



Università degli Studi di Cagliari
Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente
Sezione di Scienze Antropologiche

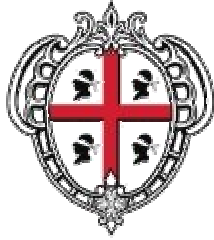
**DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA E BIOCHIMICA
DELL'UOMO E DELL'AMBIENTE
CICLO XXVII**

**Biomonitoraggio umano: effetti sub-clinici da
Piombo e Cadmio sull'accrescimento**

Settore scientifico e disciplinare di appartenenza: BIO/08 Antropologia

Presentata da: Dott. Nicola Milia
Coordinatore Dottorato: Prof. Emanuele Sanna
Relatore: Prof. Emanuele Sanna

Esame finale Anno Accademico 2013/2014



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**



La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2013/2014 - XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".

ABSTRACT

Objectives: The aims of this study are: 1) to assess the exposure to Pb and Cd in Sardinian children by hair analysis; 2) to detect any possible sub-clinical impact on growth due to exposure to these heavy metals; 3) to evaluate the individual susceptibility to absorption by using genetic polymorphisms involved in Pb and Cd metabolisms,.

Methods: The total sample consists of 144 children of both sexes (11-14 years), living in different municipalities of Sardinia (Italy) of Sulcis-Iglesiente area, Sant'Antioco and Iglesias, collected from January and March 2013.

The Anthropometric variables considered are height, sitting height, estimated lower limb length (height minus sitting height) and cephalic circumference. The environmental variables are hair lead and cadmium concentrations (PbH, CdH), proxy of socioeconomic status (SES), proxy of nutritional status as upper arm muscle area (UMA), upper arm fat area (UFA), body mass index (BMI) and Σ 5 skinfolds. In order to detect possible associations between genetic factors and heavy metal concentration, the following genetic polymorphisms were studied: δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD), vitamin D receptor (VDR), DNA-methyltransferase 1 gene (DNMT1) and DNA-methyltransferase 3 gene (DNMT3).

Hair Lead (PbH) and cadmium (CdH) concentrations were assessed by inductively coupled plasma atomic mass spectrometry (ICP-MS)

Statistical analyses : For each sample, it has been calculated the descriptive statistics for anthropometric and sociodemographic variables, and the hair lead and cadmium level.

One-way analysis of variance (ANOVA) was used to test for significant differences between the samples for all the considered variables. To evaluate the sub-clinical impact on growth, we carried out a multivariate ridge regression analysis with the anthropometric measures (height, sitting height, estimated lower limb length) as dependent variables and demographic variables, proxy of socioeconomic, proxy of nutritional status, levels of PBH and CDH, polymorphisms genetic as independent variable.

Results: Statistically significant differences ($p < 0,01$) in elemental concentration levels between the two study sites were found. Hair of children from Iglesias exhibited much higher concentration values for Cd and Pb compared to Sant'Antioco children.

Multivariate ridge regression analyses indicates a sub-clinical impact of cadmium and lead on growth, but failed to reveal any association between lead and cadmium levels and genetic polymorphisms.

Conclusions: The results support the use of hair lead and cadmium levels as a biomarker to assess either differences between samples from different environmental background or the impact of subclinical lead on the physical growth of children. No significant association between alleles at genetic polymorphisms taken into consideration and lead and cadmium concentrations levels was observed. However, further studies using larger population samples and genetic polymorphisms covering a wider range of enzymatic and metabolic aspects are needed for definite conclusions to be drawn.

ABSTRACT

Questo studio si inserisce nell'ambito degli studi ambientali volti a valutare i livelli di metalli pesanti in diverse matrici biologiche di diverse comunità della Sardegna al fine di approntare nuove strategie di Biomonitoraggio delle popolazioni umane.

Tra il mese di Gennaio ed il mese di Marzo del 2013, è stato raccolto un campione trasversale composto da 144 individui, di ambo i sessi, di età compresa tra gli 11 e i 14 anni, residenti nei due Comuni a differente retroterra ambientale: Iglesias e Sant'Antioco. Gli obiettivi sono stati quelli di: 1) acquisire conoscenze circa la potenziale esposizione a Pb e Cd; 2) verificare se esistesse un impatto sub-clinico sull'accrescimento da parte di questi due metalli pesanti; 3) valutare attraverso l'analisi di polimorfismi genetici, coinvolti nel metabolismo e nella tossicocinetica del Pb e del Cd, se fosse possibile individuare dei marcatori per la creazione di un sistema avanzato di sorveglianza ambiente-salute in grado di spiegare la suscettibilità individuale all'assorbimento.

Per ciascun individuo campionato sono state raccolte informazioni relative allo stato socio-economico, variabili antropometriche e variabili relative al proxy dello stato nutrizionale, un campione di capelli, prelevato per la determinazione dei livelli dei metalli pesanti, e un campione di saliva per l'estrazione e la determinazione di 9 polimorfismi genetici (SNPs).

La determinazione analitica dei livelli di Pb e Cd presenti nei capelli è avvenuta tramite l'utilizzo dell'ICP-MS, mentre i polimorfismi SNPs sono stati amplificati tramite PCR e successivamente determinati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

L'analisi statistica è consistita nel calcolo delle statistiche descrittive; nell'analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA) per effettuare il confronto tra i gruppi; nel calcolo dei coefficienti di relazione semplice di Bravais-Pearson; nella creazione di specifici modelli di regressione multivariata in modalità ridge proposti per valutare le relazioni tra variabili dipendenti (statura, statura da seduto, LCAI) ed indipendenti (variabili anagrafiche, socio-economiche, proxy dello stato nutrizionale, livelli di PbH e CdH, polimorfismi genetici); il calcolo dell'equilibrio di Hardy – Weinberg, del Linkage disequilibrium e del Total Genotype Score.

I risultati ottenuti, oltre a confermare l'affidabilità dei capelli come biomarker nell'indagine preliminare per valutare gli effetti sub-clinici all'esposizione ai metalli pesanti, evidenziano come vi siano delle marcate differenze, statisticamente significative ($p < 0,0001$) nelle concentrazioni di Pb e Cd nei capelli di bambini che vivono nei pressi del distretto minerario dell'Iglesiente, in confronto con i ragazzi e le ragazze della stessa età che vivono nel Comune di Sant'Antioco. Inoltre, i risultati dei modelli di regressione multipla in modalità ridge suggeriscono l'esistenza di un possibile impatto sub-clinico sull'accrescimento da parte del Pb e del Cd. Infine, non è stata individuata nessuna associazione tra i marcatori di suscettibilità utilizzati e i livelli di CdH e PbH, presumibilmente a causa della numerosità relativamente limitata del campione o alla natura stessa dei marcatori di suscettibilità esaminati.

INDICE

INTRODUZIONE	pag.	1
METALLI PESANTI		3
METALLI PESANTI ED ACCRESCIMENTO		6
PIOMBO		8
- <i>Vie di Assorbimento</i>		9
- <i>Tossicità</i>		11
- <i>Neurotossicità</i>		11
- <i>Effetti ematologici</i>		12
- <i>Effetti sul rene</i>		13
- <i>Effetto sulla pressione sanguigna</i>		14
- <i>Cancerogenicità</i>		15
CADMIO		17
- <i>Esposizione</i>		17
- <i>Vie di Assorbimento</i>		18
- <i>Tossicità</i>		19
- <i>Cancerogenicità</i>		20
- <i>Effetti sull'apparato scheletrico</i>		21
BIOMARCATORI		24
- <i>Biomarcatori di esposizione</i>		24
- <i>Biomarcatori sostitutivi: i capelli</i>		25
- <i>Biomarcatori di suscettibilità: i polimorfismi genetici</i>		29
INQUADRAMENTO GENERALE DEI COMUNI STUDIATI		34
- <i>Iglesias</i>		35
- <i>Sant'Antioco</i>		37
OBIETTIVI DELLA TESI		39

INDICE

MATERIALI E METODI	pag.	40
- <i>Campionamento</i>		40
- <i>Classificazione dello stato socio-economico</i>		42
- <i>Misure antropometriche e variabili derivate</i>		43
- <i>Metodologia per la raccolta e l'analisi dei metalli pesanti</i>		48
- <i>Tecnica di spettrometria di massa accoppiata al plasma induttivo (ICP-MS)</i>		50
- <i>Metodologia per la raccolta e l'analisi dei polimorfismi genetici</i>		52
ANALISI STATISTICA		56
RISULTATI		60
DISCUSSIONE		68
- <i>Concentrazioni di Piombo e Cadmio</i>		68
- <i>Impatto sub-clinico</i>		71
- <i>Polimorfismi genetici</i>		77
CONCLUSIONI		81
TABELLE		83
FIGURE		104
BIBLIOGRAFIA		108

INTRODUZIONE

L'acqua, l'aria, il suolo e l'alimentazione rappresentano le vie di esposizione attraverso le quali le popolazioni umane vengono a contatto con le sostanze inquinanti che possono avere effetti nocivi sulla salute. Tali effetti si verificano quando l'inquinante raggiunge organi o tessuti bersaglio, in base alla dose e durata dell'esposizione. Sebbene l'impatto sulla salute sia connesso alle caratteristiche dell'inquinante, occorre considerare che intervengono anche fattori ascrivibili alle condizioni generali di salute, allo stile di vita e alla suscettibilità (genetica o acquisita) degli individui.

Con il termine di biomonitoraggio viene definito il monitoraggio degli effetti dell'inquinamento mediante l'analisi di organismi viventi e di parametri biologici. Le prime valutazioni di esposizione umana alle sostanze chimiche attraverso l'analisi di fluidi biologici sono state condotte nell'ambito della Medicina del Lavoro. Con questa finalità negli Stati Uniti nel 1930, furono analizzati i livelli di piombo e metaboliti del benzene nel sangue e nelle urine in lavoratori professionalmente esposti (Kehoe et al., 1933; Yant et al., 1936).

Il monitoraggio di parametri biologici svolge un ruolo fondamentale nella valutazione e gestione del rischio per la salute, in quanto permette di ottenere informazioni sia sull'esposizione sia sulla relazione tra dose e risposta. Negli ultimi anni, soprattutto in Epidemiologia ambientale, si è assistito ad un progressivo incremento di studi di biomonitoraggio umano, in conseguenza del continuo incremento del carico inquinante ai danni delle popolazioni non professionalmente esposte, residenti in aree contaminate e limitrofe. Inoltre i risvolti negativi sulla salute hanno portato, oltre ad una preoccupazione diffusa nella società civile, anche alla necessità di disporre di strumenti d'indagine, metodiche e metodologie sempre più efficienti ed appropriate per la determinazione dei livelli degli xenobiotici.

Rispetto alle tecniche analitiche tradizionali, il biomonitoraggio ha il vantaggio di fornire delle stime sugli effetti combinati di più inquinanti sugli esseri viventi, inoltre presenta costi di gestione limitati e permette di analizzare con relativa semplicità vaste aree e territori diversificati, consentendo una adeguata mappatura del rischio ambientale del territorio. I sistemi di biomonitoraggio umano, inoltre, permettono la possibilità di definire la reale dose degli inquinanti nell'organismo, come risultante dei processi metabolici e di bioaccumulo, che può essere notevolmente differente da quella stimata a partire da rilevamenti nelle matrici ambientali e alimentari. Occorre infatti sottolineare che la semplice misura ambientale dei diversi inquinanti rappresenta soltanto un indicatore approssimativo della reale esposizione umana.

La necessità di promuovere un'attività di biomonitoraggio umano, è stata da tempo sottolineata sia a livello europeo sia internazionale (Council directive 77/312/EEC, 1977; NHANES, 1999-2000; HESI, 2004). Alcuni elementi, quali per esempio cadmio e piombo, necessitano della massima attenzione per via della loro elevata tossicità. Il controllo dei livelli di questi metalli pesanti nell'ambiente e nelle popolazioni umane dovrebbe essere costantemente e rigorosamente effettuato, al fine di individuare possibili situazioni di criticità che potrebbero determinare effetti negativi, di vario grado, sulla salute delle popolazioni esposte.

METALLI PESANTI

Il termine metalli pesanti viene comunemente utilizzato per raggruppare una serie di elementi, componenti naturali della crosta terrestre, inquinanti e potenzialmente tossici. Le loro concentrazioni nei suoli, nei sedimenti e nelle rocce, sono solitamente nell'ordine delle parti per milione (ppm) e in alcuni casi parti per miliardo (ppb).

Il primo a utilizzare il termine metalli pesanti è stato, nel 1936, il chimico danese N. Bjerrum. La sua definizione era basata sulla densità del metallo al suo stato elementare e racchiudeva sotto il termine di metalli pesanti tutti quegli elementi con densità superiore ai 7 g/cm^3 . Negli anni questa definizione è stata più volte modificata ed ad oggi, in generale, vengono definiti metalli pesanti tutti quegli elementi chimici che presentano le seguenti caratteristiche comuni (Duffus, 2003):

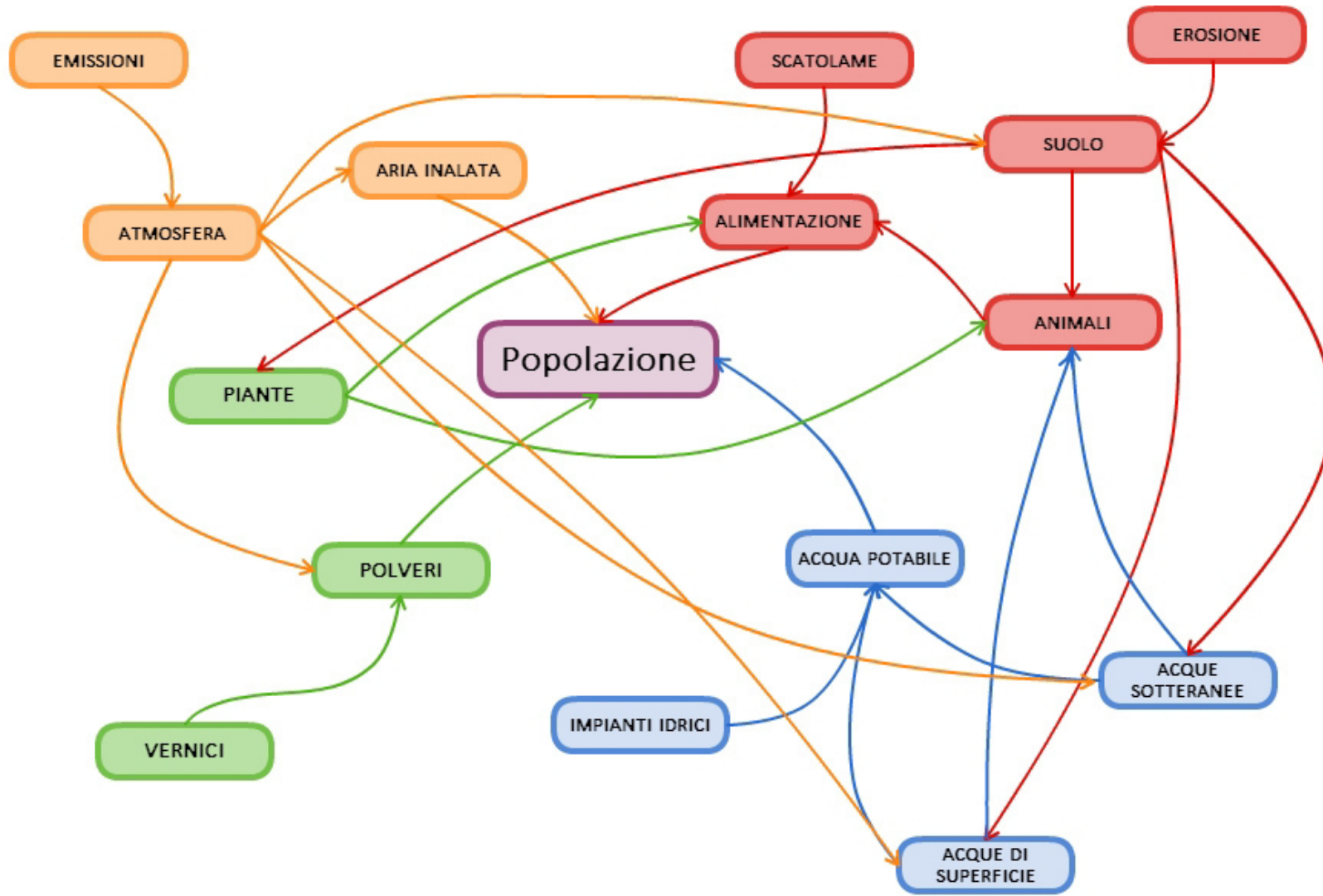
- hanno una densità superiore a $5,0 \text{ g/cm}^3$;
- si comportano come cationi, ossia come ioni dotati di carica positiva quando sono sottoposti ad un campo elettromagnetico;
- presentano una bassa solubilità dei loro idrati;
- hanno tendenza a dare vita a legami complessi;
- hanno una grande affinità con i solfuri, nei quali tendono a concentrarsi;
- hanno diversi stati di ossidazione a seconda delle condizioni di pH ed Eh.

Generalmente vengono considerati metalli pesanti l'Argento (Ag), l'Alluminio (Al), il Ferro (Fe), l'Oro (Au), l'Uranio (U), il Platino (Pt), il Bario (Ba), il Cadmio (Cd), il Cobalto (Co), il Cromo (Cr), il Manganese (Mn), il Mercurio (Hg), il Molibdeno (Mo), il Nichel (Ni), il Piombo (Pb), il Rame (Cu), lo Stagno (Sn), il Tallio (Tl), il Vanadio (V) e lo Zinco (Zn), a questi si aggiungono i "semimetalli" o "metalloidi" Germanio (Ge), Arsenico (As), Tellurio (Te) ed i "non metalli" Selenio (Se), Bromo (Br), e Iodio (I).

Piccole quantità di alcuni di questi elementi sono comuni nell'ambiente e nell'alimentazione e sono necessari per una buona salute, tuttavia grandi quantità di uno di essi può causare tossicità acuta o cronica. In particolare da rimarcare che un eccessivo livello di elementi tossici con un contemporaneo deficit di metalli essenziali, quali Mg, Zn, Cu, Ca ed altri bioelementi, possa determinare dei disordini metabolici, una diminuita efficienza dell'organismo, un declino dei processi immunologici e quindi la comparsa di varie malattie e persino la morte dell'individuo (Lech, 2002; Navas-Acien et al., 2008; Weisskopf et al., 2009; Zhang et al., 2009; WHO, 2010).

Come inquinanti i metalli pesanti sono sostanze tossiche persistenti, cioè non vengono degradati dai processi naturali, e sono soggetti a bioaccumulo. Esistono notevoli variazioni dei livelli dei metalli pesanti sia tra le popolazioni esposte sia all'interno delle stesse. Tali variazioni sono riconducibile sia a fattori ambientali sia a fattori genetici in grado di modificare i livelli di assorbimento, e dunque di accumulo nell'organismo (Onalajia e Claudio, 2000; Schwartz et al., 2000; Haynes et al., 2003; Chuang et al., 2004; Barbosa et al., 2005; Weaver et al., 2005; Rezende et al., 2008, 2010; Theppeang et al., 2008; Pawlas et al., 2012).

- Interazione tra le più comuni sorgenti di metalli pesanti e le vie di esposizione umana



METALLI PESANTI ED ACCRESIMENTO

L'accrescimento e lo sviluppo nell'uomo sono condizionati da una serie di fattori genetici ed ambientali. Sinora le variazioni nei ritmi d'accrescimento, tra le popolazioni ed all'interno di una popolazione, nel tempo e nello spazio, sono state poste in relazione soprattutto con l'influenza esercitata dall'ambiente naturale (clima, altitudine, etc.) e culturale (residenza urbana o rurale, livello socio-economico, dimensioni della famiglia, etc.). Negli ultimi decenni, in seguito al progressivo concentrarsi delle popolazioni nelle aree urbane, all'aumentare del carico inquinante delle attività produttive e all'incremento dell'esposizione all'inquinamento non-occupazionale è diventato imprescindibile indagare anche sugli effetti che l'inquinamento urbano ed industriale produce sull'accrescimento (Schell, 2014).

L'accrescimento, rappresentando la risultante di numerosi aspetti fisiologici, viene comunemente considerato come una misura dello stato di salute dei bambini e degli adolescenti. Infatti occorre considerare che la morbilità e la mortalità rappresentano una parte degli effetti dell'inquinamento sulla salute umana, mentre tramite la valutazione dello stato dell'accrescimento potrebbe essere stimato l'impatto sub-clinico dell'inquinamento (Schell, 2010). Essendo infine le variazioni dei ritmi d'accrescimento sensibili anche ai mutamenti recenti dell'ambiente possono essere utilizzati per segnalare la presenza di uno stato di inquinamento più rapidamente dell'analisi dei tassi di morbilità e di mortalità (Schell, 1991).

Gli effetti tossici dei metalli pesanti risultano particolarmente dannosi per i soggetti in accrescimento. Infatti i bambini sono maggiormente vulnerabili agli effetti negativi di molti inquinanti ambientali, in particolare dei metalli pesanti, a causa della loro immaturità fisiologica, alla loro maggiore probabilità di essere esposti all'inquinamento non-occupazionale e alla possibilità di ingerire polveri contenenti metalli pesanti (Manton et al., 2003; Goodman e Gilman, 2005; Kapka et al., 2007;

Rezende et al., 2010). Infatti, la polvere contenente gli inquinanti, ricade dall'atmosfera sui giocattoli, sui mobili e su altre superfici di zone destinate al gioco, da cui può, facilmente, essere ingerita (Schell, 1991; Freeman et al., 2001; Olympio et al., 2009; Dooyema et al., 2011).

I bambini inoltre assorbono, in genere, una maggiore quantità di metalli pesanti rispetto agli adulti, in quanto presentano oltre che una più intensa attività metabolica e fisica, anche un maggiore assorbimento e ritenzione nel tratto gastrointestinale (Schell, 1991; Al-Saleh et al., 1999; Lidsky e Schneider, 2003; Haefliger et al., 2009; Sanna et al., 2011).

Diversi lavori riportano che anche moderati livelli di alcuni metalli pesanti nei bambini possano generare loro delle patologie (Factor-Litvak et al., 1999; Canfield et al., 2003; CDC, 2004; Afridi et al., 2010; Shargorodsky et al., 2011), provocare una riduzione del Q.I. (Factor-Litvak et al., 1999; Campbell et al., 2000; Rahman et al., 2002; Iglesias et al., 2011), oltre che influire negativamente sulla crescita (Schwartz et al., 1986; Frisancho e Ryan, 1991; Ballew et al., 1999; Factor-Litvak et al., 1999; Rahman et al., 2002; Ignasiak et al., 2006, 2007; Min et al., 2008; Sanna e Vallascas 2011), in modo particolare sulla statura (Schwartz et al., 1986; Frisancho and Ryan, 1991; Kafourou et al., 1997; Ballew et al., 1999; Kordas et al., 2004; Ignasiak et al., 2006; Little et al., 2009; Schell et al., 2009), ed in specifico sulla lunghezza dell'arto inferiore (Kafourou et al., 1997; Ignasiak et al., 2006), oltre che sul peso (Sanin et al., 2001; Ignasiak et al., 2006; Little et al., 2009), sulla circonferenza cefalica (Kafourou et al., 1997; Ballew et al., 1999), sul perimetro toracico (Schwartz et al., 1986), e sulla lunghezza dell'arto superiore (Lauwers et al., 1986). Inoltre è stato ipotizzato come i metalli pesanti oltre influire sull'accrescimento possano tendere all'accumulo nel grasso corporeo, il che suggerirebbe una maggiore attenzione nella prescrizione di diete o stati alimentari che comportino il rapido dimagrimento dei soggetti obesi o in sovrappeso in aree inquinate (Vallascas et al., 2013).

PIOMBO

Il piombo è un elemento metallico (simbolo Pb e numero atomico 82) di colore bianco azzurrognolo, abbondante sulla crosta terrestre (36° posto), altamente malleabile, duttile, molto resistente alla corrosione, che non presenta nessun ruolo positivo nella normale fisiologia umana e la sua tossicità è ben conosciuta (Schell, 2009, 2014). Episodi di intossicazione cronica da piombo, o saturnismo, vengono riportati già dagli antichi Greci e dai medici arabi (a.C.) ed i primi casi di encefalopatia da esposizione professionale sono stati, nel 400 a. C., descritti da Ippocrate (460 – 377 a.C.) (Barry e Mossman, 1970; Venugopal e Luckey, 1978).

