adenosin-trifosfatasi Ca/Mg dipendente; il fenomeno trova convalida nel fatto che un trattamento con calmodulina-inibitori è in grado di apportare miglioramenti al quadro tossico. L'intossicazione da Cd e Pb può essere contrastata dal Se. Il Pb invece, può sostituire il Fe nella ferritina intestinale, oppure, può sostituire il Ca in tutti quegli enzimi o in quelle proteine che vengono attivati dal Ca.

Interferisce con il Cu nella sintesi delle catecolamine (adrenalina, dopamina) provocando, difficoltà di concentrazione e memorizzazione, oltre che danni cromosomici e minore resistenza alle infezioni. Nell'adulto può causare anemie ed è un fattore di rischio per importanti patologie degenerative del sistema nervoso centrale: Parkinson, insonnia, epilessia e patologie di rilevanza psichiatrica (schizofrenia, comportamenti devianti). Inoltre inibisce Cu e Fe nel ciclo di Krebs e quindi può ostacolare la produzione di energia nelle nostre cellule, innalzare i livelli di acidi urici dei reni, inattivare gli ormoni tiroidei. Una concentrazione elevata di proteine, vitamina D, acido ascorbico e nicotinic, Ca e fosfati nella dieta viene segnalata tra i fattori che possono modificare il comportamento tossicologico del Pb. Infatti, un'alta quantità di tali molecole è in grado di diminuire la sensibilità degli animali alle intossicazioni, al contrario, bassi tenori di Fe e Ca favoriscono la mobilizzazione del metallo e carenze di vitamina e si dimostrano in grado di potenziarne l'effetto emolitico.

Abbiamo quindi deciso di correlare i valori plasmatici di Cd, Se e Pb con i valori di Fe, Ca, Mg e Cu.

Risultano significativi i coefficienti di correlazione fra Cd e Se ($r=0,206$, $p<0.05$), Cd e Pb ($r=0,485$, $p<0.01$), Cd e Fe ($r=0,253$, $p<0.01$) e Cd e Ca ($r=0,0347$ $p<0.01$), fra Se e Fe ($r=0,361$ $p<0.01$) Se e Ca ($r=0,425$ $p<0.01$) e fra Pb e Fe ($r=0,371$ $p<0.01$), Pb e Ca ($r=0,312$ $p<0.01$). I valori dei livelli plasmatici dei metalli nei soggetti analizzati rientrano nei limiti di riferimento.

Il Cd e il Pb sono elementi biopersistenti che hanno la tendenza ad accumularsi negli anni nell'organismo, tendendo successivamente a diminuire con l'età (123). L'assimilazione di tali metalli tende a diminuire anche perché di solito l'anziano mangia meno (124). Anche i livelli di selenio nel plasma tendono ad abbassarsi nei soggetti an-

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

ziani, diminuendo così la capacità di difesa dagli stress ossidativi con conseguente invecchiamento cellulare. Abbiamo perciò diviso i campioni in fasce di età per osservare il comportamento di tali metalli nelle diverse classi.

Dalle osservazioni fatte risulta che i valori di Cd e Pb nei centenari sono, ad esclusione dei controlli, più alti rispetto alle altre fasce di età e cioè va in contrasto con le informazioni in letteratura. Il Cd risulta statisticamente significativo rispetto ai controlli e a tutte le altre fasce di età. Anche per il Pb, i valori nelle diverse fasce di età sono significativi rispetto al controllo.

I valori di selenio risultano statisticamente significativi solo per il gruppo dei centenari benché i loro valori diminuiscano con l'età sono conformi a ciò che si asserisce in letteratura.

I livelli plasmatici degli altri metalli, nei soggetti studiati, rientrano nei valori di riferimento.

Anche la valutazione enzimatica della GPX3 è in linea con i livelli plasmatici di Se.

Analizzando le concentrazioni dei metalli negli alimenti, i risultati di questo monitoraggio appaiono rassicuranti sotto il profilo del rischio di contaminazione del suolo, acqua e aria. I valori sulla concentrazione dei metalli negli alimenti, sono conformi a quanto prescritto dalla legge.

Nel vino sardo risultano essere generalmente più bassi rispetto ai valori di altri vini europei ed extraeuropei trovati in letteratura.

Da quanto descritto si può concludere che:

La longevità umana è una caratteristica così complessa che la durata della vita può essere influenzata da diversi fattori, primo fra tutti quello genetico, ma anche dalla capacità dell'organismo di attivare le difese antiossidanti e di riparazione del DNA, e la resistenza ad una vasta gamma di malattie, come quelle cardiache, demenza, cancro e ictus.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

La posizione geografica della Sardegna e la montuosità del suo territorio hanno fatto sì che nella popolazione sarda, si siano venute a rafforzare particolari caratteristiche antropologiche e geniche favorite dall'isolamento, dall'endogamia e dall'azione di particolari processi evolutivi quali la deriva genetica.

Tuttavia, in considerazione dei grandi cambiamenti che stanno avvenendo nella struttura, per età della popolazione in tutto il mondo, è sempre più importante capire la natura dei fattori genetici che favoriscono la longevità umana, consentendoci di capire meglio la natura complessa dell'invecchiamento. L'opportunità di rispondere a queste domande all'interno di studi come quelli effettuati con il progetto AKeA in Sardegna, rappresenta un grande passo in avanti.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

Capitolo 6

BIBLIOGRAFIA

1. Wayland M. (2000): *Metals as threats to wildlife* in *Short course on wildlife toxicology*. Canadian Cooperativew Wildlife Centre. Saskatoon, 1-3 March 2000
2. Friberg L., et al., "*Cadmium in the environment*", C.R.C. Press.1971.
3. Friberg L., et al., "*Cadmium in the environment*", II Ed. C.R.C. Press., 1974
4. Friberg L., et al., "*Handbook on the toxicology of metals*", Elsevier, 1979
5. Benes S., Spevackova V., Smid J., Cerna M., Marecek J.: "*The concentration levels of Cd, Pb, Hg, Cu, Zn and Se in blood of the population in relation to the Czech Republic*". Cent. Eur. J. Publ.Health 8, 2000.
6. Jarup L.: "*Cadmium overload and toxicity*". Nephrol Dial Transplant 17(Suppl 2), 35 – 39, 2002.
7. Jarup, L. *Hazards of heavy metal contamination*. Br Med Bull. 2003.
8. Arnaud J., Ducros V., Guillelmin C., Vidailhet M., Wilke B.C., *Selenium glutathione peroxidase and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation*, Clin.Chem. Acta, 1998.
9. Pleban P.A., Munitami A., Beachim J., *Determination of selenium concentration and glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes*, Clin. Chem, 2002.
10. Cornelis R., Versieck J., *Normal levels of trace elements in human blood or serum*, Anal. Chim. Acta, 2005.
11. Underwood E.J. *Trace elements in human and animal nutrition*. 4. Ed. Academic Press, New York , 1977
12. Pinsent, J. *The need for selenite and molybdate in the formation of formic dehydrogenase by members of the coli-aerogenes group of bacteria*. Biochem. J. 57, 10-16, 1954
13. Schwarz, K.; Foltz, C. *Selenium as an integral part of factor 3 against dietary necrotic liver degeneration*. J. Am. Chem. Soc. 79, 3292-3293, 1957
14. Schwarz, K. *Development and status of experimental work on factor 3-selenium*. Fed. Proc. Amer. Soc. Exp. Biol. 20, 666, 1961

Autore: Patrizia Occhini

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi*.