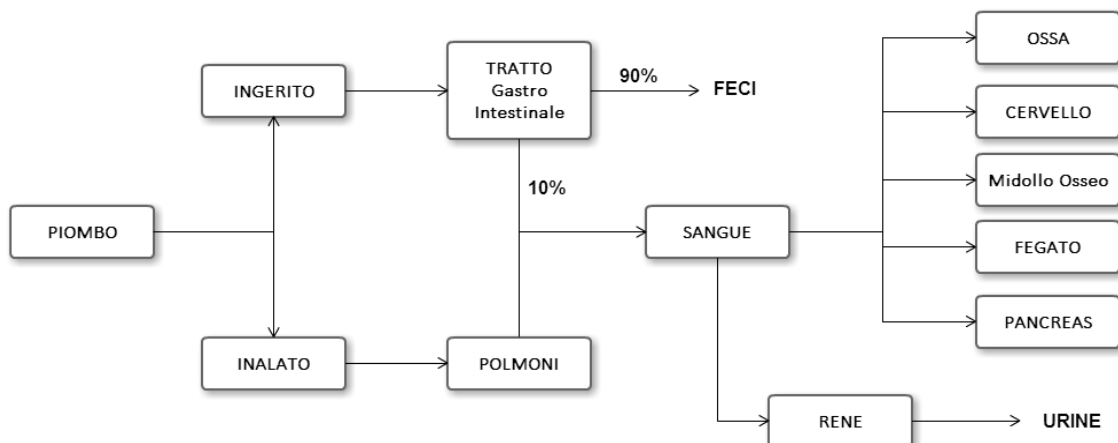
Nell'ambito industriale il Pb ha molteplici utilizzi, che recentemente si è cercato di limitare a causa della sua tossicità e del danno indotto dalla sua dispersione non controllata nell'ambiente (Schell, 2014). Viene impiegato negli accumulatori, nelle munizioni, nelle tubature, in vernici, come schermo contro le radiazioni, come additivo nei carburanti (anche se l'utilizzo è attualmente in declino o prescritto), e in leghe con lo stagno per saldature (Olympio et al., 2009 ; Sanders et al., 2009). Inoltre il piombo può essere prodotto e diffuso come inquinante nell'atmosfera durante l'estrazione e la lavorazione industriale di altri metalli, come argento, oro e bismuto.

VIE DI ASSORBIMENTO

Fino a circa trent'anni fa, l'avvelenamento cronico da piombo, saturnismo, era definito dalla presenza di una dose superiore a 80 $\mu\text{g}/\text{dl}$ nel sangue, attualmente viene considerata alta una dose di Pb di 30 $\mu\text{g}/\text{dl}$ e come potenzialmente nocive, specie nello sviluppo, quantità uguali o superiori a 5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (ATSDR, 2007; WHO, 2010).

La principale via di assorbimento è rappresentata dall'apparato gastroenterico, nonostante l'assorbimento per tale via risulti essere lento ed incompleto, per via della formazione di composti insolubili a livello dell'intestino. Infatti gli adulti assorbono dal 5 al 15% del piombo ingerito e, di norma, accumulano meno del 5% di quello che è stato assorbito. I bambini ne assorbono molto di più rispetto agli adulti; uno studio a questo proposito ha riscontrato, in bambini che seguivano un'alimentazione regolare, un assorbimento netto medio del 41,5% ed un accumulo netto del 31,8% (Kaji e Nishi, 2006).

– *Vie di assorbimento e accumulo di piombo nell'organismo*



Il Pb è presente nell'atmosfera sia in forma solida (polvere o particelle di diossido di piombo), sia in fase gassosa, soprattutto alchil-piombo, proveniente dalla combustione del carburante addizionato con piombo (WHO, 2010). L'assorbimento del piombo per inalazione dipende, oltre che dalla sua concentrazione anche da altri fattori. Tra questi, il volume di aria inspirata in una giornata, la forma in cui è il metallo e la *range* delle dimensioni delle particelle che lo contengono. Solo una frazione molto piccola delle particelle con diametro esterno medio superiore ai 0,5 μm viene trattenuta nei polmoni, la maggior parte viene eliminata dalle vie respiratorie e deglutita. Mentre se il diametro è inferiore ai 0,5 μm , la percentuale che arriva al polmone aumenta proporzionalmente alla riduzione delle dimensioni. Circa il 90% delle particelle di piombo presenti nell'aria si accumulano nei polmoni sono sufficientemente piccole per essere trattenute. L'assorbimento del piombo attraverso gli alveoli è relativamente efficiente e completo. (Hursh et al., 1980)

Una volta assorbito il piombo si riversa nel torrente circolatorio, inizialmente a livello plasmatico per poi penetrare rapidamente negli eritrociti (Raghavan et al., 1980). Nei globuli rossi si trova più del 90% del piombo ematico, associato alla membrana e all'emoglobina. Piccole frazioni possono essere legate ad altre componenti di queste cellule.

La quantità totale di piombo corporeo può essere suddivisa almeno in due comparti cinetici caratterizzati da due differenti velocità metaboliche. Il più ampio (circa il 90%) e, dal punto di vista cinetico, il più lento è il sistema osseo, caratterizzato da un'emivita superiore ai 20 anni;; un comparto molto più labile è costituito dai tessuti molli. Globalmente, il piombo che può essere accumulato nell'arco della vita è all'incirca 200 mg, valori superiori a 500 mg sono riscontrabili in individui esposti per motivi occupazionali (Manton, 2003; Kaji e Nishi, 2006).

Il piombo, nel sistema nervoso centrale, tende a concentrarsi nella materia grigia ed in alcuni nuclei. Le concentrazioni maggiori sono state riscontrate nell'ippocampo,

seguito dal cervelletto, dalla corteccia cerebrale e dal midollo allungato. Sembra che la materia bianca della corteccia ne contenga la minor quantità, ma queste considerazioni sono basate solo su pochi dati riferiti all'uomo e agli animali. Di solito l'escrezione renale del piombo avviene attraverso filtrazione glomerulare mentre, a livello tubulare, si verifica un certo riassorbimento (Tola et al., 1973)

TOSSICITÀ

Il piombo è un elemento che non possiede nessun ruolo fisiologico. La sua tossicità può coinvolgere diversi organi e attività biochimiche. Nei neonati e nei bambini gli effetti maggiori sono a carico del sistema nervoso (Rutter e Jones, 1983;; EPA, 1989; ASTDR, 2007). Per gli adulti esposti, sia occupazionalmente sia accidentalmente al metallo, c'è il rischio di neuropatie periferiche e/o nefropatie croniche. Comunque, negli adulti, l'effetto critico o più sensibile può essere generalmente l'ipertensione (EPA, 1989).

NEUROTOSSICITÀ

Il Pb può causare, anche in assenza di cambiamenti morfologici, scompensi nella trasmissione neuronale, attraverso l'inibizione della funzione colinergica, probabilmente determinata dalla riduzione del calcio extracellulare. Altri cambiamenti nella neurotrasmissione coinvolgono un peggioramento nella captazione della dopamina da parte dei sinapsosomi e nella funzione del neurotrasmettitore inibitorio acido δ -aminobutirrico (Rossouw et al., 1987).

Studi condotti sul cervello fetale o di bambini, esposti ad alte concentrazioni di Pb, indicano come le cellule endoteliali immature, che costituiscono i capillari dei cervelli in via di sviluppo, siano meno resistenti agli effetti tossici di questo metallo,

rispetto ai capillari dei cervelli di individui adulti, per via della minor efficacia della barriera ematoencefalica. (Goyer et al., 1996).

Negli adulti gli effetti tossici del piombo si manifestano soprattutto con neuropatia periferica, metallo che si ritiene dovuta a un processo di demielinizzazione delle fibre nervose. Un classico esempio di questa affezione è la debolezza del piede e del polso che ricorreva, più di mezzo secolo fa, tra imbianchini e altre categorie di lavoratori eccessivamente esposti.

L'esposizione intensa ad elevate dosi di piombo (da 100 a 200 µg/dl) provoca encefalopatia, i cui sintomi sono: vertigini, insonnia, cefalea, irritabilità e successivamente crisi convulsive e coma. La neuropatia da piombo colpisce soprattutto nello sviluppo, con turbe comportamentali e danni cognitivi. Nell'adulto inoltre, il Pb è stato considerato un possibile fattore di rischio sia per importanti patologie degenerative del sistema nervoso centrale (Parkinson) sia a patologie psichiatriche come la schizofrenia (Rossouw et al., 1987).

EFFETTI EMATOLOGICI

Il piombo determina diverse conseguenze ematologiche, tra le quali vi è un tipo di anemia caratterizzata da globuli rossi microcitici ed ipocromici, come nelle carenze di ferro e, di solito, da un aumento del numero di reticolociti che presentano una colorazione punteggiata basofila. Ciò dipende dall'inibizione dell'enzima pirimidina-5-nucleotidasi (Py-5-N) (Paglia et al., 1975). L'inibizione dell'attività della Py-5-N e l'accumulo del nucleotide, associati all'esposizione al piombi, influenzano la stabilità e la sopravvivenza della membrana eritrocitaria, mediante un'alterazione del metabolismo energetico della cellula. L'anemia che fa seguito agli avvelenamenti da piombo dipende fondamentalmente da due difetti: l'accorciamento della vita degli eritrociti e il peggioramento della sintesi dell'eme. Il primo sembrerebbe essere dovuto

alla maggiore fragilità meccanica delle membrane cellulari. Non sono conosciute le basi biochimiche di questo effetto, è noto tuttavia essere accompagnato dall'inibizione delle ATPasi sodio e potassio-dipendenti (EPA, 1986).

EFFETTI SUL RENE

I rischi sulla funzionalità renale dovuti agli effetti tossici del piombo sono due:

1) una disfunzione tubulare reversibile, che si verifica principalmente nei bambini, dopo un'esposizione acuta e, di solito, associata ad effetti palesi sul sistema nervoso centrale;

2) una nefropatia interstiziale cronica reversibile caratterizzata da sclerosi dei vasi, atrofia delle cellule tubulari, fibrosi interstiziale e sclerosi glomerulare (Goyer, 1996).

Nella fase iniziale dell'esposizione eccessiva al metallo, cambiamenti morfologici e funzionali del rene sono limitati ai tubuli e sono più pronunciati nelle cellule del tubulo prossimale. Una caratteristica patognomonica dell'avvelenamento da piombo è la presenza di tipiche inclusioni nucleari. Al microscopio ottico tali inclusioni appaiono come corpi densi, omogenei ed eosinofili. Se colorati con carbolfucsina, danno una reazione acida veloce. A livello ultrastrutturale presentano un *core* centrale denso e una regione più esterna fibrillare. I corpi sono costituiti da un complesso piombo-proteina (Moore et al., 1973). La proteina è acida e contiene grosse quantità di acido aspartico e glutammico e piccole quantità di cistina. La maggior parte del piombo presente nelle cellule tubulari si trova associato a queste inclusioni. Studi sperimentali hanno dimostrato che tali inclusioni nucleari sono la prima evidenza dell'esposizione al metallo e possono essere osservate prima che si possa mettere in evidenza una qualsiasi delle modificazioni funzionali. La patogenesi di questi corpi può essere associata al trasporto e all'escrezione del piombo attraverso le cellule tubulari. I corpi inclusi costituiscono la frazione preponderante del piombo intracellulare e la loro

perdita mediante le urine può rappresentare la via principale di escrezione del piombo (Gonik, 2008).

Se l'esposizione prosegue si verifica un graduale cambiamento nella morfologia, che incomincia con la comparsa di fibrosi peritubulari e periglomerulari, soprattutto nella zona corticale più profonda e/o in quella juxta-midollare (Goyer, 1996). A ciò, si accompagna un'atrofia di alcuni tubuli e un'iperplasia di altri. Nella fase più avanzata di questa nefrosclerosi, è presente anche un numero inferiore di corpi inclusi o è addirittura impossibile trovarli. Perciò, non è possibile distinguere morfologicamente la fibrosi interstiziale indotta dal piombo da una qualsiasi altra fibrosi interstiziale, ma il riconoscimento deve essere effettuato sulla base delle conoscenze anamnestiche e dello sviluppo della malattia, se sono disponibili. La più importante caratteristica dei cambiamenti associati alle nefropatie acute da piombo è la reversibilità, sia mediante una riduzione dell'esposizione, sia attraverso la terapia con agenti chelanti, ma la fibrosi interstiziale delle nefropatie causate da contatto cronico al metallo non è reversibile.

EFFETTO SULLA PRESSIONE SANGUIGNA

Nella popolazione adulta, l'aumento della pressione sanguigna è probabilmente la conseguenza negativa che si verifica più facilmente, in seguito all'esposizione al piombo.

Il piombo è in grado di influire sulla pressione sanguigna alterando la sensibilità della muscolatura liscia vascolare nei confronti degli stimoli vasoattivi o, indirettamente, alterando il segnale neuroendocrino diretto alla stessa muscolatura. I soggetti esposti al piombo possono presentare un'attività della renina plasmatica superiore rispetto alla norma, durante i periodi di esposizione moderata, ma questa attività torna alla norma o risulta depressa in caso di pesanti esposizioni croniche (Vander, 1988).

CANCEROGENICITÀ

Il piombo è stato classificato tra i composti cancerogeni 2A della IARC (2004). Le prove sono evidenti negli animali ma non nell'uomo. Molti anni fa uno studio condotto su lavoratori inglesi esposti al piombo, non dimostrò un aumento dell'incidenza del cancro (Dingwall-Fordyce e Lane, 1963). Tra le cause di mortalità di 7000 uomini che lavoravano a contatto con il piombo, negli U.S.A., l'incidenza di cancro era lievemente superiore (Cooper e Gaffey, 1975) tuttavia la significatività statistica di questi risultati è stata messa in discussione (Cooper, 1980; Kang et al., 1980). Il tumore più diffuso interessava l'apparato respiratorio ed il sistema digerente, non il rene. Comunque sono stati rilevati dei casi di adenocarcinoma renale in persone che avevano lavorato per lungo tempo a contatto con il piombo (Baker et al., 1980; Lillis, 1981). La proliferazione delle cellule epiteliali tubulari, stimolata dai composti del piombo (Choi e Richter, 1980) ed altri effetti simili, sono stati osservati nel fegato dei ratti (Columbano et al., 1983). Queste sostanze inducono la trasformazione delle cellule embrionali dei criceti "Syrian" (Di Paolo e Casto, 1979; Zelikoff et al., 1988). L'induzione da piombo dell'adenocarcinoma renale nei ratti e nei topi dipende dalla dose e non è stata osservata a livelli inferiori a quelli che causano nefrotossicità (EPA, 1989). La patogenesi dei tumori renali dovuti al piombo può essere associata ad un effetto genetico diretto sulle cellule tubulari, ma può anche essere una risposta non specifica all'iperplasia epiteliale, come è stato osservato in altri tipi di nefropatie indotte sperimentalmente ed in disturbi che colpiscono gli uomini, caratterizzate da cisti e iperplasia tubulari (Bernstein et al., 1987).

- Emissioni (t/anno) passate, attuali e future di Pb e Cd in atmosfera nelle regioni del Mar Mediterraneo (EMEP, 2009)

	1983	1985	1987	1990	1993	1995	1998	2005	2010	2015
t/anno										
PIOMBO										
Combustione del	224	279	295	299	303	315	334	383	423	468
Olio di combustione	176	192	198	191	190	197	209	115	126	140
Benzina motore	19849	19609	20505	11265	9101	9301	9613	9571	5626	5826
Smaltimento rifiuti	274	288	354	393	399	399	401	402	400	401
Lav. metalli non	1351	1717	1518	1348	1392	1394	1397	495	497	500
Lavorazione Acciaio-	355	382	363	329	274	274	273	273	273	272
Cementifici	17	18	19	20	22	22	22	22	22	22
TOTALE	22426	22484	23252	13845	11681	11902	12249	11261	7367	7659
t/anno										
CADMIO										
Combustione del	52	64	68	69	70	73	77	88	98	108
Olio di combustione	15	16	17	16	16	17	18	20	22	24
Benzina motore	2,3	2,4	2,5	2,6	2,6	2,7	2,7	2,9	3,0	3,2
Smaltimento rifiuti	40	42	46	50	51	51	51	51	51	51
Lav. metalli non	109	132	123	114	104	105	105	59	59	59
Lavorazione Acciaio-	4,5	4,9	4,6	4,2	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5
Cementifici	34	36	37	41	43	43	43	44	44	44
TOTALE	257	297	298	297	290	295	300	268	280	293

CADMIO

Il cadmio (dal latino “cadmia” e dal greco “kadmeia” ovvero calamina o cadmia) è un elemento metallico di colore bianco-argenteo, di simbolo Cd e numero atomico 48. La sua scoperta risale al 1817 ed il suo utilizzo industriale è stato poco rilevante fino alla metà del secolo scorso.

Il cadmio è ampiamente diffuso nell'ambiente come inquinante derivante da fonti industriali ed agricole. Attualmente è un metallo molto importante per le sue svariate applicazioni. Per le sue proprietà non corrosive viene impiegato principalmente nella galvanoplastica o nei processi di galvanizzazione. È anche utilizzato come pigmento per pitture e come materiale catodico per le batterie a nichel-cadmio. Il cadmio è un sottoprodotto dell'estrazione dello zinco e del piombo. Anche questi processi contribuiscono a determinare l'inquinamento ambientale.

ESPOSIZIONE

Il cadmio presente nell'atmosfera degli ambienti di lavoro è generalmente inferiore a $0,05 \text{ mg/m}^3$. Le concentrazioni tipiche delle zone non contaminate sono inferiori a $0,1 \text{ } \mu\text{g/m}^3$. La carne, il pesce e la frutta ne contengono da 1 a $50 \text{ } \mu\text{g/kg}$, i cereali da 10 a 150, le maggiori concentrazioni si trovano nel fegato e nel rene degli animali. I bivalvi, tra cui cozze, pettini e ostriche, ne contengono da 100 a $1000 \text{ } \mu\text{g/kg}$ e possono essere una delle principali fonti di cadmio alimentare. Il cadmio presente nell'acqua viene assunto dai molluschi che lo legano a specifici peptidi. In America Settentrionale ed in Europa l'assunzione giornaliera totale di cadmio con gli alimenti, l'acqua e l'aria varia considerevolmente e si stima sia intorno a $10\text{-}40 \text{ } \mu\text{g/die}$. Le piante assorbono più velocemente questo metallo piuttosto che altri. I principali fattori che contribuiscono al suo contenuto nel suolo sono le ricadute dall'aria e la sua presenza

nell'acqua di irrigazione e nei fertilizzanti. Tra questi, quelli commerciali a base di fosfati, ne contengono di solito meno di 20 mg/kg. L'uso di fanghi come concimanti per i terreni agricoli è un'altra fonte di rischio. Questi prodotti possono contenere fino a 1500 mg di cadmio per kg di materia secca (Anderson e Hahlin, 1981). L'assorbimento per inalazione è compreso tra il 15-30%. Negli ambienti di lavoro in cui si diffondono fumi o vapori che contengono cadmio l'esposizione è particolarmente pericolosa dal momento che la maggior parte del metallo presente nell'aria è respirabile. Le sigarette sono una delle principali fonti non occupazionali. Una sigaretta contiene da 1-2 µg di cadmio e il 10% di questo viene inalato (da 0,1 a 0,2) (Akesson et al., 2006; Jarup e Akesson, 2009).

VIE DI ASSORBIMENTO

L'assorbimento gastrointestinale di Cd è inferiore a quello che avviene tramite le vie respiratorie ed è intorno al 5-8%. È facilitato dalle diete carenti di calcio, ferro e proteine. La sintesi delle proteine che legano il calcio aumenta a causa di uno scarso apporto di quest'ultimo e ciò, in ultima analisi, determina un aumento nell'assorbimento del cadmio. In generale, le donne gestanti risultano essere più sensibili alla tossicità del cadmio, soprattutto a causa del maggiore assorbimento intestinale di cadmio dato dalle basse riserve di ferro (Akesson et al., 2002 ; Vahter et al., 2007)

Lo zinco causa una diminuzione dell'assorbimento, perché stimola la produzione di metallotioneina. Il cadmio viene trasportato nel sangue legato ai globuli rossi e a proteine plasmatiche ad alto peso molecolare, soprattutto all'albumina. Una frazione minore può essere trasportata dalla metallotioneina. In individui adulti non eccessivamente esposti al metallo i livelli ematici sono di solito inferiori a 11 µg/dl. Nei neonati il contenuto è invece basso, generalmente 1 mg nell'intero organismo. La

placenta, oltre a sintetizzare la metallotioneina, può rappresentare una barriera nei confronti del cadmio di origine materna, ma il feto può venirne a contatto se aumenta l'esposizione della madre. Il latte umano e bovino in genere ne contengono quantità inferiori a 1 mg/kg. Circa il 50-75% del cadmio contenuto nell'organismo si trova nel fegato e nei reni: non si conosce esattamente l'emivita, tuttavia sembra sia di parecchi anni e che possa arrivare fino a 30 anni. Il cadmio si accumula progressivamente nei tessuti molli, soprattutto nel rene fino all'età di 50-60 anni e poi comincia a diminuire lentamente. L'assunzione alimentare di cadmio è fonte di preoccupazione. Studi condotti in Svezia mostrano, nel corso degli anni, un lieve ma costante aumento del contenuto di cadmio nella verdura.

TOSSICITÀ

Tossicità acuta

La tossicità acuta può essere conseguente all'ingestione di concentrazioni relativamente alte del metallo e ciò può accadere con alimenti o bevande contaminate. Nordberg (1972) riferisce di un caso in cui dopo il consumo di bibite che contenevano circa 16 mg/l di cadmio si sono manifestate nausea, vomiti e dolori addominali. Si ebbe tuttavia un miglioramento in breve tempo senza apparenti effetti ritardati. L'inalazione di vapori di cadmio o di altri materiali contenenti cadmio trattati termicamente può causare polmonite acuta ed edema polmonare.

Tossicità cronica

I principali effetti a lungo termine di un'esposizione a bassi livelli di cadmio sono ostruzione polmonare cronica, enfisema e patologie croniche dei tubuli renali. Possono verificarsi anche effetti a carico del sistema cardiaco.

Polmonite cronica

La tossicità nei confronti del sistema respiratorio è proporzionale al tempo ed al livello di esposizione. L'ostruzione polmonare è dovuta a bronchite cronica con fibrosi progressiva delle vie aeree inferiori ed è accompagnata da un danno alveolare che porta all'enfisema. I disturbi polmonari si manifestano con dispnea, riduzione della capacità vitale ed aumento del volume residuo. La patogenesi della lesione polmonare è attribuibile alla necrosi e al ricambio dei macrofagi alveolari. Gli enzimi che vengono rilasciati danneggiano irreversibilmente le membrane dell'alveolo e causano la rottura dei setti e fibrosi interstiziali. Il cadmio riduce l'attività dell'alfa-1-antitripsina e in questo modo potrebbe aumentare il suo potenziale tossico nei confronti del polmone. Tuttavia, tra persone esposte professionalmente al metallo e che accusano enfisema e quelle che non lo accusano, non sono state riscontrate differenze nell'attività dell'alfa-1-antitripsina plasmatica (Lauwerys et al., 1979).

CANCEROGENICITÀ

Alcuni studi epidemiologici si sono indirizzati alla determinazione del rapporto tra esposizione occupazionale al cadmio e tumori polmonari e prostatici. Secondo uno studio epidemiologico condotto in Gran Bretagna (Sorahan et al., 1983) ed uno condotto in Svezia (Kjellstrom, 1979) sugli addetti alla lavorazione delle batterie al Nichel-Cadmio, vi è un aumento del rischio riferito ad entrambi i tipi di tumore. Successivamente è stato anche rianalizzato uno studio a coorte relativo agli addetti ad un impianto statunitense di recupero del cadmio che ha evidenziato come il cancro delle vie aeree risulti aumentato (Thun et al., 1985). Il cadmio è stato classificato dall'International Agency for Research on Cancer (IARC Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro) come cancerogeno di Categoria 1 (umano) principalmente sulla base della relazione esistente con il cancro polmonare (IARC, 1993). Gli studi eseguiti su

animali da esperimento hanno fornito considerevole supporto al potenziale cancerogeno del cadmio. Nel ratto, dopo somministrazione sottocutanea, il cloruro, l'ossido, il solfato ed il solfito di cadmio producono sarcomi locali mentre la polvere di cadmio ed il solfito di cadmio producono sarcomi locali dopo somministrazione intramuscolare. Il cloruro di cadmio causa un incremento dose-dipendente dell'incidenza di carcinomi polmonari dopo esposizione per via inalatoria e una relativamente bassa incidenza (5/100) di carcinomi prostatici in seguito ad iniezione effettuata nella parte ventrale dell'organo (Takenaka et al., 1983). Mentre l'evidenza di una relazione tra cadmio e cancro alla prostata nell'uomo è materia di dibattito, studi su ratti hanno dimostrato effetti cancerogeni nella parte ventrale della prostata dopo somministrazione orale, parenterale, o per iniezione diretta (Waalkes e Rehm, 1994).