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

15. Editoriale . Selenium in the heart of China. *Lancet* 2, 889-890, 1979
16. Flohè, L.; Gunzler, W. A.; Schock, H. H. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett.* 32, 132-134, 1973
18. Cohen, G.; Hochstein, P. Glutathione Peroxidase: the Primary Agent for the Elimination of Hydrogen Peroxide in Erythrocytes. *Biochemistry* 2, 1420-1428, 1963 18 Dodig S, Cepelak I, *The facts and controversies about selenium. Acta Pharm;*54(4):261-76. Dec 2004
19. Goyer RA. *Results of lead research: prenatal exposure and neurological consequences. Environ Health Perspect.*;104(10):1050-4, 1996
20. Cavar S, Bošnjak Z, Klapac T, Barišić K, Cepelak I, Jurasović J, Milić M. *Blood selenium, glutathione peroxidase activity and antioxidant supplementation of subjects exposed to arsenic via drinking water. Environ Toxicol Pharmacol.* 2010 Mar;29(2):138-43.
21. Beckett G.J. and Arthur J.R. *Selenium and Endocrine Systems (Review). Journal of Endocrinology;* 184, 455-465, 2005
22. Levander O. A., Burk. R. *Selenium in present knowledge nutrition. 6. ILSI. Nutrition Foundation Washington. D.C. 268-273. 1990*
23. Schrauzer GN. "Anticarcinogenic effects of selenium." *Cell Mol Life Sci.*;57(13-14):1864-73, Dec 2000
24. Bock E. "Cell-cell adhesion molecules". *Biochem Soc Trans.*; 19(4):1076-80, 1991
25. Maiorino M, Ursini F, Bosello V, Toppo S, Tosatto SC, Mauri P, Becker K, Roveri A, Bulato C, Benazzi L, De Palma A, Flohé L. "The thioredoxin specificity of *Drosophila* GPx: a paradigm for a peroxiredoxin-like mechanism of many glutathione peroxidases." *J Mol Biol.*; 365(4):1033-46, 2007
26. Ursini F., Heim S., Kieß M., Maiorino M., Roveri A. Wissing J. and Flohé, L. *Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. Science;* 285, 1393-1396, 1999

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

27. Messaoudi I, Banni M, Saïd L, Saïd K, Kerkeni A. *Involvement of selenoprotein P and GPx4 gene expression in cadmium-induced testicular pathophysiology in rat.* 6;188(1):94-101, Oct 2010
28. azarus M, Orct T, Jurasoviæ J, Blanuša M *The effect of dietary selenium supplementation on cadmium absorption and retention in suckling rats.* *Biometals.*;22(6):973-83, Dec 2009
29. Al-Waeli A., Zoidis E., Pappas A. C., Demiris N., Zervas G. and Fegeros K. *The role of organic selenium in cadmium toxicity: effects on broiler performance and health status.* 2012
30. Rahmanto AS, Davies MJ. *Selenium-containing amino acids as direct and indirect antioxidants.* *JUBMB Life.*;64(11):863-71, Nov 2012
31. Stewart WC, Bobe G, Pirelli GJ, Mosher WD, Hall JA J *Anim Sci. Organic and inorganic selenium: III. Ewe and progeny performance.* *J Anim Sci.* Jul 2012
32. Vincent JL, Forceville X. *Critically elucidating the role of selenium.* *Curr Opin Anaesthesiol.*; 21(2):148-54, 2008
33. Schomburg L, Schweizer U, Köhrle J. *Selenium and selenoproteins in mammals: extraordinary, essential, enigmatic.* *Cell Mol Life Sci.*; 61(16):1988-95,2004
34. Ben Amara I, Soudani N, Troudi A, Bouaziz H, Boudawara T, Zeghal N. *Antioxidant effect of vitamin E and selenium on hepatotoxicity induced by dimethoate in female adult rats.* *Ecotoxicol Environ Saf.*; 74(4):811-9, 2011
35. Cao W, Sumikoshi K, Nakamura S, Terada T, Shimizu K. *Prediction of N-myristoylation modification of proteins by SVM. Prediction of N-myristoylation modification of proteins by SVM.* *Bioinformatics.* 2011; 6(5):204-6. Epub, 2011
36. Yamasaki K, Sakuma Y, Sasaki J, Matsumoto K, Anzai K, Matsuoka K, Honda C, Tsukada M, Endo K, Enomoto S. *Biliary excretion of essential trace elements in rats under oxidative stress caused by selenium deficiency.* *Anal Bioanal Chem.*; 401(8):2531-8, 2011