EFFETTI SULL'APPARATO SCHELETRICO

Diversi studi hanno dimostrato come il cadmio possa esercitare un'azione diretta e indiretta sul *turnover* osseo. Indirettamente tramite disfunzione renale, e direttamente influenzando la mobilitazione di minerali ossei dal tessuto scheletrico (Akesson et al., 2006 ; Nawrot et al., 2010, Engström et al., 2011).

Poiché il cadmio interferisce con il metabolismo del calcio, i soggetti con gravi nefropatie, indotte dal cadmio, possono sviluppare calcoli renali ed avere un'eccessiva secrezione di calcio, probabilmente per accresciuta escrezione urinaria (Jarup et al, 2003); tuttavia, qualora l'esposizione fosse cronica, il calcio escreto nelle urine può essere inferiore alla norma.

Il cadmio, può influenzare oltre al metabolismo del calcio, anche quello del fosforo e del tessuto osseo, sia dopo l'esposizione occupazionale sia ambientale, questi effetti possono essere secondari a quelli indotti dal metallo sui reni. Gli studi sul metabolismo del calcio nei soggetti esposti ad alte dosi sono ancora piuttosto esigui. In

alcune industrie è stato riscontrato un aumento del numero di individui con calcoli renali, presumibilmente una manifestazione degli effetti indotti dal cadmio su quest'organo. Tuttavia, non è ben noto se vi siano altri motivi che contribuiscono a determinare questo stato.

Inoltre possono verificarsi alterazioni a carico delle ossa, attribuibili alla perdita di calcio, che si manifestano con dolori alle ossa, osteomalacia e/o osteoporosi. Le alterazioni a livello del sistema scheletrico sono uno degli aspetti di una sindrome denominata "Itai-Itai" (Itai Itai disease) riscontrata in donne multipare e in menopausa che vivevano nell'area di Fuchu, in Giappone, prima e durante la Seconda guerra mondiale. Tale sindrome consisteva in gravi deformazioni ossee e in una malattia renale cronica. A questi malesseri si accompagnava un dolore osseo definito Itai-Itai ("Ahi-Ahi"). Si pensa che nella patogenesi di tutti questi disturbi fosse dovuta ad un'eccessiva esposizione al cadmio (Kjellström, 1992) anche se, attendibilmente, sono coinvolti altri fattori, tra cui la carenza di vit.D e, forse, altre insufficienze nutrizionali.

Alcuni individui, esposti ad alte dosi del metallo nell'ambiente di lavoro, ed altri, affetti dalla sindrome Ita-Itai, presentavano osteomalacia. I casi di esposizione professionale riguardavano soprattutto uomini, mentre gli individui affetti dalla sindrome dell'Itai Itai erano quasi esclusivamente donne. Le caratteristiche chimiche e biochimiche sono simili, i pazienti affetti da Itai-Itai possono anche soffrire di osteoporosi. Nogwa et al. (1987) riportano che i livelli sierici di $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-vit.D}$ risultavano inferiori sia nei soggetti colpiti da Itai- Itai sia in quelli che accusavano un danno renale da esposizione al cadmio rispetto ad individui non esposti. Da notare che la diminuzione dei livelli sierici di $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{-vit.D}$ erano strettamente correlati alla concentrazioni sieriche di ormone paratiroideo. Quindi, la β_2 -microglobulinuria e la percentuale di riassorbimento tubulare lasciano supporre che gli effetti del metallo sul sistema scheletrico siano principalmente determinanti da una alterazione del metabolismo della vit.D e dell'ormone paratiroideo. Secondo Friberg et al. (1986) il

cadmio deprime le funzioni delle cellule del tubulo prossimale con conseguente riduzione della trasformazione della 25(OH)-vit.D a $1\alpha,25(\text{OH})_2$.vit.D.

Questo può comportare un minore assorbimento di calcio e dunque ridotta mineralizzazione ossea con possibile manifestarsi dell'osteomalacia. (Goering, Waalkes e Klaasen, 1995).

Inoltre, l'esposizione al cadmio è risultata essere inversamente associata alle dimensioni dei bambini alla nascita, e questo rapporto può variare tra i due sessi (Kippler et al., 2012b).

BIOMARCATORI

Un marcatore biologico, o biomarker, può essere definito come un parametro biologico, di tipo biochimico, fisiologico, citologico, morfologico, ottenibile da tessuti, fluidi umani, gas espirati, associato (direttamente o indirettamente) con l'esposizione ad un inquinante ambientale. A seconda del tipo di valutazione che si intende effettuare possiamo distinguere:

- Indicatori di esposizione, finalizzati alla valutazione dell'esposizione in base alla quantità di sostanza effettivamente assorbita;
- Indicatori di suscettibilità, utili per definire la predisposizione di un individuo, sia essa ereditata o acquisita, a subire l'effetto della sostanza inquinante (es. valutazioni genetiche).

BIOMARCATORI DI ESPOSIZIONE

La scelta dei biomarcatori di esposizione, rappresenta uno dei punti fondamentali nella progettazione di uno studio di biomonitoraggio, in quanto la scelta non può essere disgiunta dalla conoscenza del comportamento degli indicatori utilizzati, in relazione alle caratteristiche dell'esposizione allo xenobiotico (l'entità, la continuità, la durata, l'intervallo tra termine dell'esposizione e la determinazione analitica) e da tutti i fattori indipendenti dall'esposizione, quindi i caratteri individuali (fisiologici e/o patologici), che possono modificare i livelli degli indicatori biologici scelti.

Un biomarker ideale dovrebbe essere specifico e capace di quantificare anche basse concentrazioni del contaminante. Inoltre dovrebbe prevedere l'utilizzo di tecniche di prelievo non-invasive e saggi non costosi. In ultimo dovrebbe rappresentare in maniera accurata il grado di esposizione e poter integrare l'esposizione nel tempo.

Il sangue è stato, nelle ultime sei decadi, la matrice biologica maggiormente utilizzata per la determinazione quantitativa dei livelli di piombo (PbB) e di altri metalli pesanti negli individui esposti ad inquinamento ambientale (Barbosa et al., 2005; Shah et al., 2010; Sanna et al., 2011). Tuttavia, si indaga costantemente sulla possibilità e validità di utilizzare dei biomarker alternativi, come ad esempio urine, unghie e capelli (Wolfsperger et al., 1994; Nowak, 1996; ATSDR, 2001; Seidel et al., 2001; Morton et al., 2002; Barbosa et al., 2005; Scheepers, 2008; Lakshmi Priya e Geetha, 2010).

BIOMARCATORI SOSTITUTIVI: I CAPELLI

L'utilizzo dei capelli come marcatori per la determinazione di farmaci, metaboliti, veleni è ampiamente riportato nella letteratura scientifica nel corso degli ultimi due decenni (LeBeau et al., 2011)

Numerosi studi, così come la U.S. Environmental Protection Agency (Pandiani, 2000), hanno dimostrato come i capelli possano essere considerati anche un buon indicatore del livello di esposizione ai metalli pesanti (Chatt e Katz., 1988; Bergomi et al., 1989; Senofonte et al., 1989; Graziano, 1994; Nowak et al., 1998, 2000; Bradman et al., 2001; Wilhelm et al., 2002; Kordas et al., 2004; Strumylaite et al., 2004; Anwar, 2005; Zaida et al., 2007; Dunicz-Sokolwska et al., 2007; Sanna et al., 2008; Rodrigues et al., 2008; Yao et al., 2008, Sanna e Vallascas, 2011, Varrica et al., 2014, Tamburo et al., 2014).

Le sostanze organiche e inorganiche si depositano nei capelli attraverso diversi meccanismi, tra i quali la diffusione dal sangue al follicolo pilifero, l'assorbimento da secrezioni delle ghiandole sebacee, il sudore, e l'esposizione ambientale (Henderson, 1993). Per via della loro costituzione i capelli, data per l'80% da proteine, il 15% acqua e un restante 5% di lipidi e materiali inorganici (Chatt e Katz, 1988), presentano una

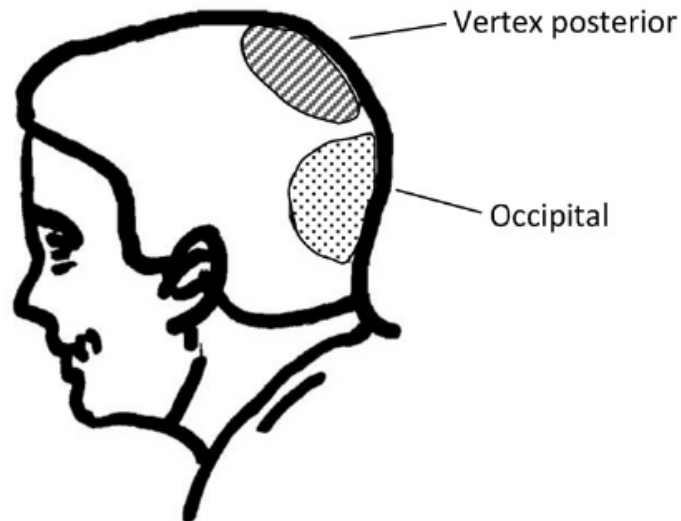
grande affinità chimica con i metalli pesanti, che reagiscono con i gruppi sulfidrilici e vengono incorporati nelle molecole di cheratina del capello.

Rispetto ad altre matrici biologiche, i capelli sono capaci di fornire informazioni a lungo termine sull'esposizione di un individuo ai metalli pesanti. La finestra temporale di rilevamento è legata alla lunghezza dei capelli e varia tipicamente da alcune settimane a parecchi mesi o più (LeBeau et al., 2011), mentre la determinazione ematica consente di monitorare un periodo di 1-2 mesi (Saraci e Ziegler-Skylakakis, 1999; Furman e Laleli, 2000; Wilhelm et al., 2002; Dunicz-Sokolowska et al., 2006; Stupar et al., 2007; Sanna e Vallasca, 2011).

I capelli, come biomarker, presentano notevoli vantaggi, infatti permettono una più facile raccolta del campione, sono agevolmente trasportabili e non necessitano di particolari metodi di conservazione in laboratorio (Sanna et al., 2003, 2008; Torrente et al., 2005; Shah et al., 2010; Sanna e Vallasca, 2011, Tamburo et al., 2014). Inoltre i capelli, risultano essere particolarmente adatti nei campionamenti effettuati sui bambini in quanto presentano un metodo di raccolta indolore e poco invasivo (Shah et al., 2010; Sanna e Vallasca, 2011). Queste caratteristiche, insieme alla stabilità che alcuni metalli mostrano nei capelli, rendono le indagini più facilmente reiterabili nel tempo (Stupar et al., 2006; Rodrigues et al., 2008).

Tuttavia, Wolfsperger et al., (1994) riporta che vi possano essere differenze, statisticamente significative, nelle concentrazioni di metalli pesanti in sottopopolazioni secondo l'età, il sesso, il colore dei capelli e l'abitudine al fumo. Inoltre, è ancora dibattuto se vi sia una buona concordanza tra i livelli di metalli misurati nei capelli e nei fluidi biologici (Lech, 2002; Sanna et al., 2003, 2005; Barbosa et al., 2005; Sukumar et al., 2007, Tamburo et al., 2014).

– Regioni del cuoio capelluto suggerite per la raccolta dei capelli (LeBeau et al., 2011).

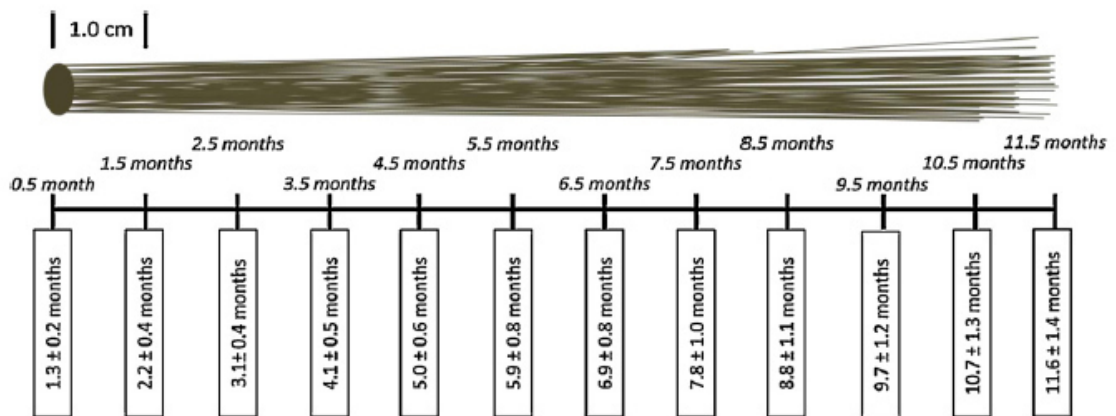


Un altro limite nell'utilizzo dei capelli come biomarker può essere rappresentato dalla difficoltà nel discriminare l'origine esogena o endogena degli elementi determinati. Infatti gli elementi metallici possono essere incorporati nella struttura cheratinica dei capelli in seguito a contatto con cosmetici o per via di prodotti applicati sui capelli (Barbosa et al., 2005, Tamburo et al., 2014)

La capacità di distinguere l'origine endogena dei metalli pesanti, vale a dire, assorbiti nel sangue e incorporati nella matrice dei capelli, da quelli di origine esogena, vale a dire, derivati dalla contaminazione esterna, è una problematica tutt'ora aperta (Sanna et al., 2003; Ozden et al., 2007; Stupar et al., 2007).

Ciò nonostante, l'utilizzo dei capelli come biomarcatori per la determinazione delle concentrazioni dei metalli pesanti ha dato luogo a studi in vari campi, come ad esempio la tossicologia (Taylor, 1986), Medicina (Yasuda et al., 2013; Czerny et al., 2014), la dietetica clinica (Dorea et al., 1982; Kozielec et al., 1989) e l'inquinamento ambientale (Sanna et al., 2003; Bao et al., 2009; Dongarrà et al., 2011; Barbieri et al., 2011; Coelho et al., 2014; Varrica et al., 2014).

- Tempo di crescita dei capelli (LeBeau et al., 2011).



BIOMARCATORI DI SUSCETTIBILITÀ: I POLIMORFISMI GENETICI

I polimorfismi genetici sono dei biomarcatori di suscettibilità che ci permettono di valutare il grado di risposta dell'individuo in funzione della sua sensibilità (genetica) ad una sostanza o ad un suo metabolita.

È da tempo riconosciuto l'esistenza di una grande variazione nella suscettibilità agli effetti dell'esposizione ai metalli pesanti nelle popolazioni umane. Questa variazione è legata a fattori propri riconducibili alla popolazione, quali lo stato socio-economico, l'esposizione ambientale, fattori comportamentali e fattori genetici ancora ad oggi non bene identificati (CDC, 1997; Lanphear et al., 2002; Pawlas et al., 2015).

Diversi studi sull'uomo hanno mostrato come i livelli di calcio riducano l'assorbimento di piombo, identificando una correlazione inversa tra la bassa densità minerale ossea e la concentrazione di piombo nel sangue (Campbell e Auinger, 2007; Khalil et al., 2008). Analogamente, studi su cellule renali in vitro hanno dimostrato come il piombo interferisca con la mobilizzazione del calcio intracellulare, suggerendo così che l'esposizione al piombo possa inibire l'assorbimento del calcio dall'alimentazione (Pokorski et al., 1999; Olivi et al., 2002).

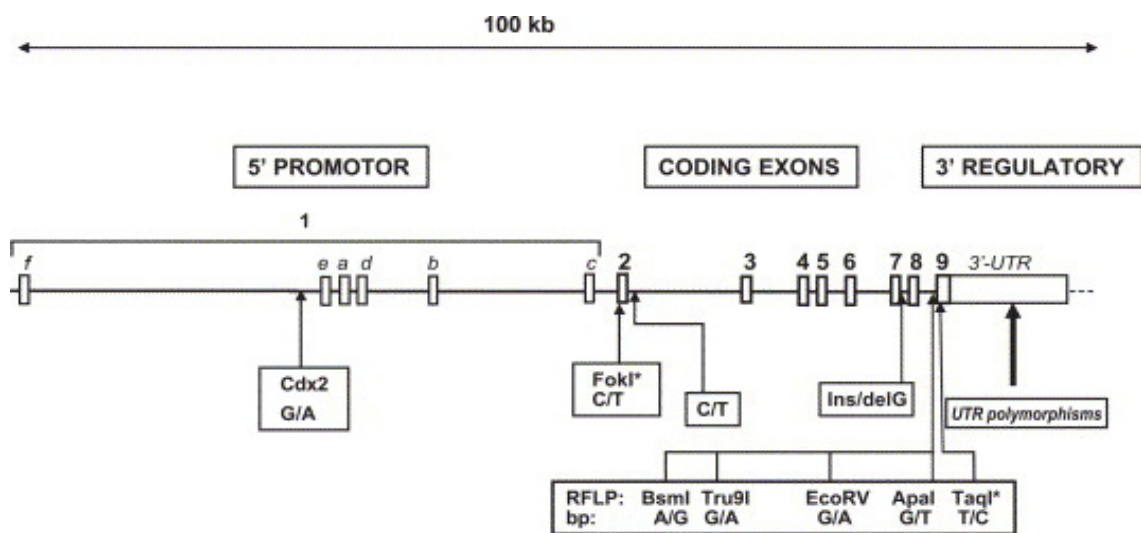
Conseguentemente i polimorfismi genetici legati al metabolismo del calcio, possono influenzare l'assorbimento di piombo. I geni coinvolti sono quelli che codificano per i canali del calcio, per i ligandi del calcio intracellulare (calbindina 1) e il recettore della vitamina D (VDR).

Diversi studi forniscono indicazioni su come i polimorfismi del gene codificante il recettore della vitamina D (VDR) sarebbero legati alla tossico-cinetica del piombo (Pawlas et al., 2015) a causa del funzione svolta da VDR nel metabolismo del calcio.

Gli effetti della Vitamina D sono mediati dal suo recettore nucleare (VDR), che forma un complesso eterodimerico con il recettore dell'acido retinoico ed interagisce

con i fattori di trascrizione. VDR (12q12-14) codifica per una proteina di 427 aminoacidi, che regola il trasporto e l'omeostasi del calcio. Esistono diversi siti polimorfici nella regione 3' del gene umano VDR identificati dalle endonucleasi di restrizione TaqI e BsmI, ed un'altra variante polimorfica, riconosciuta da FokI, a livello del codone di inizio della trascrizione nell'esone 2. Gli alleli vengono rispettivamente chiamati T-t, B-b e F-f: le lettere minuscole identificano la presenza del sito di restrizione e le lettere maiuscole indicano l'assenza di tale sito.

- Struttura esone-introne del gene VDR e posizione dei polimorfismi noti (Uitterlinden et al., 2004)

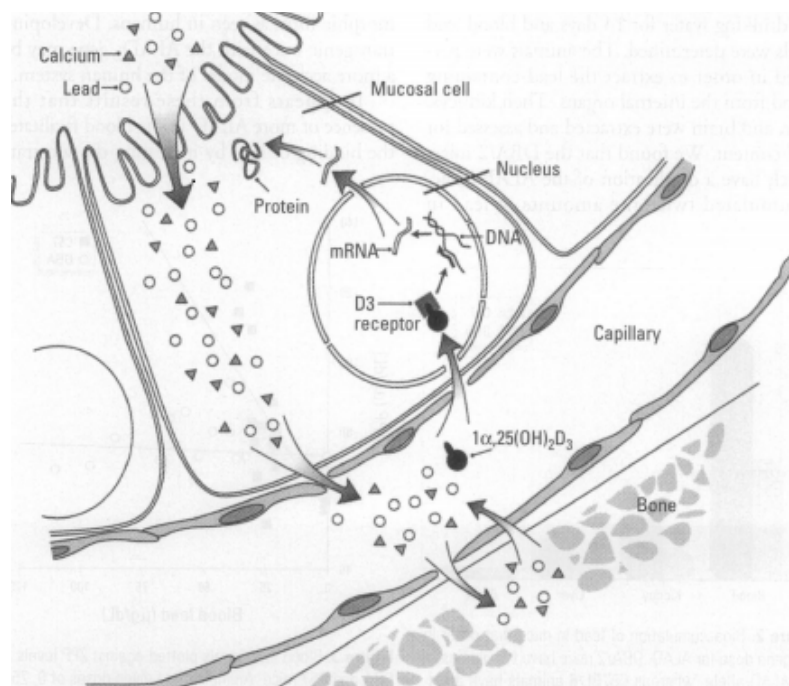


Il polimorfismo TaqI, localizzato nell'esone 9 del gene VDR, a livello del codone 352, consiste in una variazione nucleotidica T → C. Il nucleotide T viene anche definito allele T, mentre il nucleotide C viene definito allele t. Tale polimorfismo è stato associato ad un aumento del turnover delle cellule ossee con conseguente aumento del rischio di una ridotta densità minerale ossea ed osteoporosi. Inoltre uno studio sulla tossicità a carico del sistema nervoso centrale suggerisce che il polimorfismo TaqI di VDR sia implicato nella variabilità alla tossicità (Krieg et al., 2010).

Il polimorfismo BsmI (rs1544410), localizzato nell'introne 8 del gene VDR e consistente in una variazione nucleotidica A→G, è associato invece alla variazione della stabilità del trascritto. Il nucleotide A viene anche definito allele B, mentre il nucleotide G viene definito allele b. Alcuni studi hanno dimostrato che il genotipo BB predispone ad un ridotto assorbimento di calcio a livello intestinale, mentre il genotipo bb è stato associato a più bassi livelli di piombo nel sangue (Schwartz et al., 2000; Rezende et al., 2008).

Il polimorfismo FokI (rs2228570), consiste in una sostituzione nucleotidica T→C a livello del codone di inizio della traduzione del gene VDR (ATG → ACG). Tale polimorfismo determina la traslazione di tre aminoacidi dal sito d'inizio della traduzione del gene con conseguente alterazione della relativa proteina, mancante di tre aminoacidi (Arai H et al., 1997). Il nucleotide T viene anche definito allele f, mentre il nucleotide C viene definito allele F. Il genotipo FF (forma corta) è stato associato a più bassi livelli di piombo nel sangue (Haynes et al., 2003; Rezende et al., 2008).

– Possibile ruolo del recettore della vitamina D (VDR) nell'assorbimento del calcio e del piombo (Onalaja et al., 2000)



Studi sui polimorfismi del gene dell'acido δ -aminolevulinico deidratasi (ALAD) hanno evidenziato come la sensibilità di ogni singolo individuo agli effetti tossici del piombo possa essere messa in relazione ai polimorfismi genetici dell'eme (Zhao et al., 2007; Pawlas et al., 2012; 2015). L'acido δ -aminolevulinico deidratasi (ALAD) è un enzima citoplasmatico che catalizza la seconda tappa biosintetica dell'eme, rappresenta il principale bersaglio molecolare del piombo inorganico (Pb) circolante nel sangue periferico. Si tratta di una metalloproteina di 280kDa, composta da 8 subunità identiche, ciascuna delle quali lega come cofattore, indispensabile per l'attività enzimatica, un atomo di Zn. È stato calcolato che circa l'80% del Pb contenuto all'interno dell'eritrocita spiazzò lo Zn dal legame con l'ALAD, inibendone l'attività enzimatica, per alterazione della sua struttura quaternaria.