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

37. Anton A, Turanov, Xue-Ming Xu, Bradley A. Carlson, Min-Hyuk Yoo, Vadim N. Gladyshev,* Dolph L. Hatfield. *Biosynthesis of Selenocysteine, the 21st Amino Acid in the Genetic Code, and a Novel Pathway for Cysteine Biosynthesis.*
38. Berry MJ, Banu L, Larsen PR *Type I iodothyronine deiodinase is a selenocysteine-containing enzyme. Nature.*;349:438–40. 1991
39. Glass RS, Singh WP, Jung W, Veres Z, Scholz TD, Stadtman TC *Monoselenophosphate: synthesis, characterization, and identity with the prokaryotic biological selenium donor, compound SePX. Biochemistry*;32:12555–9, 1993
40. Burk RF. *Molecular biology of selenium with implications for its metabolism. FASEB J. Jun*;5(9):2274-9, 1991
41. Stadtman, T.C. Biosynthesis and function of selenocysteine-containing enzymes. *J.Biol. Chem.* 266, 16257-16260(1991).
42. Latrèche L, Duhieu S, Touat-Hamici Z, Jean-Jean O, Chavatte L *The differential expression of glutathione peroxidase 1 and 4 depends on the nature of the SECIS element.* 1;9(5):681-90, May 2012.
43. Seeher S, Mahdi Y, Schweizer U. *Post-transcriptional control of selenoprotein biosynthesis.*;13(4):337-46, Jun 2012
44. Papp LV, Holmgren A, Khanna KK. Selenium and selenoproteins in health and disease. 1;12(7):793-5, Apr 2010
45. Reszka E, Jablonska E, Gromadzinska J, Wasowicz W. *Relevance of selenoprotein transcripts for selenium status in human.*7(2):127-37, Apr 2012
46. Brown. K.M. and Arthur. .JR. *Selenium, selenoproteins and human health: a review* University of Aberdeen, Scotland: Rowett Research Institute, Aberdeen Public Health Nutrition: 4(2B), 593±599
47. Avissar N, Ornt DB, Yagil Y, Horowitz S, Watkins RH, Kerl EA, Takahashi K, Palmer IS, Cohen HJ. *Human Kidney Proximal Tubules Are the Main Source of Plasma Glutathione Peroxidase.* Am. J. Physiol; 266: C367±75, 1994

Autore: Patrizia Occhini

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

48. Gromer, S., Eubel, J.K., Lee, B.L., and Jacob, J. *Human selenoproteins at a glance*. Cell Mol Life Sci., 62, 2414-2437.2005.
49. Pan K, Wang WX. *The subcellular fate of cadmium and zinc in the scallop Chlamys nobilis during waterborne and dietary metal exposure*. Aquat Toxicol.;90:253-260, 2008
50. Staessen JA, Roels HA, Emelianov D, Kuznetsova T, Thijs L, Vangronsveld J, et al. *Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study*. Public Health and Environmental Exposure to Cadmium. Lancet;353:1140-4, 1999
51. IARC "Cadmium, nickel, some epoxides, miscellaneous industrial chemicals and general considerations on volatile anesthetics". INTL.AGENCY RES. CANCER, Vol 28. Lyon, France, p.205, 1976
52. Goering, P.L.; Waalkes, M.P.; Klaassen, C.D. in: R.A. Goyer, M.G. Cherian (Eds. *Handbook of Experimental Pharmacology, vol. 115, Toxicology of Metals, Biochemical Effects, Springer, New York,, pp. 189–214,1994*
53. Groneberg, DA; Kraus, T; Fischer, A. *Chronic cough: tobacco smoke, particulate matter, ozone, nitrogen oxides and other environmental factors*. J Occup Med Toxicol. 2005;1
54. Johnson A.D. e Sigman M.B., "Early actions of cadmium in the rat and domestic fowl testis. IV. Autoradiographic location of 115cadmium" in J. REPROD. FERTIL, 24:115, 1971
55. McLellan J.S., Flanagan P.R., Chamberlain M.J. e Valberg L.S., "Measurement of dietary cadmium absorption in humans", in J. TOXICOL. ENVIRON. HEALTH, 4:131, 1978
56. Nordberg G. F., Kjellstrom T., Nordberg M., "Kinetics and metabolism" In: *Cadmium and health Vol, I,*
57. Klaassen, C.D. *Pharmacokinetics in metal toxicity*. Fundam. Appl. Toxicol., 1, 353, 1981
58. Breen J. G. et al., «Cellular adaptation to chronic cadmium exposure: intracellular localization of metallothionein protein in human trophoblast cells», *Teratology*, 51(4): 266 – 72, 1995.