Il gene per l'ALAD, localizzato sul cromosoma 9q34, ha due alleli comuni, ALAD¹ e ALAD², che danno origine a un sistema enzimatico polimorfico, costituito da tre diversi fenotipi isoenzimatici, identificati come ALA-D1-1, ALA-D1-2, ALA-D2-2. Le frequenze dei fenotipi isoenzimatici, determinate in una popolazione italiana, sono 1-1, 81%; 2-1, 17%; 2-2, 2%. È stato ipotizzato che gli individui con fenotipo 2-2, presumibilmente a causa della maggiore elettronegatività di questo rispetto al peptide ALA-D1-1, possano andare incontro ad un maggior accumulo di piombo e, quindi, agli effetti fisiologici associati (Ziemsens et al., 1986).

Tuttavia, ad oggi è ancora esiguo il numero di studi che suggeriscano la possibilità che i genotipi del recettore VDR possano influenzare i livelli di assorbimento del piombo, così come pochi sono i lavori sui polimorfismi di ALAD, e la maggior parte condotti sulla popolazione adulta ed occupazionalmente esposta.

La Metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR) è un enzima centrale nel metabolismo dei folati in quanto catalizza la conversione irreversibile del 5 – 10 metilentetraidrofolato in 5 metiltetraidrofolato che serve come donatore di metili per la rimetilazione della omocisteina a metionina tramite l'intervento della vitamina B¹² (Frosst et al., 1995).

La sostituzione di una C (citosina) in T (timina) a livello del nucleotide 677 (C677T) determina una sostituzione nella proteina finale di una alanina in valina. Questa variazione determina la riduzione dell'attività enzimatica della MTHFR del 35%-50% (van der Put et al., 1998). Tale variante comporta livelli elevati nel sangue di omocisteina. La presenza di questa mutazione può portare a ripercussioni sulle funzioni immunitarie, sul metabolismo muscolare, sulla produzione e regolazione dei neurotrasmettitori chimici e soprattutto sulla disintossicazione degli xenobiotici dall'organismo.

La metilazione del DNA svolge un ruolo importante in diversi processi cellulari ed è necessario per il normale sviluppo dell'uomo. La metilazione del DNA è mediata da DNA metiltransferasi (DNMT), che trasferisce un gruppo metile da S-adenosilmetionina alla posizione C5 di citosina nel DNA (Stankov et al., 2011). L'esposizione ad alcuni inquinanti ambientali, quali il cadmio, possono indurre cambiamenti nelle DNMT e nei livelli di metilazione del DNA (Waterland e Jirtle, 2003; Anway et al., 2005).

La metilazione del DNA è essenziale per embriogenesi e per mantenere l'espressione genica cellulo-specifico per tutta la vita. La disregolazione dei processi epigenetici, come la metilazione del DNA, può portare ad alterazione nello sviluppo durante l'infanzia e alla comparsa di malattie croniche, tra cui il cancro (Feinberg, 2007; Faulk e Dolinoy, 2011; Robins et al., 2011)

INQUADRAMENTO GENERALE DEI COMUNI STUDIATI

I due Comuni presi in esame, Iglesias e Sant'Antioco sono situati nella zona sud-occidentale della Sardegna nella provincia di Carbonia-Iglesias e distano circa 30 km l'uno dall'altro.

– Inquadramento geografico dei comuni esaminati



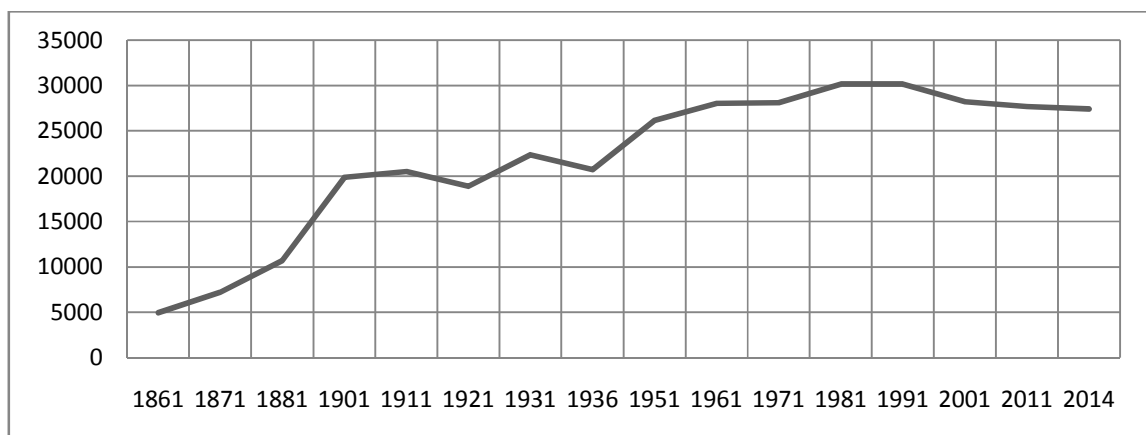
IGLESIAS

Il Comune di Iglesias si trova nella Sardegna sud-occidentale, insieme al Comune di Carbonia è capoluogo della provincia omonima di Carbonia-Iglesias.

Le prime tracce di insediamento umano nel territorio comunale di Iglesias sono riconducibili alla Cultura neolitica di San Michele di Ozieri (3200 a.C. – 2800 a.C) per via della presenza delle tipiche tombe ipogee (*Domus de Janas*) della Cultura di Ozieri nell'area montuosa di San Benedetto.

Il Comune è formato da 27.391 abitanti (fonti ISTAT 2014), ha una superficie di 208,23 km² ed è situato a 200 m sul livello del mare.

– Andamento demografico dal 1861 al 2014 del Comune di Iglesias (ISTAT)



Il Comune di Iglesias è stato scelto come Comune oggetto di indagine in quanto nel suo territorio ricadono alcune delle più antiche e più importanti miniere di polimetallo d'Italia. Il suo territorio è stato intensamente sfruttato per l'estrazione di zinco, piombo, argento e depositi di bario dall'epoca pre-romana fino alla fine del secolo scorso.

Al giorno d'oggi, i grandi affioramenti di solfuro e ossidi di minerali metallici nonché i prodotti dell'attività estrattiva, sono presenti in tutto il territorio e sono responsabili di concentrazioni insolitamente elevate di metalli e metalloidi.

La più grande concentrazione di rifiuti legati all'attività estrattiva in Sardegna, si trova nella valle del San Giorgio, vicino alla città di Iglesias. Quest'area comprende le miniere di Monteponi, San Giovanni, Campo Pisano, Monte Agruxiau e Monte Scorra.

Il Governo Italiano, con il D.lgs 334/1999, ha dichiarato le aree mineralizzate della Sardegna ad alto rischio di crisi ambientale e ha descritto come esse rappresentino una possibile minaccia per la salute degli abitanti.

Il deterioramento della qualità delle acque del Sulcis-Iglesiente, legato al drenaggio delle miniere e all'alterazione dei rifiuti dell'attività estrattiva è stato documentato in numerosi lavori (Cidu et al., 2007, 2009; Cidu, 2011; Medas et al., 2012a, 2012b), nei quali sono stati riscontrati alte concentrazioni di Zn, Cd e Pb sia in acque superficiali sia sotterranee. L'analisi dei sedimenti ha mostrato un significativo flusso anomalo di Mn-Zn-Pb-Cu-Ag, nonché una vasta diffusione di elementi inquinanti come Cd, As, Hg e Sb non direttamente legato allo sfruttamento dei minerali (Boni et al., 1999; De Vivo et al., 1999; 2006). Elevati livelli di Pb, Zn e Cd sono stati riscontrati anche in campioni di vegetazione (Leita et al., 1989).

Inoltre studi di biomonitoraggio hanno riportato la presenza di maggiori concentrazioni di piombo in capelli di bambini residenti nella zona del Iglesiente rispetto a bambini non esposti residenti in aree geografiche della Sardegna meridionale (Sanna et al., 2008).

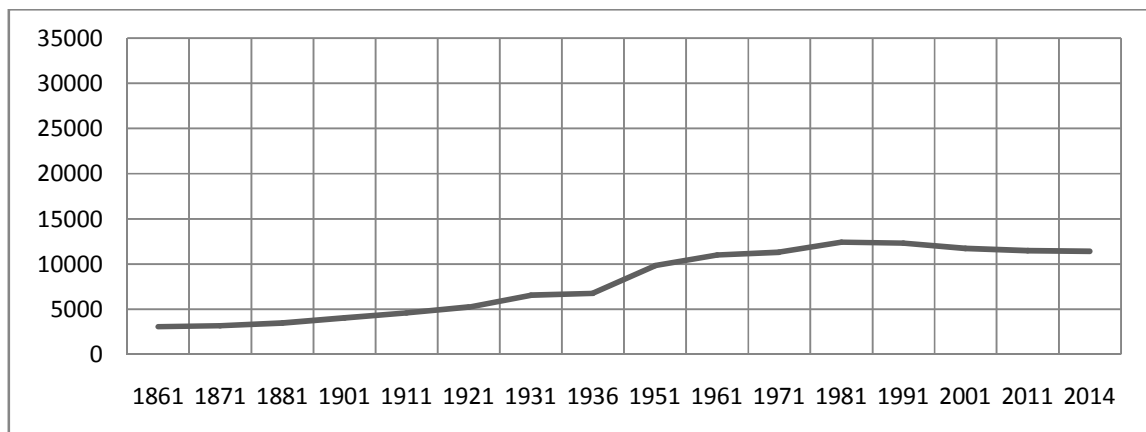
SANT'ANTIOCO

Il Comune di Sant'Antioco è situato nella Sardegna sud-occidentale nella provincia di Carbonia-Iglesias.

È il principale Comune dell'omonima isola. La storia di Sant'Antioco è antichissima come testimonia la presenza di una trentina di nuraghi, un certo numero tombe dei giganti e di *Domus de janas*. Il primo nucleo della città sarebbe riconducibile al VIII secolo a.C. da parte dei Fenici come testimoniano sia fonti letterarie sia diversi ritrovamenti archeologici.

Il Comune è composto da 11.423 abitanti (ISTAT 2014), ha una superficie di 87,9 km² ed è situato a 10 m sul livello del mare.

- Andamento demografico dal 1861 al 2014 del Comune di Sant'Antioco (ISTAT)



Il Comune di Sant'Antioco è stato scelto come Comune di confronto per via della sua specifica posizione geografica, in quanto ubicato in un'area limitrofa, ma totalmente periferica rispetto alle mineralizzazioni di solfuri di zinco e piombo proprie del Comune di Iglesias (Morra et al., 1994;. Lustrino et al., 2013).

In conseguenza all'attività produttiva delle industrie presenti nel polo industriale di Portovesme, anche se la loro attività risulta ad oggi terminata, l'area del Comune di Sant'Antioco è stata inclusa nell'area del Sulcis-Inglesiente definita "zona ad alto rischio di crisi ambientale" in base sia al D.C.M. 291/90 sia alla L.R. n° 7 - 2002 "reiterazione della dichiarazione di area ad elevato rischio ambientale"

Da un'indagine sui livelli di piombemia nel sangue in bambini di Sant'Antioco effettuata nel 1987 (Cardia et al., 1989) è risultata una media pari a 8,30 µg/dl, molto simile a quella registrata per il Comune di Calasetta, 8,4 µg/dl, ma nettamente inferiore a quella registrata nello stesso anno per i bambini di Portoscuso, 12,7µg/dl. Valori inferiori sono stati riscontrati in uno studio successivo (Sanna et al., 2002) in cui i valori di piombemia medi sono stati di 3,93 µg/dl, mentre nel Comune di Portoscuso è risultata di 9,16 µg/g. Un lavoro successivo (Sanna et al., 2007), condotto sulle concentrazione di Pb nei capelli, riporta un valore di 5,4 µg/g nel Comune di Sant'Antioco. Valore nettamente inferiore rispetto a quello rilevato nello stesso studio per il Comune di Portoscuso, 11,85 µg/g.

OBIETTIVI DELLA TESI

Questo lavoro si inserisce nell'ambito degli studi ambientali volti a valutare i livelli di metalli pesanti nel sangue e/o nelle urine e/o nei capelli di individui di diverse comunità della Sardegna e di approntare nuove strategie di Biomonitoraggio delle popolazioni umane (Floris et al., 1995, 1999; Floris e Sanna, 1997, 1998; Sanna et al., 1995, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2007, 2008, 2011a, 2011b).).

In particolare l'obiettivo di questo studio è stato quello di:

- Acquisire conoscenze circa la potenziale esposizione a metalli pesanti, quali Pb e Cd, nelle popolazioni che vivono in diversi ambienti geochimici della Sardegna sud-occidentale: Iglesias e Sant'Antioco.
- Verificare se sia rilevabile un impatto sub-clinico sull'accrescimento da parte del Pb e del Cd tramite un modello di relazione tra i livelli dei metalli riscontrati con caratteristiche socio-economico e demografiche, antropometriche e proxy dello stato nutrizionale.
- Valutare attraverso l'analisi di polimorfismi genetici del DNA coinvolti nel metabolismo e nella toxocinetica del Pb e del Cd, se sia possibile individuare dei marcatori per la creazione di un sistema avanzato di sorveglianza ambiente-salute, in grado di spiegare le variazioni individuali che determinano una diversa suscettibilità all'assorbimento all'interno di una popolazione esposta alle stesse condizioni d'inquinamento ambientale.

MATERIALI E METODI

CAMPIONAMENTO

Il campione trasversale è composto da 144 individui, di ambo i sessi, residenti nei due Comuni a differente retroterra ambientale. Il Campione del Comune di Iglesias è costituito da 23 individui di sesso maschile e 33 femminile, quello del Comune di Sant'Antioco da 32 maschi e 52 femmine.

I dati sono stati raccolti tra il mese di Gennaio ed il mese di Marzo del 2013. L'età dei soggetti campionati è compresa tra gli 11 ed i 14 anni ed è stata convertita in età decimale secondo Eveleth e Tanner (1990). Nel campione sono stati inclusi solamente i soggetti residenti nei Comuni campionati da almeno 5 anni, apparentemente sani.

Nel campione sono stati inclusi solamente i soggetti, che non assumessero sostanze quali bevande alcoliche, fumo, prodotti per capelli, tali da influenzare la concentrazioni di Pb e Cd

Per ciascun partecipante è stata richiesta ai genitori (o a chi ne fa le veci) l'autorizzazione al campionamento (L. 675/1996 concernente "La tutela delle persone e di altri soggetti rispetto al trattamento dei dati personali" ed il D.L. 196/2003 concernente "Codice in materia di protezione dei dati personali"). Inoltre, è stato ottenuto l'assenso al campionamento da parte del Comitato etico della Autorità Sanitaria Locale (ASL Carbonia, delibera numero 1102, 28 giugno 2013).

Per ciascun individuo campionato è stata compilata una scheda che riporta nella prima parte, a cura dei genitori, le seguenti informazioni:

- i dati anagrafici dell'esaminando (luogo e data di nascita del soggetto)
- i dati anagrafici ed antropometrici dei genitori (luogo di nascita del padre e della madre, statura e peso del padre e della madre, professione e titolo di studio del padre e della madre, statura e peso del padre e della madre, titolo di studio e professione del padre e della madre, e parentela dei genitori)
- informazioni riguardo l'ampiezza della famiglia (numero dei figli compreso l'esaminando, numero dei maschi, numero delle femmine, ordine di genitura dell'esaminando)
- eventuali annotazioni relative a dismorfologie e patologie dell'esaminando.

Nella seconda parte della scheda è riportata la parte riguardante le misure antropometriche rilevate su ogni individuo campionato.

CLASSIFICAZIONE DELLO STATO SOCIO-ECONOMICO

Per una completa valutazione dello stato socio-economico e demografico, oltre alle informazioni sull'età paterna e materna, al numero di figli, ed all'ordine di genitura, sono state prese in considerazione anche la professione paterna e il titolo di studio materno.

La determinazione del livello socioeconomico è stata effettuata seguendo la classificazione "*Social Class based on Occupation*" maggiormente in uso nei paesi anglosassoni (Mascie-Taylor e Boldsen, 1985; Sanna e Danubio, 2009).

Il titolo di studio materno è stato suddiviso in cinque classi ordinali in base al grado di istruzione acquisito (Ersoy et al., 2005); in cui la prima è quella dei laureati, e l'ultima quella degli aventi conseguito la sola licenza elementare o meno.

MISURE ANTROPOMETRICHE E VARIABILI DERIVATE

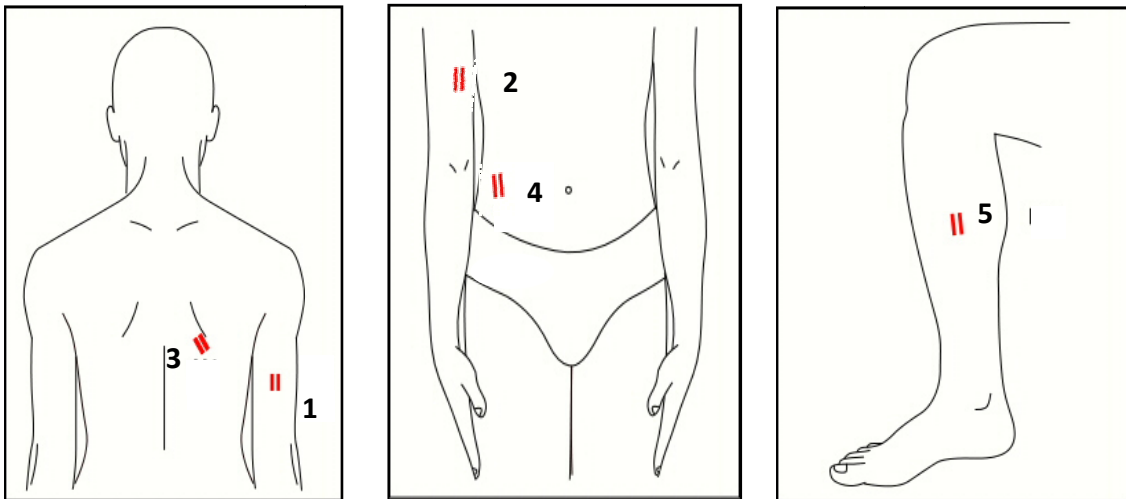
Per il rilevamento delle misure antropometriche sono state utilizzate le indicazioni di Martin e Saller (1957) adoperando gli strumenti classici impiegati in antropometria:

- **Peso:** rilevato in chilogrammi con la bilancia pesa-persone a molla nelle ore antimeridiane, con soggetto svestito e comunque sottraendo al valore misurato il peso stimato degli indumenti intimi indossati.
- **Statura totale:** distanza dal *vertex* al suolo (*vertex* è il punto più alto del cranio lungo la curva sagittale mediana), con l'individuo in posizione eretta di attenti militare, ovvero braccia lungo il corpo e palme delle mani rivolte all'interno con le dita distese e la testa orientata secondo il *piano di Francoforte* [piano passante per i *traghion* (ossia il punto situato all'incrocio delle tangenti condotte lungo i margini anteriore e superiore del meato acustico superiore) e per il margine inferiore dell'orbita], si misura con l'antropometro ad asta.
- **Statura da seduto:** altezza del busto con l'individuo seduto su un piano di appoggio, le braccia in pronazione e la testa nella stessa posizione tenuta per la statura totale, misurata con l'antropometro ad asta;
- **LCAI** (Lunghezza convenzionale dell'arto inferiore): differenza tra la statura e la statura da seduto;
- **Perimetro toracico:** misurato con il nastro metrico al punto meso-sternale con il soggetto in piedi in fase di espirazione.
- **Perimetro addominale minimo:** misurato con il nastro metrico, è il perimetro minimo dell'addome rilevato al di sopra dei fianchi (la cosiddetta "vita").
- **Perimetro glutei:** misurato con il nastro metrico, nel punto massimo di estensione dei glutei.
- **Perimetro polpaccio:** misurato con il nastro metrico, a livello del massimo rilievo del polpaccio, rilevato con il soggetto seduto poggiante il piede a terra.

- **Perimetro braccio (o perimetro brachiale):** si rileva con il nastro metrico con l'arto rilassato disteso lungo il corpo, nella parte superiore del braccio al livello del V deltoideo.
- **Perimetro polso:** si rileva con il nastro metrico, nella parte più bassa dell'avambraccio sotto il processo stiloideo.
- **Plica bicipitale:** è stata misurata verticalmente, sulla superficie anteriore del braccio, in corrispondenza della protuberanza del muscolo bicipite, su una linea verticale tracciata tra il bordo anteriore dell'acromion ed il centro della fossa antecubitale. La misura è stata effettuata con soggetto in posizione eretta ed il braccio rilassato.
- **Plica tricipitale:** è stata misurata sulla superficie posteriore del braccio disteso e rilassato, sopra il muscolo tricipite, in corrispondenza del punto medio di una linea tracciata tra il processo acromiale della scapola ed il margine inferiore del processo olecranico dell'ulna. La misura è stata effettuata con soggetto in posizione eretta.
- **Plica sottoscapolare:** è stata rilevata con il soggetto in posizione eretta e braccia rilassate ai lati del corpo. Essa è stata sollevata sulle linee di Langer secondo una diagonale, ad inclinazione infero-laterale e formante un angolo di circa 45° con il piano orizzontale. Il sito di misurazione è situato appena sotto l'angolo inferiore della scapola.
- **Plica soprailiaca:** è stata rilevata con il soggetto in posizione eretta e braccia rilassate lungo il corpo. Essa è stata sollevata appena posteriormente rispetto alla linea medio-ascellare, seguendo le linee di Langer, e inclinata infero-medialmente di 45° rispetto al piano orizzontale. Il sito di misurazione è situato lungo la linea medio-ascellare appena sopra la cresta iliaca.

- **Plica del polpaccio:** è stata rilevata con il soggetto seduto ed il ginocchio flesso a 90°. Il punto di misurazione è nel lato mediale della gamba e si rileva verticalmente.
- **Somma delle pliche totali:** somma della plica bicipitale, tricipitale, del polpaccio, sottoscapolare e soprailiaca.

- *Punti di reperi per la corretta misurazione delle pliche cutanee: 1. Plica Tricipitale; 2. Plica Bicipitale; 3. Plica Sottoscapolare; 4. Plica Soprailiaca; 5. Plica Polpaccio*



- **Rapporto minimo mesogastrico (Waist-hip ratio):** dato dal rapporto percentuale tra il perimetro addominale e il perimetro dei glutei. È l'indice atto alla determinazione della distribuzione adiposa centrale del grasso corporeo, è facilmente ottenibile, riproducibile e largamente utilizzato per classificare l'obesità in: ginoide, intermedia e androide. Viene utilizzato per prevenire il rischio di malattie correlate all'obesità, in quanto queste sono causate da adiposità addominale (Liu et al., 2011).

- **TUA** (Total Upper Arm Area, area totale del braccio): ottenuta con la seguente formula:

$$TUA = [C^2 / (4 * \pi)]$$

Dove: C è la circonferenza del braccio destro.

- **UMA** (Upper Arm Muscole Area, area muscolare del braccio): ottenuta con la seguente formula:

$$UMA = \{ [C - (Ts * \pi)]^2 / (4 * \pi) \}$$

Dove : C è la circonferenza del braccio destro; Ts è la plica tricipitale destra.

- **UFA** (Upper Fat Arm Area, area adiposa del braccio): ottenuta con la seguente formula:

$$UFA = (TUA - UMA)$$

Dove : TUA (Total Upper Arm Area, area totale del braccio);

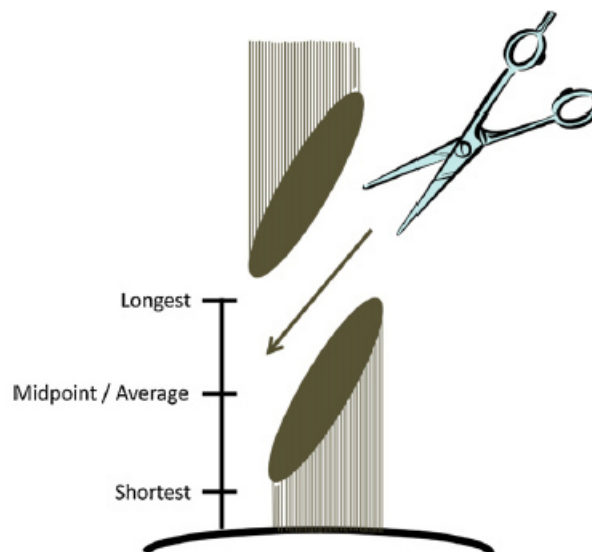
UMA (Upper Arm Muscole Area, area muscolare del braccio).