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

59. Fowler B.A., Goering P.L. e Squibb K.S., "*Mechanism of cadmium-metallotionein-induced metabolism*". In: METALLOTHIONEIN, PROC. SECOND INT. MEETING ON METALLOTHIONEIN AND OTHER LOW MOLECULAR WEIGHT METAL BINDING PROTEINS, J.H.R. Kagi e Y. Kojima Eds., Birkhauser Verlag, Basel. 1985
60. Kagi J.H.R. e Hapke H.J. "*Biochemical interaction of mercury, cadmium and lead*". In: Nriagu J.O. Ed. CHANGING METAL CYCLES AND HUMAN HEALTH. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 237, 1984
61. Sporn A., Dinu I., Stoenescu L., Cirstea A. "Beitrage zur Ermittlung der Wechselwirkungen zwischen Cadmium und Zink". NAHRUNG, 13:461, 1969
62. Smith J.B., Dwyer S.D., Smith L, "*Cadmium evokes inositol polyphosphate formation and calcium mobilization. Evidence for a cell surface receptor that cadmium stimulates and zinc antagonizes*". J. BIOL. CHEM., 264:7115, 1989
63. Donnelly T.E., "*Effects of zinc chloride on the hydrolysis of cyclic GMP and cyclic AMP by the activator-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine heart*". BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, 522:151, 1978
64. Valle B.L. e Glades A., "*The metallo biochemistry of zinc enzymes*". ADV. ENZYMOL, 56:283, 1974
65. Stacey N.H., Cantilena L.R. Jr, Klaasen C.D., "*Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes*". TOXICOL. APPL. PHARMACOL., 53:470, 1980
66. Ochi T., Ishiguro T., Ohsawa M. "*Participation of active oxygen species in the induction of UNA single-strand scissions by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells*". MUTAT. RES., 122:169, 1983
67. Wabba Z. e Waalkes M.P. "*Effect on in vivo low-dose cadmium pretreatment on the in vitro interactions of cadmium with isolated interstitial cells of the rat testes*". FUND. APPL. TOXICOL., 15:641, 1990
68. L.Wilson – *Equilibrio nutrizionale e analisi minerale tissutale* – SINAI Edizioni, 1995
69. Boggess W.R. Ed., "*Lead in the environment*". NATL. SCI. FOUND. REP.NSF/RA-770214. 272 pp. Avail. from U.S. Gov. Printing Office, Washington, D.C. 20402, 1977

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

70. May T.W. e McKinney G.L., "*Cadmium, lead, mercury, arsenic, and selenium concentrations in freshwater fish, 1976-77- National Pesticide Monitoring Program*". PESTIC. MONITOR. J., 15: 14., 1981
71. White J.R. e Driscoll C.T., "*Lead cycling in an acidic Adirondack lake*". ENVIRON. SCI. TECHNOL., 19: 1182, 1985
72. Chau Y.K., Wong P.T.S., Kramer O., Bengert G.A., Cruz R.B., Kinrade J.O., Lye J., Van Loon J.C., "*Occurrence of tetraalkyllead compounds in the aquatic environment*". BULL. ENVIRON. CONTAM. TOXICOL., 24:26, 1980
73. Demayo A., Taylor M.C., Taylor K.W., Hodson P.V., "*Toxic effects of lead and lead compounds on human health, aquatic life, wildlife plants, and livestock*". CRC CRIT. REV. ENVIRON. CONTROL, 12: 257, 1982
74. Eisler R, "*Arsenic hazard to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review*". Patuxent Wildlife Research Center, Biological Report n. 12, 1988
75. Venugopal B. e Luckey T.D., "*Chemical toxicity of metals and metalloids*". METAL TOXICITY IN MAMMALS 2 Plenum Press, New York and London, pp. 24-32, 69-86, 185-195, 248-253, 275-283, 1978
76. Ensley S., "*Lead-Metals and Minerals*" in CLINICAL VETERINARY TOXICOLOGY di Plumlee K.H., Mosby, 22, pp 204-210 306 Env. Health & Toxicology :Toxics Release Inventory (TRI) - Annual environmental releases of over 600 toxic chemicals by U.S. Facilities, 2003
77. Beretta C., "*Piombo*". In: TOSSICOLOGIA VETERINARIA, a cura di C. Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, p. 153, 1994
78. Hursh J.B. e Suomela J., "*Absorption of ^{212}Pb from the gastrointestinal tract of man*". ACTA RADIOL., 7: 108, 1968
79. Taylor D.M., Bligh P.H., Duggan M.H., "*The absorption of calcium, strontium, barium and radium from the gastrointestinal tract of rat.*" BIOCHEM. J., 83: 25, 1962

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

80. Skerfving S., *"Biological monitoring of exposure to inorganic lead"*. In: BIOLOGICAL MONITORING OF TOXIC METALS. Clarkson T.W., Friberg L., Nordberg G.F., Sager P.R. Eds., Plenum Press, New York, London, p. 169, 1988
81. Suomela J., *"Absorption of ²¹²Pb from the gastrointestinal tract of man"*. ACTA RADIOL., 7: 108, 1968
82. Hursh J.B. e Mercer T.T., *"Measurement of ²¹²Pb loss rate from human lungs"*. J. APPL. PHYSIOL., 28: 268, 1970
83. Hursh J.B. e Morrow P.E., Beiter H. Amato F., Gibb F.R., *"Pulmonary retention of lead: an experimental study in man"*. ENVIRON. RES., 21: 373, 1980
84. Choie D.D. e Richter G.W., *"Lead poisoning: rapid formation of intranuclear inclusions"*. Science, 117: 1195, 1972
85. Raghavan S.R.V., Culver B.D., Gonick H.C., *"Erythrocyte lead binding protein after occupational exposure. I. Relationship to lead toxicity"*. ENVIRON. RES., 22: 264, 1980
86. Schutz A. e Skerfving S., *"Effect of a short, heavy exposure to lead dust upon blood level, erythrocyte delta-aminolevulinic acid and coproporphyrin"*. SCAND. J. WORK ENVIRON. HEALTH, 3: 176, 1976
87. Tola S., Hernberg S., Asp S., Nikkanen J., *"Parameters indicative of absorption and biological effect in new lead exposure: a prospective study"*. BRIT. J. IND. MED., 30: 134, 1973
88. Rossouw J., Offermeier J., van Rooyen J.M., *"Apparent central neurotransmitter receptor changes induced by low-level lead exposure during different developmental phases in the rat"*. TOXICOL. APPL. PHARMACOL., 91: 132, 1987
89. Bishop C.W. e Surgenor D.M. Eds., *"The red blood cell: a comprehensive treatise"*. ACADEMIC PRESS, New York, p. 110, 1964
90. Lessler M.A. e Walters M.I., *"Erythrocyte osmotic fragility in the presence of lead or mercury"*. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 142: 548, 1973
91. Kao R.L.C. e Forbes R.M., *"Effects of lead on heme-syntesising enzymes and urinary aminolevulinic acid in the rat"*. PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 143: 234, 1973