- **Indice di Massa Corporea (BMI):** è considerato un indice di riferimento a livello mondiale, utilizzato nella maggior parte degli studi relativi la trattazione delle problematiche ponderali, in quanto viene considerato un valido, immediato e poco costoso strumento per la misurazione indiretta dei diversi livelli di adiposità nei bambini, negli adolescenti e negli adulti (Cole et al., 2007). Ottenuto con la formula: $BMI = \text{Peso}(\text{kg})/\text{Statura}(\text{m}^2)$

METODOLOGIA PER LA RACCOLTA E L'ANALISI DEI METALLI PESANTI

Per la determinazione dei livelli dei metalli pesanti, da ogni individuo è stata raccolta una ciocca di capelli, per un peso totale del campione prelevato pari a circa 0,5-0,25 g. Il taglio è stato eseguito nella regione occipitale (nuca) come consigliato da Chatt e Katz (1988). In base a quanto raccomandato dall'Hair Analysis Standards Board e dall'International Atomic Energy Agency, si è proceduto a prelevare la ciocca vicino al cuoio capelluto e quindi i primi 5 - 2,5 cm di crescita recente. Ogni campione prelevato è stato conservato in bustine di plastica accuratamente sigillate, etichettate con un numero progressivo, data di nascita, sesso e Comune di residenza dell'individuo esaminato.

– Modalità di taglio per la raccolta dei capelli (LeBeau et al., 2011).



Una volta in laboratorio, per ogni singolo campione di capelli è stata adottata la metodica di pretrattamento consigliata dall'Istituto Superiore di Sanità (Senofonte et al., 1989; Caroli et al., 1992; Sanna et al., 2003, 2005, 2008, 2011).

Il primo passaggio prevede un primo lavaggio del campione con una miscela di etere etilico e acetone in rapporto 3:1, effettuato in movimento costante per 10 minuti. Successivamente il campione, previa asciugatura a 85°C per 1 h, è stato trattato per 1 h con una soluzione acquosa di EDTA diluito al 5%. Infine, dopo un lavaggio con acqua bidistillata ed asciugatura per 24 h a 105°C, è stato determinato il peso a secco del campione.

Dopo il pretrattamento di decontaminazione superficiale del capello, la procedura analitica prevede una fase di solubilizzazione chimica. Per questa fase è stata seguita la procedura di Senofonte et al. (1989), Caroli et al. (1992) e Sanna et al. (2003): dopo una predigestione di 1h con HNO₃ concentrato in un riscaldatore a microonde ad una potenza di circa 180 W, previa asciugatura per 1h e addizione di 1ml di H₂O₂, il campione è stato digerito per 1h ad una potenza di 300 W circa.

La determinazione strumentale è stata effettuata utilizzando uno spettrofotometro di massa accoppiato a plasma induttivo (ICP-MS).

La determinazione dei livelli dei metalli pesanti è avvenuta presso i laboratori del Dipartimento di Scienze della Terra e del Mare dell'Università degli Studi di Palermo.

TECNICA DI SPETTROMETRIA DI MASSA ACCOPPIATA AL PLASMA INDUTTIVO

(ICP-MS)

L'ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry) è una tecnica che interfaccia una sorgente a plasma accoppiato induttivamente con uno spettrometro di massa. In questo strumento gli ioni, prodotti in una torcia ICP convenzionale, sono introdotti in uno spettrometro di massa a quadrupolo che li separa in virtù del diverso rapporto massa/carica. Gli ioni di ogni specifico rapporto massa/carica sono quindi rivelati e quantificati da un detector. Gli spettri così generati sono costituiti da una serie di picchi isotopici che possono essere impiegati sia per misure qualitative sia per misure quantitative.

La tecnica dell'ICP-MS nasce negli anni '80 specificatamente per lo studio delle terre rare (lantanidi). Ad oggi rappresenta una tecnica che offre una serie di vantaggi indiscutibili nell'analisi multielementare di elementi in traccia ed ultratraccia. La sua versatilità consente lo studio di svariate tipologie di matrici e ne permette l'utilizzo in numerose discipline e campi d'applicazione (scienze ambientali, geologia, idrologia, biologia, chimica, scienze dei materiali, archeologia, agricoltura, scienze dell'alimentazione, medicina, farmacologia, etc.).

La caratteristica peculiare dell'ICP-MS è la possibilità di analizzare in modo accurato e preciso, con un limitato consumo di campione, gran parte degli elementi della tavola periodica, raggiungendo limiti di detezione compresi tra le ppt e le ppm.

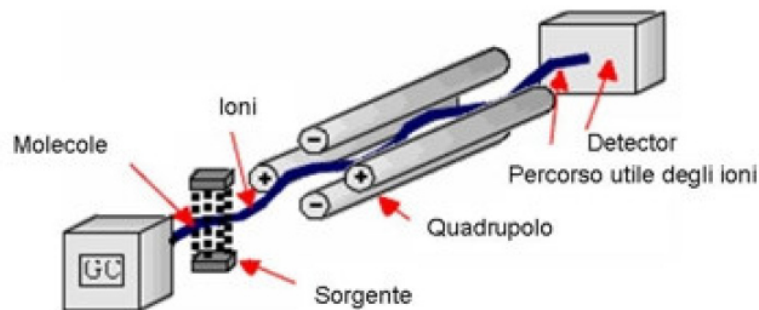
La sensibilità di questa tecnica permette di raggiungere limiti di detezione inferiori a quelli ottenuti con altre tecniche (es. ICP-OES, AAS, etc.), quanto meno equiparabili o migliori di quelli tipici della GFAA (Graphite Furnace Atomic Absorption) che è comunque una tecnica maggiormente votata all'analisi monolementare.

Un altro vantaggio della tecnica dell'ICP-MS, che ne rafforza potenzialità e versatilità, è la possibilità di accoppiare l'ICP-MS stesso ad altre tecniche strumentali quali l'HPLC, e a vari sistemi d'introduzione e manipolazione del campione (es. Laser Ablation, generazione di idruri, etc.).

Inoltre l'ICP-MS consente la determinazione dei rapporti isotopici e l'analisi di diluizione isotopica.

Lo strumento è completamente controllato da un computer che, oltre a gestire le procedure di messa a punto strumentale e di analisi, controlla i sistemi di sicurezza che impediscono il verificarsi di eventi dannosi per lo strumento stesso (Van de Wiel H.J., 2003).

– Principali componenti dello spettrometro di massa



METODOLOGIA PER LA RACCOLTA E L'ANALISI DEI POLIMORFISMI GENETICI

La raccolta dei campioni salivari è stata eseguita mediante specifici tamponi buccali facenti parte di Kit propri per l'estrazione del DNA. A tutti i soggetti è stato richiesto di non mangiare, bere o masticare chewing-gum nei 30 minuti precedenti il prelievo del campione di saliva.

L'estrazione del DNA dal tampone buccale è avvenuta utilizzando la metodica del salting out. Questa metodica è molto simile a quella dell'estrazione fenolo-cloroformio ma, a differenza di questa, non prevede passaggi in fenolo ma la separazione fra DNA e proteine avviene per "salatura" della soluzione mediante l'aggiunta di una soluzione satura di cloruro o acetato di sodio (Caramelli, 2009).

Per la genotipizzazione dei polimorfismi si è utilizzata una reazione enzimatica di amplificazione del DNA, conosciuta come Polymerase Chain Reaction (PCR), che consente di amplificare in vitro una specifica regione della molecola, copiandola in varie fasi successive, fino ad ottenerne milioni di copie.

Il passaggio successivo prevede la digestione dei prodotti ottenuti mediante l'utilizzo di enzimi di restrizione specifici per ogni singolo polimorfismo genetico oggetto di studio. Terminata la digestione i frammenti di DNA sono stati testati mediante l'elettroforesi su gel di agarosio al 2%.

L'analisi delle mutazione è stata effettuata mediante analisi comparativa tra le sequenze ottenute per il campione in esame e le sequenze normali dei geni investigati, depositate nel database internazionale GeneBank.

La determinazione dei polimorfismi genetici è avvenuta presso il laboratorio di Antropologia Molecolare dell'Università degli Studi di Cagliari.

– SNPs analizzati e relativi primers utilizzati per l'amplificazione

SNPs	PRIMERS	Amplificato
BSM	for 5'-CAACCAAGACTAACAAGTACCGCGTCAGTGA-3'	825 bp
	rev 5'-AACCAGCGGAAGAGGTCAAGGG-3'	
APA (Taq I)	for 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3'	744 bp
	rev 5'-CAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'	
APA (Apa I)	for 5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAAG-3'	740 bp
	rev 5'-CAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'	
Fok I	for 5'-GATGCCAGCTGGCCCTGGCACTG-3'	272 bp
	rev 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCCCTC-3'	
ALA-D (Aci I)	for 5'-AGACAGACATTAGCTCAGTA-3'	917 bp
	rev 5'-GGCAAAGACCACGTCCATTC-3'	
ALA-D (Rsa I)	for 5'-AGACAGACATTAGCTCAGTA-3'	917 bp
	rev 5'-GGCAAAGACCACGTCCATTC-3'	
C677T	for 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'	198 bp
	rev 5'-AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'	
DNMT3B (Rs2424913)	for 5'-GGGAATTGTCGGGCATCCTA-3'	371 bp
	rev 5'-CATCTGGGGAACCAACCCTG-3'	
DNMT1 (Rs2228611)	for 5'-GGTGCTCCTCAGTCATCACA-3'	446 bp
	rev 5'-GTCACCTGTGTCCCATCGAC-3'	

- Protocollo di amplificazione. Le quantità sono espresse in μ l.

SNPs	Buffer	MgCl ₂	dNTP _s	P1	P2	H ₂ O	Taq	DNA	TOT
BSM	2	1	1	0,1	0,1	14,7	0,1	1	20
APA (Taq I)	2	0,8	1	0,2	0,2	13,7	0,1	2	20
APA (Apa I)	2	0,8	1	0,2	0,2	13,7	0,1	2	20
Fok I	2,5	0,8	1	0,2	0,2	14,2	0,1	2	20
ALA-D (Aci I)	2,5	1	1	0,5	0,5	18,4	0,1	1	25
ALA-D (Rsa I)	2,5	1	1	0,5	0,5	18,4	0,1	1	25
C677T	2,5	1	1	0,5	0,5	18,4	0,1	1	25
DNMT3B (Rs2424913)	2,5	1	1	0,5	0,5	18,4	0,1	1	25
DNMT1 (Rs2228611)	2	0,8	1	0,2	0,2	14,7	0,1	1	20

– Concentrazioni reagenti utilizzati per l'amplificazione

Reagenti	Concentrazioni Reagenti
Buffer	1X*
MgCl ₂	1,5 mM
dNTPs	0,2 mM
Primer for	0,5 μM
Primer rev	0,5 μM
Taq	1 U

* mM Tris-HCl₂, pH 8,0, 50 mM KCl

- Protocollo di digestione. Le quantità sono espresse in μl.

SNPs	Amplificato	Buffer	Quantità Enzima	H ₂ O	TOT	Enzima	Tipo di taglio
BSM	5	1	0,05	3,95	10	Bsm I	selvatico
APA (Taq I)						Taq I	mutato
APA (Apa I)						Apa I	selvatico
Fok I						Fok I	selvatico
ALA-D (Aci I)						Aci I	selvatico
ALA-D (Rsa I)						Rsa I	mutato
C677T						Hinf I	mutato
DNMT3B (Rs2424913)						Avr II	mutato
DNMT1 (Rs2228611)						Bcc I	mutato

ANALISI STATISTICA

Per ciascun gruppo di individui campionati, suddivisi per sesso e Comune di appartenenza, sono state calcolate le statistiche descrittive: media e deviazione standard, relative alle variabili socioeconomiche e del nucleo familiare, antropometriche, ed alle concentrazione di metalli pesanti.

Il test di Shapiro-Wilks è stato applicato per valutare se tutte le variabili esaminate presentassero una distribuzione normale sia nel campione complessivo, sia suddiviso per sesso e Comune. Essendo risultati non normalmente distribuiti, in modo statisticamente significativo, i valori delle pliche e delle concentrazioni di PbH e CdH i relativi valori sono stati log- trasformati (Affifi e Clark, 1984).

Previa constatazione del rispetto degli assunti, il confronto tra i gruppi, per ciascuna variabile, è stato effettuato utilizzando l'analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA) con i valori delle pliche e dei metalli log-trasformati. Da notare che i valori della F ottenuti dall'analisi della varianza ad una via sono in relazione quadratica con i valori della t del test di Student.

Per stimare la relazione esistente tra le variabili inserite nei modelli di regressione sono stati calcolati i relativi coefficienti di correlazione lineare semplice di Bravais-Pearson.

Per valutare la relazione tra variabili indipendenti e dipendenti, è stato utilizzato la regressione multivariata in modalità ridge, inoltre sono stati calcolati i relativi coefficienti di correlazione parziale e semiparziale.

Da notare che questi coefficienti non includono il concetto di causa-effetto, ma solo quello di rapporto tra variabili (Freund and Wilson, 1997).

Previa constatazione del rispetto degli assunti, per valutare le relazioni tra variabili dipendenti ed indipendenti è stata utilizzata la regressione multipla in modalità ridge, in quanto tale metodologia statistica permette di annullare o ridurre l'effetto della multicollinearità ((Jacob et al., 2000; Sanna and Vallasca, 2011).

Inoltre, per evitare effetti confondenti tra la relazione all'esposizione dei metalli pesanti esaminati e l'accrescimento sono stati creati tre differenti modelli:

Modello 1) le variabili dipendenti (statura, statura da seduto, LCAI) sono state poste in relazione sia alla statura dei genitori, alla batteria delle variabili dello stato socio-economico ed anagrafico, alle variabili proxy dello stato nutrizionale (TUA, UMA, UFA, W/H e $\log \Sigma 5$ pliche) sia ai livelli log-trasformati di CdH e PbH.

Modello 2) le variabili dipendenti (statura, statura da seduto, LCAI) sono state poste in relazione sia alla statura dei genitori, alla batteria delle variabili dello stato socio-economico anagrafico, alle variabili proxy dello stato nutrizionale (TUA, UMA, UFA, W/H e $\log \Sigma 5$ pliche) sia ai livelli log-trasformati di CdH. Dunque dal Modello 1 è stato rimosso il PbH per valutare il singolo effetto del CdH.

Modello 3) in cui le variabili dipendenti (statura, statura da seduto, LCAI) sono state poste in relazione sia alla statura dei genitori, alla batteria delle variabili dello stato socio-economico anagrafico, alle variabili proxy dello stato nutrizionale (TUA, UMA, UFA, W/H e $\log \Sigma 5$ pliche) sia ai livelli log-trasformati di PbH. Pertanto dal Modello 1 è stato rimosso il CdH per valutare il singolo effetto del PbH.

La decisione di proporre tre modelli di regressione in cui venga eliminato ad hoc dal modello complessivo (Modello 1) rispettivamente il CdH (Modello 2) e il PbH (Modello 3) è stata adottata per valutare nell'ambito del modello complessivo le relative singole influenze sull'accrescimento (Freund and Wilson, 1997).

Al fine di individuare quali fattori possano influenzare i livelli dei CdH e PbH è stata utilizzata la regressione multipla in modalità ridge ponendo le variabili indipendenti (concentrazioni log-trasformate di CdH e PbH) in relazione con le variabili socio- economico ed anagrafiche, le variabili dello stato nutrizionale (TUA, UMA, UFA, W/H e $\log\Sigma$ -pliche) ed i polimorfismi relativi ai biomarker di suscettibilità.

Le frequenze alleliche e aplotipiche dei differenti polimorfismi analizzati sono state calcolate con la conta gene/aplotipo, e la distribuzione dei polimorfismi è stata valutata per l'equilibrio di Hardy Weinberg con il test del chi quadro.

Il linkage disequilibrium (LD) è stato calcolato per determinare la possibile associazione non casuale di alleli in polimorfismi adiacenti tra loro (Wall e Pritchard, 2003).

Per quantificare le influenze combinate dei diversi polimorfismi in relazione alla suscettibilità individuale all'assorbimento di Pb e Cd è stato utilizzato Il Total Genotype Score (TGS). In specifico, ad ogni genotipo del singolo polimorfismo è stato assegnato un punteggio basato sulla sua associazione con un fenotipo sfavorevole (Massidda et al, 2014): al genotipo omozigote sfavorevole viene assegnato un punteggio pari a 2, al genotipo eterozigote un punteggio pari a 1 ed al restante genotipo omozigote un punteggio pari a 0. Il punteggio totale ottenuto viene percentualizzato. Un TGS pari a 0 rappresenta un profilo "ideale" di poligenia indicante un basso rischio, mentre un TGS pari a 100 rappresenta il peggiore profilo poligenico associabile con rischio elevato.

– Valori assegnati ad ogni singolo genotipo per il calcolo del Total Genotype Score

SNPs	Genotipo		
	BSM	BB	Bb
0		1	2
APA (Taq I)	TT	Tt	Tt
	0	1	2
APA (Apa I)	AA	Aa	Aa
	2	1	0
Fok I	FF	Ff	Ff
	0	1	2
ALA-D (Aci I)	1-1	1-2	2-2
	0	1	2
ALA-D (Rsa I)	TT	TC	CC
	2	1	0
C667T	CC	CT	TT
	0	1	2

RISULTATI

Nelle Tabelle 1 – 4 sono riportate le statistiche descrittive, media e deviazione standard, relative alle variabili socioeconomiche, antropometriche, nutrizionali e delle concentrazioni di metalli pesanti, sia nel campione totale, sia suddiviso per sesso o per Comune.

Nello specifico:

- nella Tabella 1 vengono riportate le statistiche descrittive relative alle variabili anagrafiche (età, età padre e madre alla nascita dell'individuo), socioeconomiche (professione paterna e titolo di studio materno) e del nucleo familiare (numero di fratria e ordine di genitura) dei campioni di bambini, suddivisi per sesso, di Sant'Antioco ed Iglesias. Non sono presenti delle differenze, statisticamente significative, per nessuna delle variabile esaminate, sia considerando il campione totale, sia suddiviso per sesso o per Comune;

- nella Tabella 2 sono riportate le statistiche descrittive delle variabili antropometriche (peso, statura, statura da seduto, lunghezza convenzionale dell'arto inferiore, perimetro addominale, perimetro glutei, perimetro polpaccio, perimetro braccio, perimetro polso, diametro biepicondiloideo omerale, circonferenza cefalica). Da notare come i valori maggiori per la statura, la statura da seduto e la lunghezza dell'arto inferiore si registrino nel Comune di Sant'Antioco, in particolare:

- per la statura (valore medio dell'intero campione 150,50 cm nei maschi e 148,95 cm per le femmine), il valore maggiore si riscontra nei maschi campionati a Sant'Antioco con 154,27 cm, ben 8,33 cm in più rispetto ai coevi campionati ad Iglesias. Per le femmine, anch'esse presentanti valori maggiori nel Comune di Sant'Antioco, è stata riscontrata una differenza tra le medie di 3,59 cm.

- I valori maggiori per la statura da seduto (valore medio dell'intero campione 77,31 cm nei maschi e 77,70 cm per le femmine) sono stati rilevati tra i maschi del Comune di Sant'Antioco con 79,12 cm, mentre quelli inferiori sono stati riscontrati nei maschi del Comune di Iglesias con 75,09 cm. Per quanto riguarda le femmine, la differenza tra la statura da seduto è di 1,82 cm, con il campione di Sant'Antioco, 78,67 cm, presentante valori maggiori rispetto a quello di Iglesias, 76,56 cm.

- per la lunghezza dell'arto inferiore (valore medio dell'intero campione 73,20 cm nei maschi e 71,25 cm per le femmine) i valori maggiori sono stati riscontrati nel Comune di Sant'Antioco per entrambi i sessi; per i maschi la differenza rilevata è di 4,34 cm, mentre per le femmine è di 1,77 cm.

Inoltre, anche per quanto concerne il peso, i valori maggiori sono stati riscontrati nel Comune di Sant'Antioco (con un peso, nel campione a sessi uniti superiore di 2,35 kg). I valori superiori si registrano tra i maschi del Comune di Sant'Antioco, con 45,27 kg, mentre i maschi del Comune di Iglesias presentano il valore inferiore, 41,67 kg. Le restanti variabili presenti in tabella, non presentano differenze significative tra i due campioni esaminati.

- nella Tabella 3 sono riportate le statistiche descrittive delle variabili antropometriche proxy dello stato nutrizionale (plica bicipitale, plica tricipitale, plica sottoscapolare, plica soprailiaca, plica polpaccio, Σ 5 Pliche, BMI, TUA, UMA, UFA, waist-hip ratio). I valori maggiori per la plica bicipitale e tricipitale (10,24 mm e 18,03 mm) sono stati rilevati tra le femmine del Comune di Sant'Antioco, mentre per la plica sottoscapolare, soprailiaca e del polpaccio i valori più elevati vengono mostrati dalle femmine del Comune di Iglesias, rispettivamente 14,20 mm, 17,17 mm e 15,97 mm. Confrontando i valori della Σ 5 Pliche, il valore superiore è stato riscontrato tra le femmine del Comune di Iglesias con 73,02 mm, mentre il valore minore è quello dei maschi del Comune di Sant'Antioco, 60,83 mm. I valori di BMI sono risultati essere superiori, seppur di poco,

tra i maschi e le femmine del Comune di Iglesias (19,73 per i maschi e 19,37 per le femmine) rispetto ai coevi dello stesso sesso del Comune di Sant'Antioco, rispettivamente 18,91 per i maschi e 19,16 per le femmine. Non si rilevano delle differenze significative per quanto concerne i valori di TUA, UMA, UFA e waist-hip ratio, quest'ultimo presentante un valore identico, 0,83, sia per i maschi sia per le femmine del Comune di Iglesias.

- nella Tabella 4 e nelle Figure 1- 2 sono riportate la media e la deviazione standard dei livelli di Pb e Cd (PbH e CdH) rilevate nei capelli dei bambini esaminati nei due Comuni oggetto di indagine. Nel Comune di Sant'Antioco, sia i maschi sia le femmine, presentano le stesse concentrazioni di cadmio pari a 0,009 µg/g, valore nettamente inferiore rispetto allo 0,134 µg/g riscontrato nei maschi ed allo 0,342 µg/g nelle femmine del Comune di Iglesias. Anche per quanto riguarda il piombo, i valori inferiori sono stati riscontrati nel Comune di Sant'Antioco, rispettivamente 0,478 µg/g per i maschi e 0,437 µg/g per le femmine, mentre le concentrazioni maggiori sono state rilevate nel campione maschile del Comune di Iglesias, 2,380 µg/g (1,965 µg/g nelle femmine).

- nella Tabella 5 sono riportate le frequenze dei genotipi, suddivisi per Comune, dei diversi polimorfismi esaminati nei campione dei bambini. Rispettivamente nel campione totale: BSM I, BB 25,00%, Bb 58,93%, bb 16,07%; APA (TAQ I), TT 34,45%, Tt 49,58%, tt 15,97%; APA (APA I), AA 33,33%, Aa 51,22%, aa 15,45%; FOK I, FF 37,32%, Ff 52,11%, ff 10,56%; ALAD (ACI I), 1-1 78,17%, 1-2 20,42%, 2-2 1,41%; ALAD (RSA I), TT 36,17%, TC 45,39%, CC 18,44%; C667T, CC 35,71%, CT 53,57%, TT 10,71%; DNMT3B (rs2424913) SS 52,08%, SM 34,72%, MM 13,19%; DNMT1 (rs2228611), AA 30,94%, GA 44,60%, GG 24,46%;

- i valori del test di Hardy-Weinberg sono riportati nella Tabella 6.

- la Tabella 7 riporta i risultati dell'analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA) avente come variabile dipendente il Comune di appartenenza degli individui campionati. Dai valori delle F di ANOVA si evince che esista una differenza statisticamente significativa tra i Comuni, considerando il campione a sessi uniti, con $p < 0,001$ per la statura ($F=20,520$), la statura da seduto ($F=18,698$), la lunghezza convenzionale dell'arto inferiore ($F=13,115$) e per i livelli log-trasformati di CdH ($F=333,888$) e PbH ($F=101,468$);

- nella Tabella 8 sono riportati i valori dei coefficienti di correlazione semplice di Bravais-Pearson tra le variabili presenti nelle regressioni. Da notare come l'età presenti una correlazione positiva, statisticamente significativa, con la statura, la statura da seduto e la lunghezza dell'arto inferiore (rispettivamente $r = 0,42$; $0,44$ e $0,31$).

La statura dei genitori, proxy della componente genetica per la determinazione della statura individuale, è risultata essere correlata positivamente, in modo statisticamente significativo, con la statura, la statura da seduto e la LCAI dei bambini campionati (rispettivamente $r = 0,33$; $0,19$ e $0,39$). In ultimo, tra le osservazioni interessanti desumibili dalla tabella, si segnala che il PbH e il CdH sono risultati significativamente correlati in modo positivo tra loro ($r = 0,76$) ed entrambi negativamente con la statura, la statura da seduto e la lunghezza dell'arto inferiore (rispettivamente PbH: $r = - 0,26$, $- 0,23$, $- 0,24$; CdH: $r = - 0,29$, $- 0,25$, $- 0,26$)

Nelle Tabelle 9 - 17 sono riportati i sommari dei diversi modelli delle regressioni lineari multivariate in modalità ridge. Modelli proposti al fine di valutare gli effetti sub-clinici sull'accrescimento del cadmio e del piombo, aventi come variabili dipendenti: statura (Tab 9 - 11), statura da seduto (Tab. 12 - 14), LCAI (Tab. 15 - 17), e come variabili indipendenti: sesso, età decimale degli individui campionati, l'età decimale alla nascita del padre e della madre, statura dei genitori, numero di fratria, ordine di genitura, stato socio-economico, TUA (area totale del braccio), UMA (area muscolare del braccio), UFA (area grassa del braccio), valori di waist-hip ratio, la sommatoria delle

5 pliche log trasformato e le concentrazioni di PbH e CdH anch'esse trasformate logaritmicamente.

Nello specifico:

- nella Tabella 9 viene riportato il sommario (Modello 1) della regressione lineare multivariata in modalità ridge, avente la statura come variabile dipendente; in questo modello risulta esistere una relazione positiva, statisticamente significativa, ($p < 0,001$) sia con l'età ($\beta = 0,3951$, $r_p = 0,4474$) sia con la statura dei genitori ($\beta = 0,3514$, $r_p = 0,4141$) e una relazione negativa statisticamente significativa ($p < 0,05$) con il CdH ($\beta = -0,2259$, $r_p = -0,1983$);
- nella Tabella 10 è riportato il sommario (Modello 2) della regressione lineare multivariata in modalità ridge, avente la statura come variabile dipendente; in questo modello, da cui dal precedente è stato rimosso la variabile indipendente PbH, si rileva nuovamente una relazione positiva, statisticamente significativa ($p < 0,001$), sia con l'età ($\beta = 0,3965$, $r_p = 0,4559$) sia con la statura dei genitori ($\beta = 0,3508$, $r_p = 0,4150$) e una relazione negativa statisticamente significativa ($p < 0,01$) con il CdH ($\beta = -0,2326$, $r_p = -0,2276$);
- nella Tabella 11 è riportato il sommario (Modello 3) della regressione lineare multivariata in modalità ridge, avente la statura come variabile dipendente in questo modello, da cui dal precedente è stato rimosso la variabile indipendente CdH, si ottiene sempre una relazione positiva, statisticamente significativa, ($p < 0,001$) sia con l'età ($\beta = 0,3786$, $r_p = 0,4271$) sia con la statura dei genitori ($\beta = 0,3707$, $r_p = 0,4283$) e una relazione negativa statisticamente significativa ($p < 0,05$) con il PbH ($\beta = -0,1675$, $r_p = -0,2024$);

- nella Tabella 12 viene riportato il sommario (Modello 1) della regressione lineare multivariata in modalità ridge, avente la statura da seduto come variabile dipendente; in questo modello risulta esistere una relazione positiva, statisticamente significativa, sia con l'età ($\beta = 0,4145$, $r_p = 0,4516$, $p < 0,001$) sia con la statura dei genitori ($\beta = 0,2247$, $r_p = 0,2701$, $p < 0,01$) e una relazione negativa statisticamente significativa ($p < 0,05$) con il CdH ($\beta = -0,2155$, $r_p = -0,1830$);

- nella Tabella 13 invece, è riportato il sommario (Modello 2) della regressione lineare multivariata in modalità ridge, avente la statura da seduto come variabile dipendente; In questo modello, da cui dal precedente è stato rimosso la variabile indipendente PbH, risulta esistere una relazione positiva, statisticamente significativa, sia con l'età ($\beta = 0,4074$, $r_p = 0,4524$, $p < 0,001$) sia con la statura dei genitori ($\beta = 0,2279$, $r_p = 0,2746$, $p < 0,01$) e una relazione negativa statisticamente significativa ($p < 0,05$) con il CdH ($\beta = -0,1804$, $r_p = -0,2133$);

- nella Tabella 14 è riportato il sommario (Modello 3) della regressione lineare multivariata in modalità ridge, avente la statura come variabile dipendente; In quest'ultimo modello da cui dal precedente è stato rimosso la variabile indipendente CdH, si ottiene una relazione positiva, statisticamente significativa ($p < 0,001$), con l'età ($\beta = 0,3987$, $r_p = 0,4336$) e con la statura dei genitori ($\beta = 0,2431$, $r_p = 0,2879$), mentre non risulta esserci nessuna relazione statisticamente significativa con il PbH;

- nella Tabella 15 viene riportato il sommario (Modello 1) della regressione lineare multivariata in modalità ridge avente la lunghezza convenzionale dell'arto inferiore come variabile dipendente; in questo modello risulta esistere una relazione positiva, statisticamente significativa ($p < 0,001$), sia con l'età ($\beta = 0,2929$, $r_p = 0,3308$) sia con la statura dei genitori ($\beta = 0,3840$, $r_p = 0,4252$) e una relazione negativa statisticamente significativa ($p < 0,05$) con il CdH ($\beta = -0,1859$, $r_p = -0,1554$);

- nella Tabella 16 è riportato il sommario (Modello 2) della regressione lineare multivariata in modalità ridge avente la statura come variabile dipendente; in questo modello, da cui dal precedente è stato rimosso la variabile indipendente PbH, si ottiene sempre una relazione positiva statisticamente significativa ($p < 0,001$), sia con l'età ($\beta = 0,3012$, $r_p = 0,3448$) sia con la statura dei genitori ($\beta = 0,3802$, $r_p = 0,4228$) e una relazione negativa statisticamente significativa ($p < 0,01$) con il CdH ($\beta = -0,2269$, $r_p = -0,2597$);

- nella Tabella 17 è riportato il sommario (Modello 3) della regressione lineare multivariata in modalità ridge avente la statura come variabile dipendente; in questo modello, da cui dal precedente è stato rimosso la variabile indipendente CdH, si ottiene sempre una relazione positiva statisticamente significativa ($p < 0,001$), sia con l'età ($\beta = 0,2793$, $r_p = 0,3150$) sia con la statura dei genitori ($\beta = 0,3999$, $r_p = 0,4378$) e una relazione negativa statisticamente significativa ($p < 0,05$) con il PbH ($\beta = -0,1884$, $r_p = -0,2162$).

Nelle Tabelle 18 e 19 sono riportati i sommari dei diversi modelli delle regressioni lineari multivariate. Modelli proposti al fine di valutare se i genotipi dei polimorfismi (SNPs), implicati nel metabolismo e nella toxicocinetica, potessero influire sui livelli di piombo e cadmio, riscontrati nei capelli dei bambini dei due Comuni esaminati.

Nello Specifico:

- nella Tabella 18 viene riportato il sommario della regressione lineare multivariata in modalità ridge, avente i livelli di piombo come variabile dipendente; in questo modello non risulta esistere una relazione ne positiva ne negativa con i polimorfismi esaminati (Bsm, Apa I, Taq I, Fok I e ALAD Aci I e Rsa I) e con i valori del Total Genotype Score.

- nella Tabella 19 viene riportato il sommario della regressione lineare multivariata, avente i livelli di cadmio come variabile dipendente; in questo modello non risulta esistere una relazione ne positiva ne negativa con i polimorfismi esaminati (DNMT1 e DNMT3B).

DISCUSSIONE

CONCENTRAZIONI DI PIOMBO E CADMIO

I livelli di Pb riscontrate nei capelli dei bambini del Comune di Iglesias presentano un valore medio di 2,16 $\mu\text{g/g}$, circa cinque volte superiori alle concentrazioni riscontrate nel Comune di Sant'Antioco: 0,45 $\mu\text{g/g}$. Livelli simili a quelle dei bambini di Iglesias sono state riscontrate da Sanna et al. (2008) nel 2002 nei capelli di bambini di età compresa tra gli 11 e i 14 anni dei Comuni di Carbonia e Gonnese (Sulcis-Iglesiente). Le relative concentrazioni riportate erano rispettivamente di 1,86 e 0,91 $\mu\text{g/g}$ nei maschi e 2,21 e 2,03 $\mu\text{g/g}$ nelle femmine. Sempre relativamente alla Sardegna, concentrazioni di Pb superiori sono state riscontrate da Vallasca et al. (2013), in un campionamento effettuato tra il 1998 e il 2007, in bambini di età compresa tra gli 11-15 anni, residenti in diversi Comuni della Sardegna a differente background ambientale, in cui i valori medi di Pb nei capelli riportati sono di 3,65 $\mu\text{g/g}$ nei maschi e 2,98 $\mu\text{g/g}$ nelle femmine.

La concentrazione media di piombo nei capelli nel Comune di Iglesias è risultata essere superiore sia a quella osservata in Sicilia nella città di Palermo: 0,78 $\mu\text{g/g}$ (Dongarrà et al, 2011), sia al valore mediano (0,88 $\mu\text{g/g}$) osservato da Wilhelm et al. (2002) in campionamento del 1996, in 245 bambini di età compresa tra 8-10 anni residenti nella zona industriale di Dusseldorf (Germania). Il valore del Comune di Iglesias è risultato essere di circa 4 volte superiore al valore medio (0,58 $\mu\text{g/g}$) riportato da Ferré-Huguet et al. (2009) in un campione di individui in accrescimento (10-15 anni) residenti nei pressi di un inceneritore di rifiuti solidi urbani e di un complesso petrolchimico, nella città di Tarragona (NE Spagna). Inoltre, è risultata essere superiore anche a quelle (1,26 $\mu\text{g/g}$) riportate da Menez-Filho et al. (2012), in un campione di bambini di età compresa tra 1-10 anni residenti nei pressi di un impianto metallurgico nella città di Salvador in Brasile.

Le concentrazioni di Pb riscontrate nei capelli dei bambini di Iglesias sono paragonabili a quelle dei residenti nei pressi della miniera di tungsteno di Panasqueira (Portogallo), una delle più grandi al mondo (Coelho et al., 2014). Tuttavia, i livelli di Pb a Iglesias sono risultati essere inferiori alla concentrazione media (8.67 $\mu\text{g/g}$) di PbH riscontrata in un campione di individui residenti in prossimità della miniera cinese di Fenghuang (Li et al., 2012).

Le concentrazioni medie di cadmio nel Comune di Iglesias (0,245 $\mu\text{g/g}$) sono risultate essere circa 30 volte superiori a quelli osservate a Sant'Antioco, e di circa 10 volte rispetto a quelle riscontrate nella città di Palermo (Dongarra et al., 2011). Tutti i campioni di capelli analizzati dai bambini che vivono ad Iglesias hanno mostrato una concentrazione di Cd più alta rispetto al valore medio osservato nei campioni dei bambini di Sant'Antioco. Il livello di CdH riscontrato ad Iglesias è superiore anche al valore mediano riportato da Chojnacka et al. (2010) per quanto riguarda un campione di giovani di 20 anni, che vivono in una regione urbana e industriale della Polonia; ai valori medi in due campioni in età prescolare (3-6 anni) riportati da Park et al. (2008) sia per la città di Seoul sia per la provincia rurale di Kyonggi (rispettivamente 0,09 $\mu\text{g/g}$ e 0,08 $\mu\text{g/g}$); e ai valori riportati da Kordas et al. (2010) in un campione di bambini in età (6-36 mesi) della città di Montevideo in Uruguay.

Il valore medio di 0,25 $\mu\text{g/g}$ riscontrato ad Iglesias è simile a quello (0,19 $\mu\text{g/g}$) rilevato nei capelli di individui che vivono ad Altamira (Brasile), una zona con elevato impatto ambientale per via delle attività di miniere d'oro (Carvalho et al., 2009); al valore medio (0,17 $\mu\text{g/g}$) osservato da Li et al. (2012) in persone che vivono nei pressi della miniera di poli-metallo di Fenghuang in Cina; e al valore medio riscontrato nei capelli dei bambini che vivono in prossimità di una miniera dismessa di pirite in Portogallo (Pereira et al., 2004).

I risultati ottenuti evidenziano come vi siano delle marcate differenze, statisticamente significative ($p < 0,0001$) nelle concentrazioni di Pb e Cd nei capelli di

bambini che vivono nei pressi del distretto minerario dell'Iglesiente, in confronto con i ragazzi e le ragazze della stessa età che vivono nel Comune di Sant'Antioco. Inoltre, dal confronto dei livelli di CdH e PbH del Comune di Iglesias con i dati riportati in letteratura, si rileva come essi presentino dei valori relativamente elevati ed in genere superiori, con l'eccezione dei valori di PbH riscontrati in un campionamento effettuato da Vallasca et al., (2013).

Non essendo risultati i valori di PbH e CdH, differenti in modo statisticamente significativo, tra i due sessi (ANOVA), il genere, considerando il campione nella sua totalità, non sembrerebbe essere un possibile fattore di rischio per l'esposizione al piombo e al cadmio, così come riportato anche da Menez-Filho et al. (2012). Tuttavia, considerando solo i bambini campionati del Comune di Iglesias, maggiormente esposti al Cd e Pb rispetto a quelli del Comune di Sant'Antioco, il genere è risultato essere, in modo statisticamente significativo, un fattore di rischio per l'esposizione, con le femmine presentanti livelli superiori rispetto ai coevi maschi, così come riportato anche in altri studi (Sanna et al., 2003).

In conclusione, i bambini che vivono a Iglesias, rispetto a quelli coevi di Sant'Antioco, sono quindi risultati essere maggiormente esposti a Pb e Cd, presumibilmente per via della presenza di numerosi bacini di decantazione dei fanghi di laveria e dei cumuli di rifiuti metallurgici. I residui delle lavorazioni infatti sono ad oggi ancora senza misure di protezione e soggetti all'azione battente dell'acqua e dei venti che hanno determinato l'erosione e la diffusione dei metalli pesanti nei reticoli idrici più superficiali ma anche nelle falde più profonde (Varrica et al., 2014).

IMPATTO SUB-CLINICO

Un aspetto particolarmente complicato, riscontrabile in tutti gli studi che mettono in relazione l'accrescimento e l'esposizione ai metalli pesanti, è rappresentato dal controllo dei molti altri fattori che possono influenzare la crescita fisica di un individuo (Schell, 2009).

La crescita di un individuo infatti, riflette l'interazione tra fattori genetici, ambientali e socio-culturali. Nonostante la statura sia in larga parte sotto il controllo genetico: $\geq 80\%$ (Sanna S. et al., 2008; Lettre, 2011), studi condotti su popolazioni geneticamente simili e dissimili, a diverse condizioni ambientali, suggeriscono come le differenze di altezza media nella maggior parte delle popolazioni siano in gran parte attribuibili a fattori ambientali (Steckel, 1995; Boschetti et al., 2009).

Le condizioni socio-economiche, come la classe sociale, il reddito, l'istruzione dei genitori, l'igiene, gli indicatori proxy dello stato nutrizionale sono stati considerati come possibili fattori in grado di influire sul conseguimento delle dimensioni da adulto. I fattori socioeconomici non agiscono in modo diretto sull'accrescimento, bensì indirettamente attraverso due principali fattori: nutrizione e stato di salute (Danubio e Sanna, 2008; Grasgruber et al., 2014).

Per quanto riguarda l'influenza di alcuni inquinanti sull'accrescimento, in specifico il Cd ed il Pb, ad oggi non sono del tutto chiari quali siano i meccanismi fisiologici coinvolti. Per il Pb è stato ipotizzato, che i meccanismi implicati siano essenzialmente dovuti al fatto che questo metallo, antagonista del calcio, abbia un'alta affinità per il tessuto osseo in cui si deposita, determinando così l'inibizione dello sviluppo delle ossa lunghe e delle ossa piatte, a causa di un'infiammazione condrocitica che determina la riduzione o inibizione della divisione cellulare (Gerber et al., 1980; Sanna et al., 2011).

Inoltre, anche gli effetti del piombo sul metabolismo della vitamina D e del calcio potrebbero avere un ruolo per spiegare gli effetti del piombo sullo sviluppo dell'apparato scheletrico (Predy, 2012).

D'altra parte, i risultati di studi condotti sugli effetti del piombo sulle variazioni di peso e dell'indice di massa corporea, sono meno certi, infatti alcuni studi riportano un'associazione positiva (Kim et al., 1995), altri negativa (Ignasiak et al., 2006) ed altri ancora non trovano alcuna associazione statisticamente significativa (Min et al., 2008).

Per quanto riguarda il Cd, è stato ipotizzato che i suoi effetti sull'accrescimento siano collegabili alla sua nefrotossicità e che dunque agisca negativamente sul metabolismo della vitamina D. Inoltre, il Cd sembra possa rallentare la formazione di nuovo tessuto osseo in seguito a destabilizzazione del collagene, per alterazione della sintesi diretta e/o per inibizione dell'enzima lisillossidasi.

Numerosi studi condotti in diverse aree del mondo nel tempo hanno mostrato una relazione negativa tra i livelli di piombo e cadmio nel sangue ed accrescimento, in particolare, per quanto riguarda la statura e la lunghezza dell'arto inferiore. Mentre, a tutt'oggi risultano scarsi o del tutto inesistenti lavori che riportino la dose-risposta negativa con i livelli di piombo e cadmio nei capelli (Sanna et al., 2011).

Ignasiak et al. (2006) in base ad studio su 899 bambini polacchi, campionati nel 1995, di età compresa tra i 7 e 15 anni e residenti nei pressi di una raffineria e di una fonderia di rame, con livelli medi di Pb nel sangue di 7,7 μdl , riportano una riduzione stimata dell'altezza di 5 mm ogni 1 μdl di Pb nel sangue (5,0 cm per 10 μdl), con la riduzione della statura dovuta in gran parte dalla riduzione della lunghezza dell'arto inferiore.

Un'altra ricerca condotta in Grecia su 522 bambini, di età compresa tra 6-9 anni riporta come un aumento del livello di piombo nel sangue di 10 μdl possa essere associato con una diminuzione di 0,86 centimetri di altezza, 0,33 centimetri di

circonferenza cefalica, e 0,40 centimetri di circonferenza del torace (Kafourou et al., 1997).

Little et al. (2009) riportano come in una coorte di bambini (età 2-12 anni) vi sia stato nel 2002, nella città di Dallas, un incremento staturale di 4,5 cm rispetto ad una coorte di bambini della stessa età esaminati nel 1980. Tale incremento staturale è stato associato con la diminuzione, statisticamente significativa ($p < 0.001$), del livello medio di piombo nel sangue nel 2002 ($1,6 \mu\text{dl}$) rispetto al 1980 ($23,6 \mu\text{dl}$).

Da notare, in un lavoro ormai datato, effettuato nel Nord Italia (Vivoli et al., 1993), basato su un campione di 418 individui di età compresa tra 11-13 anni (piombemia media di $8,5 \mu\text{dl}$ nei ragazzi e $7,0 \mu\text{dl}$ nelle ragazze), viene riportata una relazione negativa, statisticamente significativa, tra i livelli di piombo nel sangue e la statura.

Per quanto concerne il cadmio, uno studio longitudinale della durata di 63 mesi (da 1,5 anni sino a 5 anni) condotto in Bangladesh, riporta un'associazione inversa tra un'elevata esposizione al cadmio e la statura. La perdita stimata attribuibile all'esposizione è ipotizzata di 1,6 cm nell'arco di tempo considerato (Gardner et al., 2013).

In questa ricerca, i risultati della F di ANOVA (Tabella n. 7), oltre ad evidenziare differenze statisticamente significative per le concentrazioni di PbH e CdH, riscontrate nei due Comuni, indicano anche come esistano delle differenze, anch'esse statisticamente significative, per quanto riguarda la statura, la statura da seduto e la lunghezza convenzionale dell'arto inferiore ($p < 0,001$), mentre non sono state riscontrate differenze, statisticamente significative, per il perimetro toracico, la circonferenza cefalica, il peso e l'indice di massa corporea.

I bambini del Comune di Iglesias, presentanti concentrazioni di PbH e CdH molto superiori rispetto ai coetanei di Sant'Antioco, mostrano, sia nel campione a sessi uniti sia a sessi separati, una statura, una statura da seduto e una LCAI sempre inferiori. Nello specifico, nel campione a sessi uniti, risultano minori di circa 5,5 cm per quanto concerne la statura, 2,8 cm per la statura da seduto e di 3 cm per la LCAI.

Non essendo state riscontrate, sempre in base ai valori delle F di ANOVA, delle differenze, statisticamente significative, tra i fattori genetici e i fattori dello stato socio-economico e anagrafici che possano influenzare l'accrescimento individuale, è possibile formulare l'ipotesi che questa differenza nell'accrescimento possa essere considerata come una conseguenza di una loro maggiore esposizione al Pb e al Cd.

A sostegno di questa ipotesi, oltre ai risultati del coefficiente di correlazione di Pearson significativi (PbH: $r = -0,29$ con la statura, $-0,25$ con la statura da seduto, $-0,26$ LCAI; CdH: $r = -0,26$ statura, $-0,23$ statura da seduto, $-0,24$ con la LCAI), i modelli di regressione multivariata in modalità ridge, aventi come variabili dipendenti la statura, la statura da seduto e la lunghezza convenzionale dell'arto inferiore indicano come i livelli di cadmio, riscontrati nei capelli, risultino essere legati negativamente (Modelli 1 e Modelli 2), in maniera statisticamente significativa, con la statura, la statura da seduto e con la lunghezza convenzionale dell'arto inferiore.

Inoltre, dopo aver rimosso il cadmio (Modelli 3), come variabile dipendente dai modelli di regressione proposti, dato che potrebbe svolgere un ruolo di mascheramento delle relazioni tra la variabile dipendente ed il piombo, viste le grandissime differenze nei livelli di CdH riscontrate tra i due Comuni (one-way Anova, $F=333,888$, $p < 0,001$), la loro alta correlazione lineare semplice ($r = 0,76$), i valori dei coefficienti di correlazione parziale nel Modello 1, rileviamo che anche il piombo ha mostrato una relazione negativa, anch'essa statisticamente significativa con la statura e la lunghezza convenzionale dell'arto inferiore, mentre non è risulta esserci una relazione con la statura da seduto.

Con l'intento di valutare anche la possibilità che le relazioni ottenute potessero essere influenzate dai modelli proposti, le variabili dipendenti: statura, statura da seduto, e lunghezza convenzionale dell'arto inferiore sono state poste in regressione lineare semplice con i soli livelli di CdH o di PbH (Vallascas et al., 2013). I risultati ottenuti hanno mostrato sempre un'associazione negativa, statisticamente significativa, eccetto che tra statura da seduto e PbH.

Quest'ultimo risultato è in linea con quanto già riportato in letteratura, ovvero il piombo preferibilmente tende a depositarsi nelle ossa lunghe, e quindi a ridurre lo sviluppo, rispetto alle ossa piatte (Ignasiak et al., 2006). Un'altra spiegazione, come sostenuto da Malina et al., (2004), potrebbe essere legata ai diversi tempi in cui avviene lo sviluppo in lunghezza del tronco rispetto alla crescita in lunghezza delle gambe durante lo scatto di crescita adolescenziale.

D'altra parte, i modelli di regressione multivariata in modalità ridge, aventi come variabile dipendente il perimetro toracico, la circonferenza cefalica, il peso e il BMI non hanno mostrato nessun tipo di associazione tra i livelli di CdH e PbH.

Nonostante le perplessità connesse all'utilizzazione dei capelli come biomarker di esposizione, i risultati ottenuti in questa ricerca suggerirebbero la loro affidabilità nell'indagine preliminare per valutare gli effetti sub-clinici all'esposizione ai metalli pesanti.