Autore: Patrizia Occhini

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

92. Waldron H.A, "Anaemia of lead poisoning: a review". BR. J. IND. MED., 23: 83, 1966
93. Liu ZH, Wang FS, Guan T, Zhang JS, Wang C. *Effects of lead on protein kinase C expression in U251 cell line.* ;30(2):120-2, Feb 2012
94. Goyer R.A., "Toxic effects of metals". In: *Casarett&Doull's Toxicology; THE BASIC SCIENCE OF POISONS*, 5th edn., Klaassen C.D. (Ed.), McGraw-Hill, New York, pp.691-736, 1996
95. Beretta C., "Piombo". In: *TOSSICOLOGIA VETERINARIA*, a cura di C. Beretta, Casa Editrice Ambrosiana, Milano, p. 153, 1994
96. Bonucchi D., G. Mondaini, F. Ravera, E. Minisci, V. Albertazzi, S. Arletti, G. Mori, M. Ballestri, J. Piattoni, G. Cappelli. "TERZO FUOCO", *INTOSSICAZIONE DA PIOMBO E INSUFFICIENZA RENALE CRONICA*. ANNO 24 S-38, / PP. S76-S79, 2007
97. Cardona E., Lessler M.A., Brierly G.P., "Mitochondrial oxidative phosphorylation-intraction of lead with inorganic phosphate". PROC. SOC. EXP. BIOL. MED., 136: 300, 1971
98. Choie D.D. e Richter G.W, "Lead poisoning: rapid formation of intranuclear inclusions". Science, 117: 1195, 1972
99. Ergurhan-Ilhan ICadir BKoyuncu-Arslan MArslan CGultepe FMOzkan G Ergurhan-Ilhan I , Cadir B , Koyuncu Arslan-M , C Arslan , Gultepe FM , Ozkan G . *Livello di stress ossidativo e danni negli eritrociti in apprendisti indirettamente esposti al piombo.*, 50 (1) :45-50, feb 2008
100. Clarkson. T.W. Tossicità di metallo nel sistema nervoso centrale. Environ Salute perspect;. 75 : 59-64, Nov 1987
101. Michel Poulain, Giovanni Mario Pes, Claude Graslan, Ciriaco Carru, Luigi Ferrucci, Giovannella Baggio, Claudio Franceschi, Luca Deiana.-*Identification of a geographic area characterized by extremelongevity in the Sardinia island: the AKEA study.* Experimental Gerontology Volume 39, Issue 9, Pages 1423–1429, Sep 2004
102. Deiana L, Vaupel J.: *Longevity in Sardinia, "The centenarian Island"*. Bioch.Clin., vol.30, suppl. N1, 2006