A tal proposito, visto che l'accumulo di questi metalli nell'organismo risulta essere subdolo e potenzialmente tossico, sarebbe interessante formulare dei livelli critici o soglia all'esposizione al cadmio e al piombo, anche per quanto concerne le relative concentrazioni riscontrate nei capelli (Caroli et al., 1992; Sukumar et al., 2007). Quanto meno per ambiti di esposizione e fasce di popolazione con background socio economico culturale ed ambientale simili. Ciò risulta essere oltremodo opportuno per quella fascia della popolazione maggiormente a rischio come i bambini. In quanto,

l'esposizione a questi elementi, soprattutto all'inizio delle fasi della vita e dello sviluppo, è in grado di produrre anche effetti permanenti (Carneiro et al., 2011).

In conclusione, i risultati di questa indagine forniscono indicazioni su un possibile impatto sub-clinico sull'accrescimento da parte del Pb e del Cd su una popolazione in accrescimento. Inoltre questo studio, sicuramente non di tipo diagnostico, suggerisce l'eventualità di un potenziale rischio per la salute della popolazione esposta, dunque sarebbe opportuno proseguire il biomonitoraggio estendendo l'analisi a studi epidemiologici connessi agli effetti clinici dell'esposizione, ed all'accumulo di cadmio e piombo nell'organismo.

POLIMORFISMI GENETICI

Gli effetti tossici di un agente inquinante sull'organismo umano sono strettamente correlati alla dose, alla durata e al tempo di esposizione. Tuttavia, tra popolazioni e all'interno di una popolazione, esiste una grande variabilità della suscettibilità alle concentrazioni dei metalli pesanti, anche in situazioni di esposizione comparabili (Gundacker et al., 2010).

Tra i vari fattori biologici e non-biologici che determinano la suscettibilità individuale (età, sesso, alimentazione, etc.), il genotipo ha un ruolo centrale in quanto determina vari fenotipi disintossicanti, che possono portare ad individui con enzimi e funzioni di disintossicazione regolari o ad individui con metabolizzatori lenti con attività enzimatica debole o nulla. Il background genetico costituisce quindi la base biologica della suscettibilità individuale verso esposizioni tossiche ed ai rischi associati per la salute (Pawlas et al., 2012, 2015).

I polimorfismi (SNPs) del acido δ -aminolevulinico deidratasi (ALAD) e del recettore della vitamina D (VDR) sono stati oggetto di studio, in quanto le modificazioni delle loro strutture, dovute alle diverse mutazioni, potrebbero determinare variazioni nell'assorbimento ed accumulo del piombo nell'organismo.

I risultati sui polimorfismi del recettore della vitamina D (VDR) in letteratura riportano come: per Bsm, il genotipo bb (Schwartz et al., 2000; Shy et al., 2003; Xi-Biao et al., 2003; Rezende et al, 2008; Pawlas et al., 2012) per FokI, il genotipo ff (Haynes et al, 2003; Rezende et al, 2008; Pawlas et al., 2012), e per Apa I, il genotipo aa (Rezende et al, 2008), sembrano poter esser associabili anche con basse concentrazioni di piombo nel sangue. Per il polimorfismo TaqI, Chuang et al. (2004) non riporta nessuna differenza statisticamente significativa, in un campione di lavoratori di una fabbrica di batterie, tra i tre genotipi ed i livelli di piombemia, così come Krieg et al. (2010) in un campione di 4726 individui di diverse fasce d'età e diverse popolazioni degli Stati Uniti.

Per quanto concerne i risultati, presenti in letteratura, sui polimorfismi dell'acido δ -aminolevulinico deidratasi (ALAD), Xi-Biao et al. (2003) e Pawlas et al., (2012) non riscontrano nessuna associazione tra i bassi livelli di piombemia nel sangue e i diversi genotipi, d'altra parte diversi autori riportano una associazione significativa, in individui esposti occupazionalmente, tra alti livelli di piombo nel sangue e i genotipi 1-2 e 2-2 di ALAD Aci I (Wetmur et al., 1991; Fleming et al., 1998;; Zhao et al, 2007; Gao et al., 2010), mentre in un altro studio (Krieg et al., 2009), su un campione di individui di età compresa tra i 12 e i 16 anni, riporta che le più basse concentrazioni di piombo nel sangue sono state rilevate negli individui con genotipo 1-1 e 1-2.

La 5,10 Metilenetetraidrofolato reduttasi (MTHFR), è un enzima centrale nel metabolismo dei folati. Questo enzima ha ripercussioni sulle funzioni immunitarie, sul metabolismo muscolare, sulla produzione e regolazione dei neurotrasmettitori chimici e risulta indirettamente coinvolto nei processi legati al turn-over osseo (che rappresenta il principale tessuto di deposito per il piombo). I suoi polimorfismi, in particolar modo il C667T, sono stati associati ad un aumentato rischio di fratture osteoporotiche (Bathum et al., 2004; Villadsen et al. 2005) ed ad una bassa densità ossea (Abrahamsen et al., 2003; 2006). In uno studio (Shen et al., 2015) condotto su un campione di 973 donne cinesi riporta, una possibile associazione tra il polimorfismo C667T ed i livelli di piombemia.

Inoltre nella ricerca, alla fine di individuare dei possibili marcatori di suscettibilità all'esposizione al cadmio sono stati presi in considerazione due SNPs coinvolti nella codifica degli enzimi DNA metiltransferasi (DNMT1 e DNMT3B). Gli studi su questi polimorfismi, rispetto alla loro possibile influenza sui diversi livelli di assorbimento del cadmio, sono rarissimi: Hossain et al. (2012) riportano una possibile relazione tra le concentrazioni di cadmio nel sangue e i polimorfismi della DNA metiltransferasi DNMT1 (rs10854076 e rs2228611), mentre non riscontrano nessun tipo di associazione con i

polimorfismi della DNA metiltransferasi DNMT3B, attribuita alle frequenze alleliche riscontrate nel loro campione.

In questo studio tutti gli SNPs considerati rispettano l'equilibrio Hardy-Weinberg, ad eccezione ($p > 0,05$) di Bsm I e della DNA metiltransferasi DNMT3B (rs2424913).

Il polimorfismo Bsm I, nel nostro campione, presenta un forte linkage disequilibrium ($p < 0,0001$) con Taq I e Apa I, ma non con Fok I ($p > 0,05$). Inoltre, anche il polimorfismo Taq I e Apa I sono risultati essere in forte linkage disequilibrium ($p < 0,0001$).

I risultati della regressione multipla, avente come variabile dipendente i livelli log trasformati di PbH, e come variabili indipendenti i polimorfismi (ALAD e del recettore VDR) non mostrano nessun tipo di associazione. Risultati analoghi sono stati ottenuti con la regressione multipla, avente come variabile dipendente le concentrazioni di CdH e come variabili indipendenti i genotipi delle DNA metiltransferasi. Inoltre anche altre statistiche multivariate come: l'analisi delle componenti principali, l'analisi discriminante e l'analisi fattoriale, non hanno prodotto risultati in grado di ipotizzare un'associazione, statisticamente significativa, tra i livelli dei metalli e i marcatori di suscettibilità esaminati.

La numerosità relativamente limitata del campione, in particolare del Comune di Iglesias, potrebbe aver determinato un numero insufficiente di portatori omozigoti per le varianti degli SNPs. Un altro fattore che potrebbe aver portato all'assenza di associazioni tra i diversi genotipi degli SNPs analizzati e i livelli dei metalli pesanti potrebbe essere riconducibile al fatto che i campioni degli autori che riportano una loro associazione sono composti da soggetti occupazionalmente esposti con alti livelli di cadmio e di piombo nel sangue.

Inoltre la mancanza di chiare associazioni, statisticamente significative, tra i livelli di CdH e PbH in sottogruppi di popolazione con diversi genotipi del recettore VDR, dell'acido δ -aminolevulinico deidratasi (ALAD) o di quelli delle DNA metiltransferasi (DNMT1 e DNMT3B) potrebbe essere una conseguenza della natura stessa dei polimorfismi studiati. In quanto, i polimorfismi genetici, peraltro infrequenti nella popolazione oggetto di studio, potrebbero in realtà solo modulare, interagendo con altri fattori (di natura genetica e/o acquisita), la risposta individuale all'esposizione ai metalli pesanti (De Palma et al., 2005).

CONCLUSIONI

L'utilizzo del sangue, nella determinazione quantitativa dei livelli dei metalli pesanti riflette l'esposizione fino \approx 30 giorni, mentre l'utilizzo dei capelli come biomarker permette di valutare lunghi periodi, anche oltre i 6 mesi, di esposizione all'elemento. La raccolta dei campioni di capelli è un metodo non invasivo che può essere ripetuto dopo brevi periodi di tempo senza il rischio di rigetto da parte di soggetti. Questo rende più accettabile come metodo di campionamento, in particolare negli studi che coinvolgono i bambini.

I bambini e le bambine di Iglesias, il cui suo territorio è stato intensamente sfruttato per l'estrazione di zinco, piombo, argento e depositi di bario dall'epoca pre-romana fino alla fine del secolo scorso, hanno mostrato valori molto più elevati di PbH e CdH rispetto ai loro coetanei di Sant'Antioco, distante solo 30 km, ma totalmente periferica rispetto alle mineralizzazioni di solfuri di zinco e piombo proprie del Comune di Iglesias.

L'analisi della varianza ad una via (ANOVA) dimostra come via siano delle differenze statisticamente significative nei livelli di questi due metalli tra i due Comuni. Inoltre ci fornisce indicazioni sul fatto che esistano differenze, anch'esse statisticamente significative, per quanto riguarda la statura e le sue componenti principali (statura da seduto, lunghezza dell'arto inferiore) tra i due campioni di individui esaminati.

Questi risultati, congiuntamente a quanto deducibile dai modelli proposti delle regressioni multivariate in modalità ridge, suggeriscono l'esistenza di un possibile impatto sub-clinico sull'accrescimento da parte del Pb e del Cd sui bambini del Comune di Iglesias.

Inoltre, non è stata individuata nessuna associazione tra i marcatori di suscettibilità utilizzati e i livelli di CdH e PbH, ciò presumibilmente a causa della numerosità relativamente limitata del campione. Inoltre, la mancanza di chiare associazioni, statisticamente significative, tra i livelli di CdH e PbH nei sottogruppi di popolazione con i diversi genotipi dei marcatori di suscettibilità adottati, potrebbe essere legata al fatto che essi svolgano solo una funzione di modulazione, riflettendo in effetti solo una minima parte dei sistemi coinvolti nel metabolismo, assorbimento, ed escrezione di questi metalli pesanti.

Infine, per una valutazione complessiva degli effetti dei metalli pesanti sullo stato di salute della popolazione, sarebbe opportuno analizzare il territorio tramite campionamenti più consistenti, attraverso l'utilizzo di ulteriori marcatori di suscettibilità, e progettando un sistema di biomonitoraggio integrato, con l'estensione dell'analisi anche a studi epidemiologici.

TABELLE

Tab. 1 – Media, numerosità (n.) e deviazione standard (D.S.) delle variabili anagrafiche, socio-economiche e del nucleo familiare

Variabili	SANT'ANTIOCO						IGLESIAS						TOTALE							
	n.		32		52		84		27		33		60		59		85		144	
			Maschi	Femmine	M + F		Maschi	Femmine	M + F		Maschi	Femmine	M + F		Maschi	Femmine	M + F			
	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
Età	12,47	0,65	12,23	0,87	12,36	0,84	12,12	0,79	12,13	0,88	12,12	0,83	12,31	0,73	12,19	0,87	12,26	0,84		
Età Padre	36,33	6,67	34,86	7,16	35,43	6,97	36,82	5,60	36,65	6,88	36,73	6,27	36,55	6,17	35,53	7,07	35,96	6,70		
Età Madre	31,87	5,01	31,60	4,91	31,71	4,92	31,74	4,90	33,62	6,00	32,75	5,55	31,81	4,92	32,36	5,40	32,13	5,19		
N. Figli	2,15	0,80	1,96	0,63	2,04	0,70	2,00	0,83	2,06	0,96	2,03	0,90	2,08	0,81	2,00	0,77	2,03	0,78		
Ordine di genitura	1,55	0,71	1,60	0,63	1,58	0,66	1,44	0,70	1,68	0,94	1,57	0,84	1,50	0,70	1,63	0,76	1,57	0,74		
Professione paterna	3,45	1,09	3,35	1,10	3,39	1,09	2,81	1,14	3,58	1,06	3,22	1,16	3,17	1,15	3,43	1,08	3,32	1,12		
Titolo di studio materno	2,94	1,12	3,31	0,81	3,16	0,95	2,78	1,12	2,94	0,89	2,86	1,00	2,87	1,11	3,17	0,85	3,04	0,98		
Statura padre (cm)	173,56	7,56	173,57	5,60	173,57	6,37	173,50	7,55	172,55	5,78	173,00	6,33	173,53	7,49	173,19	5,65	173,33	6,46		
Statura madre (cm)	163,00	5,71	160,44	6,04	161,42	6,01	160,59	5,30	161,63	7,28	161,74	6,39	161,90	5,61	160,88	6,50	161,30	6,15		

Tab. 2 - Media, numerosità (n.) e deviazione standard (D.S.) delle variabili antropometriche

Variabili	SANT'ANTIOCO						IGLESIAS						TOTALE							
	n.		32		52		84		27		33		60		59		85		144	
	Maschi	Femmine	M + F	Maschi	Femmine	M + F	Maschi	Femmine	M + F	Maschi	Femmine	M + F	Maschi	Femmine	M + F	Maschi	Femmine	M + F		
	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
Peso (kg)	45,27	8,97	43,40	7,46	44,13	8,08	41,67	9,76	41,88	10,90	41,78	10,30	43,65	9,43	42,83	8,87	43,18	9,08		
Statura (cm)	154,27	7,29	150,29	5,82	151,84	6,68	145,94	8,41	146,70	7,38	146,33	7,82	150,50	8,81	148,95	6,63	149,60	7,63		
Statura da seduto (cm)	79,12	3,57	78,38	3,72	78,67	3,66	75,09	4,03	76,56	3,71	75,87	3,89	77,31	4,26	77,70	3,80	77,53	3,99		
Lunghezza convenzionale arto inferiore (cm)	75,15	4,59	71,91	3,38	73,17	4,18	70,81	5,31	70,14	4,51	70,45	4,87	73,20	5,35	71,25	3,91	72,07	4,65		
Perimetro addome (cm)	69,89	7,87	68,07	6,30	68,78	6,96	67,63	15,27	68,94	11,48	68,33	12,37	68,87	11,73	68,40	8,55	68,60	9,97		
Perimetro glutei (cm)	82,76	7,43	84,26	7,53	83,68	7,48	80,53	7,34	83,36	9,62	82,05	8,68	81,76	7,41	83,93	8,33	83,02	8,00		
Perimetro polpaccio (cm)	32,91	3,49	32,84	2,89	32,87	3,12	32,49	3,18	32,41	3,63	32,45	3,40	32,72	3,34	32,68	3,17	32,70	3,23		
Perimetro braccio (cm)	23,44	2,77	23,22	2,73	23,31	2,73	23,82	3,54	23,69	4,13	23,75	3,83	23,61	3,12	23,40	3,31	23,49	3,22		
Perimetro polso (cm)	15,84	0,97	14,73	1,12	15,16	1,19	32,49	3,18	15,04	0,93	15,21	0,96	15,65	0,98	14,84	1,06	15,18	1,10		
Diametro biepicondiloideo omerale (cm)	6,28	0,43	5,80	0,31	5,98	0,43	6,13	0,42	5,63	1,03	5,86	0,84	6,21	0,43	5,73	0,67	5,94	0,63		
Circonferenza cefalica (cm)	55,52	1,68	54,58	1,61	54,95	1,69	55,82	1,33	55,02	1,61	55,39	1,53	55,65	1,53	54,75	1,61	55,13	1,63		

Tab. 3 - Media, numerosità (n.) e deviazione standard (D.S.) delle variabili antropometriche proxy dello stato nutrizionale

Variabili	SANT'ANTIOCO						IGLESIAS						TOTALE					
	n. 32		52		84		27		33		60		59		85		144	
	Maschi		Femmine		M + F		Maschi		Femmine		M + F		Maschi		Femmine		M + F	
	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
Plica bicipitale (mm)	6,51	2,90	10,24	13,02	8,80	10,46	7,13	3,98	8,61	5,46	7,92	4,84	6,79	3,41	9,63	10,81	8,44	8,62
Plica tricipitale (mm)	16,39	20,73	18,03	16,73	17,39	18,28	14,91	6,82	17,47	8,84	16,28	7,60	15,72	15,94	17,82	14,08	16,94	14,87
Plica sottoscapolare (mm)	10,05	5,54	12,14	5,69	11,33	5,69	12,18	8,70	14,20	12,09	13,26	10,61	11,00	7,15	12,91	8,64	12,11	8,08
Plica soprailiaca (mm)	12,88	9,33	16,77	8,00	15,26	8,70	13,24	9,87	17,17	13,53	15,34	12,03	13,04	9,50	16,92	10,33	15,29	10,14
Plica polpaccio (mm)	14,99	8,29	15,84	5,16	15,51	6,52	14,81	7,26	15,97	7,05	15,43	7,11	14,91	7,78	15,89	5,89	15,27	6,74
∑ 5 Pliche (mm)	60,83	34,76	73,02	35,41	68,29	35,46	62,27	32,41	71,14	45,89	67,08	40,21	61,48	33,45	72,30	39,47	67,79	37,35
BMI	18,91	2,90	19,16	2,83	19,06	2,84	19,73	3,21	19,37	4,03	19,54	3,64	19,28	3,04	19,24	3,30	19,26	3,19
TUA	44,33	10,11	43,52	10,44	43,83	10,26	47,76	15,06	44,93	16,14	46,27	15,56	45,87	12,58	44,03	12,74	44,81	12,66
UMA	29,74	6,44	26,96	5,51	28,04	6,00	30,31	9,60	26,38	5,81	28,24	8,01	30,00	7,95	26,75	5,59	28,12	6,85
UFA	14,58	7,39	16,55	6,18	15,78	6,70	17,45	9,69	18,54	11,53	18,03	10,62	15,87	8,55	17,28	8,52	16,68	8,53
Waist-hip ratio	0,84	0,04	0,81	0,04	0,82	0,05	0,83	0,16	0,83	0,07	0,83	0,12	0,84	0,11	0,82	0,05	0,83	0,08

Tab. 4 - Media, numerosità (n.) e deviazione standard (D.S.) dei livelli dei Metalli Pesanti rilevate nei capelli (CdH, PbH)

Variabili	SANT'ANTIOCO						IGLESIAS						TOTALE							
	n.		32		52		84		27		33		60		59		85		144	
	Maschi		Femmine		M + F		Maschi		Femmine		M + F		Maschi		Femmine		M + F			
	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.		
Cadmio (µg/g)	0,009	0,011	0,009	0,013	0,009	0,013	0,134	0,121	0,342	0,332	0,246	0,276	0,066	0,102	0,136	0,260	0,106	0,212		
Piombo (µg/g)	0,478	0,577	0,437	0,460	0,453	0,506	2,380	2,968	1,965	1,196	2,156	2,181	1,334	2,230	1,019	1,105	1,150	1,670		

Tab. 5 – Frequenze dei polimorfismi genetici, suddivisi per Comune

		SANT'ANTIOCO	IGLESIAS	TOTALE
n.		84	60	144
Polimorfismi Genetici		M + F	M + F	M + F
		%	%	%
BSM	BB	23,88	26,67	27,45
	Bb	59,70	57,78	64,71
	bb	16,42	15,56	17,65
APA (Taq I)	TT	36,51	32,14	34,45
	Tt	47,62	51,79	49,58
	tt	15,87	16,07	15,97
APA (Apa I)	AA	30,43	37,04	33,33
	Aa	50,72	51,85	51,22
	aa	18,84	11,11	15,45
Fok I	FF	39,76	33,90	37,32
	Ff	49,40	55,93	52,11
	ff	10,84	10,17	10,56
ALA-D (Aci I)	1-1	78,31	77,97	78,17
	1-2	19,28	22,03	20,42
	2-2	2,41	0,00	1,41
ALA-D (Rsa I)	TT	36,59	35,59	36,17
	TC	46,34	44,07	45,39
	CC	17,07	20,34	18,44

Tab. 5 – Frequenze dei polimorfismi genetici e valori del Total Genotype Score, suddivisi per Comune

		SANT'ANTIOCO		IGLESIAS		TOTALE	
n.		84		60		144	
Polimorfismi Genetici		M + F		M + F		M + F	
		%		%		%	
	C677T	CC	31,71	41,38	35,71		
		CT	56,10	50,00	53,57		
		TT	12,20	8,62	10,71		
DNMT3B (rs2424913)		CC	55,29	47,46	52,08		
		CT	29,41	42,37	34,72		
		TT	15,29	10,17	13,19		
DNMT1 (rs2228611)		AA	25,30	39,29	30,94		
		GA	49,40	37,50	44,60		
		GG	25,30	23,21	24,46		
		Media	D.S.	Media	D.S.	Media	D.S.
TOTAL GENOTYPE SCORE		42,88	17,17	44,37	13,60	43,44	15,78

Tab. 6 – Valori del test di Hardy-Weinberg

<i>Polimorfismi genetici</i>	SANT'ANTIOCO		IGLESIAS		TOTALE	
	χ^2	p value	χ^2	p value	χ^2	p value
BSM	2,70	> 0,05	1,30	> 0,05	3,96	< 0,05
APA (Taq I)	0,00	> 0,05	0,22	> 0,05	0,08	> 0,05
APA (Apa I)	0,06	> 0,05	0,67	> 0,05	0,42	> 0,05
Fok I	0,51	> 0,05	2,03	> 0,05	2,14	> 0,05
ALA-D (Aci I)	0,68	> 0,05	0,90	> 0,05	0,00	> 0,05
ALA-D (Rsa I)	0,11	> 0,05	0,56	> 0,05	0,55	> 0,05
C677T	2,27	> 0,05	0,84	> 0,05	2,86	> 0,05
DNMT3B (Rs2424913)	7,64	< 0,01	0,01	> 0,05	4,76	< 0,05
DNMT1 (Rs2228611)	0,01	> 0,05	2,97	> 0,05	1,51	> 0,05

Tab. 7 - Risultati dell'analisi della varianza ad una via (one-way ANOVA); variabile dipendente: Comune di appartenenza degli individui campionati

Variabile	F	p
Sesso	1,014	0,3157
Età	1,274	0,2610
Età Padre	1,278	0,2602
Età Madre	1,259	0,2638
n. Figli	0,018	0,8949
Ordine di genitura	0,000	0,9844
Professione paterna	0,695	0,4058
Titolo di studio materno	3,353	0,0692
Statura Padre	0,251	0,6175
Statura Madre	0,000	0,9910
Peso (kg)	2,183	0,1418
Statura	20,520	0,0000
Statura da seduto	18,698	0,0000
LCAI	13,115	0,0004
Perimetro addome	0,063	0,8023
Perimetro glutei	1,397	0,2392
Perimetro polpaccio	0,523	0,4707
Perimetro braccio	0,756	0,3860
Perimetro polso	0,078	0,7801
Diametro Biepicondilo omerale	1,154	0,2845
Circonferenza Cefalica	2,439	0,1206
Plica bicipitale	0,280	0,5978
Plica tricipitale	0,030	0,8618
Plica sottoscapolare	0,155	0,6944
Plica soprailiaca	0,732	0,3938
Plica polpaccio	0,052	0,8197
BMI	0,386	0,5353
TUA	1,265	0,2626
UMA	0,028	0,8683
UFA	2,377	0,1254
Waist-hip ratio	0,286	0,5934
log \sum 5 Pliche	0,109	0,7421
Cadmio	333,888	0,0000
Piombo	101,468	0,0000

Tab. 8 - Coefficienti di correlazione lineare semplice di Bravais-Pearson tra le variabili presenti nelle regressioni (* $p < 0,05$)