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

103. Arean J.M., *POISONING*, Springfield, Ill Ames B.N.,. *Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxigen radicals and degenerative diseases*. Science. 221: 1256-1264, 1983
105. Joseph J.A., Shukit-Hale B., Denisova N.A. et al.,. *Reversal of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioural deficits with blue berry, spinach, or strawberry dietary supplementation*. J. Neurosci. 19:8114-8812. 1999
106. Wargovich M.J.,. *Anticancer properties of fruits and vegetables*. Hort. Sci. 35:573-575.
107. American Cancer Society Guidelines for Nutrition and Cancer Prevention. American Institute of Cancer Research 1997. Food Nutrition, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington, DC: American Institute of Cancer Research, 2000
108. Mulas M., D'hallewin G., Nieddu G., *The early ripening cultivars of the pear (Pyrus communis L.) germplasm in Sardinia*. Atti del XXIII International Horticultural Congress. Firenze 27/8 – 1/9, 1990
109. Manca Dell'Arca A. *Agricoltura in Sardegna*. Ed. Orsini. Napoli, 1780
110. Moris H. J. *Flora Sardoia seu historia plantarum in Sardinia et adiacentibus insulis vel sponte nascentium*. Vol. II. Ed. Taurini ex Regio Typographeo. Torino, 1839-59
111. Cherchi Paba F. *Evoluzione Storica dell'Attività Industriale, Agricola, Caccia e Pesca in Sardegna*. Regione Sarda. Ass. Ind. e Comm., Ed. Fossataro, Cagliari, 1974- 1977
112. Guilford JM, Pezzuto JM. *Wine and health: a review*. *Am J Enol Viticult.*;62:471–486, 2011
113. Papamichael C, Karatzi K, Karatzis E, Papaioannou TG, Katsichti P, Zampelas A, Lekakis J. *Combined acute effects of red wine consumption and cigarette smoking on haemodynamics of young smokers*. *J Hypertens.*;24:1287–1292, 2006
114. Papamichael C, Karatzis E, Karatzi K, Aznaouridis K, Papaioannou T, Protogerou A, Stamatelopoulos K, Zampelas A, Lekakis J, Mavrikakis M. *Red wine's antioxidants counteract acute endothelial dysfunction caused by cigarette smoking in healthy nonsmokers*. *Am Heart J.*;147:E5, 2004

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi*.

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

115. Zsolt Ajtony, Norbert Szoboszlai, Emo´ ke Klaudia Susko´ , Pa´ l Mezei, Krisztina Gyö rgy, La´ szló Bencs *Direct sample introduction of wines in graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous determination of arsenic, cadmium, copper and lead content*, *Talanta* 76 ,627–634, 2008
116. Kim H, Lee HJ, Hwang JY, Ha EH, Park H, Ha M, Kim JH, Hong YC, Chang N. *Blood cadmium concentrations of male cigarette smokers are inversely associated with fruit consumption*. *J Nutr.* 2010 Jun;140(6):1133-8.
117. Haldar S, Rowland IR, Barnett YA, Bradbury I, Robson PJ, Powell J, Fletcher J. *Influence of habitual diet on antioxidant status: a study in a population of vegetarians and omnivores*. *Eur J Clin Nutr.* 2007;61:1011–22
118. Rauma AL, Törrönen R, Hänninen O, Verhagen H, Mykkänen H. *Antioxidant status in long-term adherents to a strict uncooked vegan diet*. *Am J Clin Nutr.* 1995;62:1221–7
119. Gorell JM, Rybicki BA, Johnson CC, Peterson EL. *Smoking and Parkinson’s disease: a dose-response relationship*. *Neurology* 1999-c;52(1):115-9.
120. Grandinetti A, Morens DM, Reed D, MacEachern D. *Prospective study of cigarette smoking and the risk of developing idiopathic of Parkinson’s disease*. *Am J Epidemiol* 1994;139(12):1129-38.
121. Janson AM, Fuxe K, Goldstein M. *Differential effects of acute and chronic nicotine treatment on MTPT (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons in the black mouse*. *Clin Investig* 1992;70(3-4):232-8.
122. Baron JA. *Cigarette smoking and Parkinson’s disease*. *Neurology* 1986;36(11):1490-6.
123. Bernard A. *Cadmium & its adverse effects on human health* *Indian J Med Res* 128, October 2008, pp 557-564
124. Baecklund M, Pedersen NL, Björkman L, Vahter M. *Variation in blood concentrations of cadmium and lead in the elderly*. *Environ Res.* 1999;80:222–30

Autore: Patrizia Occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi*.

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: “Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica”

Università degli Studi di Sassari

Autore: Patrizia occhineri

Titolo della tesi: *Contenuto di Piombo, Cadmio e Selenio nei cibi sardi e comparazione con i livelli plasmatici degli stessi in soggetti longevi.*

Tesi di Dottorato in: Scienze Biomolecolari e Biotecnologiche

Indirizzo: "Proteomica, Metabolomica, Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica"

Università degli Studi di Sassari