	Età	Età Padre	Età Madre	N. Figli	Ordine Gen.	Prof. Pat.	Tit. Mat.	Statura genitori	Statura	Stat. da seduto	LCAI	TUA	UMA	UFA	W/H ratio	log Σ 5Pliche	CdH	PbH
Età	1,00																	
Età Padre	-0,10	1,00																
Età Madre	-0,13	0,44*	1,00															
N. Figli	0,12	0,26*	-0,10	1,00														
Ord. Gen.	0,07	0,41*	0,11	0,70*	1,00													
Prof. Pat.	-0,02	-0,09	-0,14	-0,01	0,00	1,00												
Tit. Mat.	0,03	-0,14	-0,13	-0,02	0,02	0,45*	1,00											
Statura genitori	-0,13	0,02	0,01	-0,07	0,00	-0,14	-0,10	1,00										
Statura	0,42*	-0,07	0,00	-0,01	-0,01	0,04	0,00	0,33*	1,00									
Statura da seduto	0,44*	-0,09	0,02	-0,07	-0,06	0,07	0,06	0,19*	0,86*	1,00								
LCAI	0,31*	-0,04	-0,02	0,05	0,03	0,01	-0,06	0,39*	0,90*	0,56*	1,00							
TUA	0,10	0,06	0,01	0,18*	0,16	0,02	-0,04	0,01	0,19*	0,21*	0,14	1,00						
UMA	0,19*	0,01	-0,06	0,16	0,08	-0,06	-0,08	0,04	0,24*	0,25*	0,17*	0,76*	1,00					
UFA	0,00	0,09	0,06	0,13	0,17*	0,07	0,00	-0,01	0,09	0,11	0,06	0,87*	0,34*	1,00				
W/H ratio	0,03	0,02	0,00	0,23*	0,18*	0,00	0,00	0,13	0,00	-0,05	0,05	0,28*	0,19*	0,27*	1,00			
log Σ 5Pliche	0,01	0,04	0,07	0,05	0,12	0,05	0,03	-0,03	0,09	0,14	0,04	0,67*	0,22*	0,81*	0,23*	1,00		
CdH	-0,09	0,06	0,11	-0,02	-0,01	-0,04	-0,21*	-0,06	-0,29*	-0,25*	-0,26*	0,06	-0,09	0,16	0,05	-0,04	1,00	
PbH	-0,22*	0,07	-0,02	0,09	0,02	0,04	-0,04	0,05	-0,26*	-0,23*	-0,24*	0,03	-0,11	0,13	0,20*	0,00	0,76*	1,00

Tab. 9 – Modello 1, sommario della regressione lineare multivariata in modalità ridge, con variabile dipendente: StaturaR= ,62666317 R²= ,39270673 F(15,127)=5,4750 p<,00000

	β	Correl. Parziale	Correl. Semiparz.	Toller.	R-quadro	t(128)	p
Età	0,3951	0,4474	0,3898	0,9732	0,0268	5,6373	0,0000
Età Padre	-0,0505	-0,0568	-0,0443	0,7696	0,2304	-0,6411	0,5226
Età Madre	0,0960	0,1122	0,0880	0,8388	0,1612	1,2719	0,2057
N. Figli	-0,0026	-0,0026	-0,0020	0,5866	0,4134	-0,0290	0,9769
Ordine di genitura	-0,0383	-0,0373	-0,0291	0,5757	0,4243	-0,4201	0,6751
Professione paterna	0,1096	0,1317	0,1035	0,8919	0,1081	1,4969	0,1369
Titolo di studio materno	-0,0562	-0,0664	-0,0519	0,8518	0,1482	-0,7504	0,4544
Statura genitori	0,3514	0,4141	0,3545	1,0173	-0,0173	5,1262	0,0000
TUA	0,0764	0,0398	0,0310	0,1650	0,8350	0,4487	0,6544
UMA	0,0666	0,0531	0,0414	0,3867	0,6133	0,5988	0,5504
UFA	0,0601	0,0384	0,0300	0,2483	0,7517	0,4332	0,6656
Waist-hip ratio	-0,0741	-0,0911	-0,0713	0,9260	0,0740	-1,0312	0,3044
log Σ 5 Pliche	-0,0034	-0,0031	-0,0024	0,5173	0,4827	-0,0353	0,9719
Cadmio	-0,2259	-0,1983	-0,1576	0,4869	0,5131	-2,2796	0,0243
Piombo	-0,0095	-0,0085	-0,0067	0,4893	0,5107	-0,0963	0,9234

Tab. 10 – Modello 2, sommario della regressione lineare multivariata in modalità ridge, con variabile dipendente: StaturaR= ,62662779 R²= ,39266239 R² Aggiust.= ,32623484 F(14,128)=5,9111 p<,00000

	β	Correl. Parziale	Correl. Semiparz.	Toller.	R-quadro	t(128)	p
Età	0,3965	0,4559	0,3992	1,0135	-0,0135	5,7949	0,0000
Età Padre	-0,0512	-0,0577	-0,0451	0,7754	0,2246	-0,6544	0,5141
Età Madre	0,0970	0,1143	0,0897	0,8542	0,1458	1,3016	0,1954
N. Figli	-0,0037	-0,0036	-0,0028	0,5950	0,4050	-0,0409	0,9674
Ordine di genitura	-0,0376	-0,0367	-0,0286	0,5789	0,4211	-0,4157	0,6783
Professione paterna	0,1094	0,1315	0,1034	0,8926	0,1074	1,5006	0,1359
Titolo di studio materno	-0,0571	-0,0680	-0,0531	0,8647	0,1353	-0,7708	0,4422
Statura genitori	0,3508	0,4150	0,3554	1,0264	-0,0264	5,1599	0,0000
TUA	0,0766	0,0399	0,0311	0,1650	0,8350	0,4519	0,6521
UMA	0,0669	0,0534	0,0417	0,3872	0,6128	0,6047	0,5464
UFA	0,0602	0,0385	0,0300	0,2483	0,7517	0,4354	0,6640
Waist-hip ratio	-0,0755	-0,0946	-0,0741	0,9632	0,0368	-1,0752	0,2843
log Σ 5 Pliche	-0,0037	-0,0034	-0,0026	0,5177	0,4823	-0,0383	0,9695
Cadmio	-0,2326	-0,2803	-0,2276	0,9574	0,0426	-3,3041	0,0012

Tab. 11 – Modello 3, sommario della regressione lineare multivariata in modalità ridge, con variabile dipendente: StaturaR= ,60651301 R²= ,36785803 R² Aggiust.= ,29871751 F(14,128)=5,3204 p<,00000

	β	Correl. Parziale	Correl. Semiparz.	Toller.	R-quadro	t(128)	p
Età	0,3786	0,4271	0,3755	0,9838	0,0162	5,3433	0,0000
Età Padre	-0,0386	-0,0426	-0,0339	0,7730	0,2270	-0,4828	0,6300
Età Madre	0,0726	0,0841	0,0671	0,8547	0,1453	0,9546	0,3416
N. Figli	0,0176	0,0171	0,0136	0,5924	0,4076	0,1931	0,8472
Ordine di genitura	-0,0475	-0,0454	-0,0361	0,5768	0,4232	-0,5136	0,6084
Professione paterna	0,1103	0,1299	0,1041	0,8919	0,1081	1,4817	0,1409
Titolo di studio materno	-0,0184	-0,0219	-0,0174	0,8959	0,1041	-0,2473	0,8051
Statura genitori	0,3707	0,4283	0,3768	1,0331	-0,0331	5,3621	0,0000
TUA	0,0603	0,0308	0,0245	0,1653	0,8347	0,3487	0,7279
UMA	0,0834	0,0653	0,0520	0,3885	0,6115	0,7399	0,4607
UFA	0,0239	0,0151	0,0120	0,2516	0,7484	0,1708	0,8647
Waist-hip ratio	-0,0584	-0,0709	-0,0565	0,9345	0,0655	-0,8040	0,4229
log Σ 5 Pliche	0,0335	0,0307	0,0244	0,5324	0,4676	0,3476	0,7287
Piombo	-0,1675	-0,2024	-0,1643	0,9621	0,0379	-2,3380	0,0209

Tab. 12 – Modello 1, sommario della regressione lineare multivariata in modalità ridge, con variabile dipendente: Statura da sedutoR= ,58940576 R²= ,34739915 R² Aggiust.= ,27032031 F(15,127)=4,5071 p<,00000

	β	Correl. Parziale	Correl. Semiparz.	Toller.	R-quadro	t(128)	p
Età	0,4145	0,4516	0,4089	0,9732	0,0268	5,7044	0,0000
Età Padre	-0,0537	-0,0583	-0,0471	0,7696	0,2304	-0,6576	0,5120
Età Madre	0,1214	0,1364	0,1112	0,8388	0,1612	1,5514	0,1233
N. Figli	-0,0595	-0,0563	-0,0456	0,5866	0,4134	-0,6359	0,5260
Ordine di genitura	-0,0451	-0,0423	-0,0342	0,5757	0,4243	-0,4769	0,6343
Professione paterna	0,0994	0,1154	0,0939	0,8919	0,1081	1,3095	0,1927
Titolo di studio materno	0,0008	0,0009	0,0007	0,8518	0,1482	0,0103	0,9918
Statura genitori	0,2247	0,2701	0,2266	1,0173	-0,0173	3,1613	0,0020
TUA	0,0718	0,0361	0,0292	0,1650	0,8350	0,4071	0,6847
UMA	0,1106	0,0849	0,0688	0,3867	0,6133	0,9597	0,3390
UFA	0,0200	0,0123	0,0100	0,2483	0,7517	0,1391	0,8896
Waist-hip ratio	-0,1176	-0,1387	-0,1132	0,9260	0,0740	-1,5787	0,1169
log Σ 5 Pliche	0,0654	0,0582	0,0471	0,5173	0,4827	0,6566	0,5126
Cadmio	-0,2155	-0,1830	-0,1504	0,4869	0,5131	-2,0981	0,0379
Piombo	0,0499	0,0432	0,0349	0,4893	0,5107	0,4873	0,6269

Tab. 13 – Modello 2, sommario della regressione lineare multivariata in modalità ridge, con variabile dipendente: Statura da sedutoR= ,58836953 R²= ,34617870 R² Aggiust.= ,27466700 F(14,128)=4,8409 p<,00000

	β	Correl. Parziale	Correl. Semiparz.	Toller.	R-quadro	t(128)	p
Età	0,4074	0,4524	0,4102	1,0135	-0,0135	5,7393	0,0000
Età Padre	-0,0503	-0,0547	-0,0443	0,7754	0,2246	-0,6197	0,5365
Età Madre	0,1163	0,1318	0,1075	0,8542	0,1458	1,5040	0,1350
N. Figli	-0,0541	-0,0515	-0,0417	0,5950	0,4050	-0,5838	0,5604
Ordine di genitura	-0,0485	-0,0456	-0,0369	0,5789	0,4211	-0,5165	0,6064
Professione paterna	0,1004	0,1165	0,0949	0,8926	0,1074	1,3275	0,1867
Titolo di studio materno	0,0054	0,0062	0,0050	0,8647	0,1353	0,0704	0,9440
Statura genitori	0,2279	0,2746	0,2309	1,0264	-0,0264	3,2308	0,0016
TUA	0,0706	0,0354	0,0287	0,1650	0,8350	0,4012	0,6889
UMA	0,1087	0,0834	0,0677	0,3872	0,6128	0,9466	0,3456
UFA	0,0196	0,0121	0,0098	0,2483	0,7517	0,1369	0,8913
Waist-hip ratio	-0,1105	-0,1329	-0,1084	0,9632	0,0368	-1,5169	0,1317
log Σ 5 Pliche	0,0669	0,0594	0,0481	0,5177	0,4823	0,6734	0,5019
Cadmio	-0,1804	-0,2133	-0,1766	0,9574	0,0426	-2,4703	0,0148

Tab. 14 – Modello 3, sommario della regressione lineare multivariata in modalità ridge, con variabile dipendente: Statura da sedutoR= ,56989471 R²= ,32477999 R² Aggiust.= ,25092780 F(14,128)=4,3977 p<,00000

	β	Correl. Parziale	Correl. Semiparz.	Toller.	R-quadro	t(128)	p
Età	0,3987	0,4336	0,3954	0,9838	0,0162	5,4447	0,0000
Età Padre	-0,0423	-0,0453	-0,0372	0,7730	0,2270	-0,5125	0,6092
Età Madre	0,0990	0,1107	0,0916	0,8547	0,1453	1,2605	0,2098
N. Figli	-0,0402	-0,0376	-0,0309	0,5924	0,4076	-0,4259	0,6709
Ordine di genitura	-0,0539	-0,0497	-0,0409	0,5768	0,4232	-0,5633	0,5742
Professione paterna	0,1000	0,1142	0,0945	0,8919	0,1081	1,3005	0,1958
Titolo di studio materno	0,0369	0,0425	0,0349	0,8959	0,1041	0,4811	0,6313
Statura genitori	0,2431	0,2879	0,2471	1,0331	-0,0331	3,4017	0,0009
TUA	0,0565	0,0279	0,0230	0,1653	0,8347	0,3161	0,7525
UMA	0,1267	0,0957	0,0790	0,3885	0,6115	1,0872	0,2790
UFA	-0,0145	-0,0089	-0,0073	0,2516	0,7484	-0,1002	0,9203
Waist-hip ratio	-0,1027	-0,1199	-0,0992	0,9345	0,0655	-1,3665	0,1742
log Σ 5 Pliche	0,1006	0,0890	0,0734	0,5324	0,4676	1,0108	0,3140
Piombo	-0,1008	-0,1194	-0,0989	0,9621	0,0379	-1,3611	0,1759

Tab. 15 – Modello 1, sommario della regressione lineare multivariata in modalità ridge, con variabile dipendente: Lunghezza arto inferioreR= ,56580081 R²= ,32013056 R² Aggiust.= ,23983102 F(14,128)=3,9867 p<,00001

	β	Correl. Parziale	Correl. Semiparz.	Toller.	R-quadro	t(128)	p
Età	0,2929	0,3308	0,2890	0,9732	0,0268	3,9499	0,0001
Età Padre	-0,0368	-0,0392	-0,0323	0,7696	0,2304	-0,4417	0,6594
Età Madre	0,0535	0,0593	0,0490	0,8388	0,1612	0,6691	0,5046
N. Figli	0,0467	0,0434	0,0358	0,5866	0,4134	0,4893	0,6255
Ordine di genitura	-0,0242	-0,0223	-0,0184	0,5757	0,4243	-0,2509	0,8023
Professione paterna	0,0946	0,1077	0,0894	0,8919	0,1081	1,2213	0,2242
Titolo di studio materno	-0,0929	-0,1035	-0,0858	0,8518	0,1482	-1,1724	0,2432
Statura genitori	0,3840	0,4252	0,3873	1,0173	-0,0173	5,2941	0,0000
TUA	0,0637	0,0314	0,0259	0,1650	0,8350	0,3538	0,7241
UMA	0,0144	0,0109	0,0089	0,3867	0,6133	0,1223	0,9029
UFA	0,0815	0,0492	0,0406	0,2483	0,7517	0,5549	0,5799
Waist-hip ratio	-0,0207	-0,0242	-0,0200	0,9260	0,0740	-0,2728	0,7855
log Σ 5 Pliche	-0,0617	-0,0537	-0,0444	0,5173	0,4827	-0,6064	0,5453
Cadmio	-0,1859	-0,1554	-0,1297	0,4869	0,5131	-1,9253	0,0487
Piombo	-0,0585	-0,0495	-0,0409	0,4893	0,5107	-0,5588	0,5772

Tab. 16 – Modello 2, sommario della regressione lineare multivariata in modalità ridge, con variabile dipendente: Lunghezza arto inferioreR= ,56432142 R²= ,31845867 R² Aggiust.= ,24391508 F(14,128)=4,2721 p<,00000

	β	Correl. Parziale	Correl. Semiparz,	Toller.	R-quadro	t(128)	p
Età	0,3012	0,3448	0,3032	1,0135	-0,0135	4,1557	0,0001
Età Padre	-0,0409	-0,0435	-0,0360	0,7754	0,2246	-0,4931	0,6228
Età Madre	0,0594	0,0664	0,0549	0,8542	0,1458	0,7529	0,4529
N. Figli	0,0404	0,0377	0,0312	0,5950	0,4050	0,4271	0,6701
Ordine di genitura	-0,0201	-0,0186	-0,0153	0,5789	0,4211	-0,2100	0,8340
Professione paterna	0,0934	0,1063	0,0883	0,8926	0,1074	1,2095	0,2287
Titolo di studio materno	-0,0983	-0,1101	-0,0914	0,8647	0,1353	-1,2532	0,2124
Statura genitori	0,3802	0,4228	0,3852	1,0264	-0,0264	5,2791	0,0000
TUA	0,0652	0,0321	0,0265	0,1650	0,8350	0,3630	0,7172
UMA	0,0166	0,0125	0,0103	0,3872	0,6128	0,1416	0,8876
UFA	0,0819	0,0494	0,0408	0,2483	0,7517	0,5595	0,5768
Waist-hip ratio	-0,0291	-0,0346	-0,0286	0,9632	0,0368	-0,3913	0,6962
log Σ 5 Pliche	-0,0634	-0,0552	-0,0456	0,5177	0,4823	-0,6250	0,5331
Cadmio	-0,2269	-0,2597	-0,2221	0,9574	0,0426	-3,0432	0,0028

Tab. 17 – Modello 3, sommario della regressione lineare multivariata in modalità ridge, con variabile dipendente: Lunghezza arto inferioreR= ,55073685 R²= ,30331108 R² Aggiust.= ,22711073 F(14,128)=3,9804 p<,00001

	β	Correl. Parziale	Correl. Semiparz.	Toller.	R-quadro	t(128)	p
Età	0,2793	0,3150	0,2770	0,9838	0,0162	3,7551	0,0003
Età Padre	-0,0270	-0,0284	-0,0238	0,7730	0,2270	-0,3220	0,7480
Età Madre	0,0341	0,0378	0,0316	0,8547	0,1453	0,4278	0,6695
N. Figli	0,0634	0,0584	0,0488	0,5924	0,4076	0,6615	0,5095
Ordine di genitura	-0,0318	-0,0289	-0,0241	0,5768	0,4232	-0,3273	0,7440
Professione paterna	0,0952	0,1070	0,0899	0,8919	0,1081	1,2180	0,2255
Titolo di studio materno	-0,0618	-0,0699	-0,0585	0,8959	0,1041	-0,7928	0,4294
Statura genitori	0,3999	0,4378	0,4065	1,0331	-0,0331	5,5094	0,0000
TUA	0,0505	0,0246	0,0205	0,1653	0,8347	0,2781	0,7814
UMA	0,0282	0,0211	0,0176	0,3885	0,6115	0,2386	0,8118
UFA	0,0517	0,0311	0,0259	0,2516	0,7484	0,3516	0,7257
Waist-hip ratio	-0,0079	-0,0091	-0,0076	0,9345	0,0655	-0,1030	0,9182
log Σ 5 Pliche	-0,0314	-0,0274	-0,0229	0,5324	0,4676	-0,3101	0,7570
Piombo	-0,1884	-0,2162	-0,1848	0,9621	0,0379	-2,5053	0,0135

Tab. 18 –Sommaro della regressione lineare multivariata in modalità ridge, con variabile dipendente: Piombo

R= ,22679182 R²= ,05143453 R² Aggiust.= -,00519625 F(8,134)=,90824 p<,51176

	β	Correl. Parziale	Correl. Semiparz.	Toller.	R-quadro	t(134)	p
Total Genotype Score	0,1276	0,0901	0,0881	0,4765	0,5235	1,0468	0,2971
Ala D (ACI I)	0,1527	0,1551	0,1529	1,0034	-0,0034	1,8176	0,0714
Ala D (RSA I)	0,0507	0,0504	0,0491	0,9406	0,0594	0,5839	0,5603
BSM	-0,0089	-0,0079	-0,0077	0,7419	0,2581	-0,0913	0,9274
Apa (APA I)	0,0176	0,0162	0,0158	0,8053	0,1947	0,1875	0,8516
Apa (TAQ I)	0,0358	0,0299	0,0292	0,6638	0,3362	0,3468	0,7293
FOK	0,0377	0,0369	0,0359	0,9103	0,0897	0,4272	0,6700
C66T	-0,0896	-0,0867	-0,0847	0,8937	0,1063	-1,0070	0,3157

Tab. 19 - Sommario della regressione lineare multivariata, avente i livelli di Cadmio come variabile dipendente

R= ,11446799 R²= ,01310292 R² Aggiust.= ----- F(2,140)=,92938 p<,39722

	β	Correl. Parziale	Correl. Semiparz.	Toller.	R-quadro	t(140)	p
DNMT1 (rs2228611)	-0,0349	-0,0350	-0,0348	0,9947	0,0053	-0,4148	0,6789
DNMT3B (rs2424913)	0,1065	0,1063	0,1062	0,9947	0,0053	1,2651	0,2079

FIGURE

Fig. 1 - BoxPlot dei livelli di CdH tra i 2 comuni esaminati, nel campione totale e suddiviso per sesso (quantità espresse in $\mu\text{g/g}$)

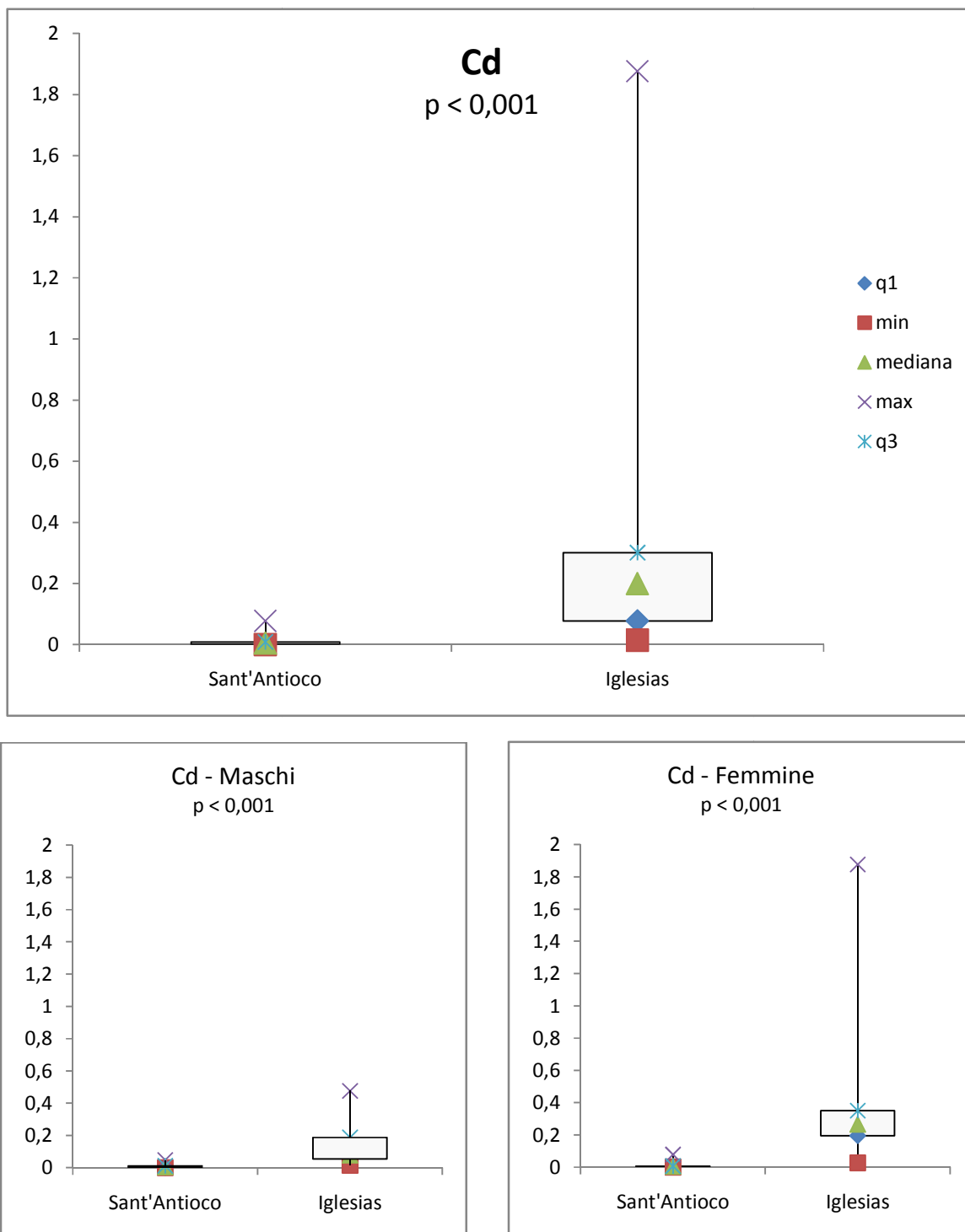


Fig. 2 - BoxPlot dei livelli di PbH tra i 2 comuni esaminati, nel campione totale e suddiviso per sesso (quantità espresse in $\mu\text{g/g}$)

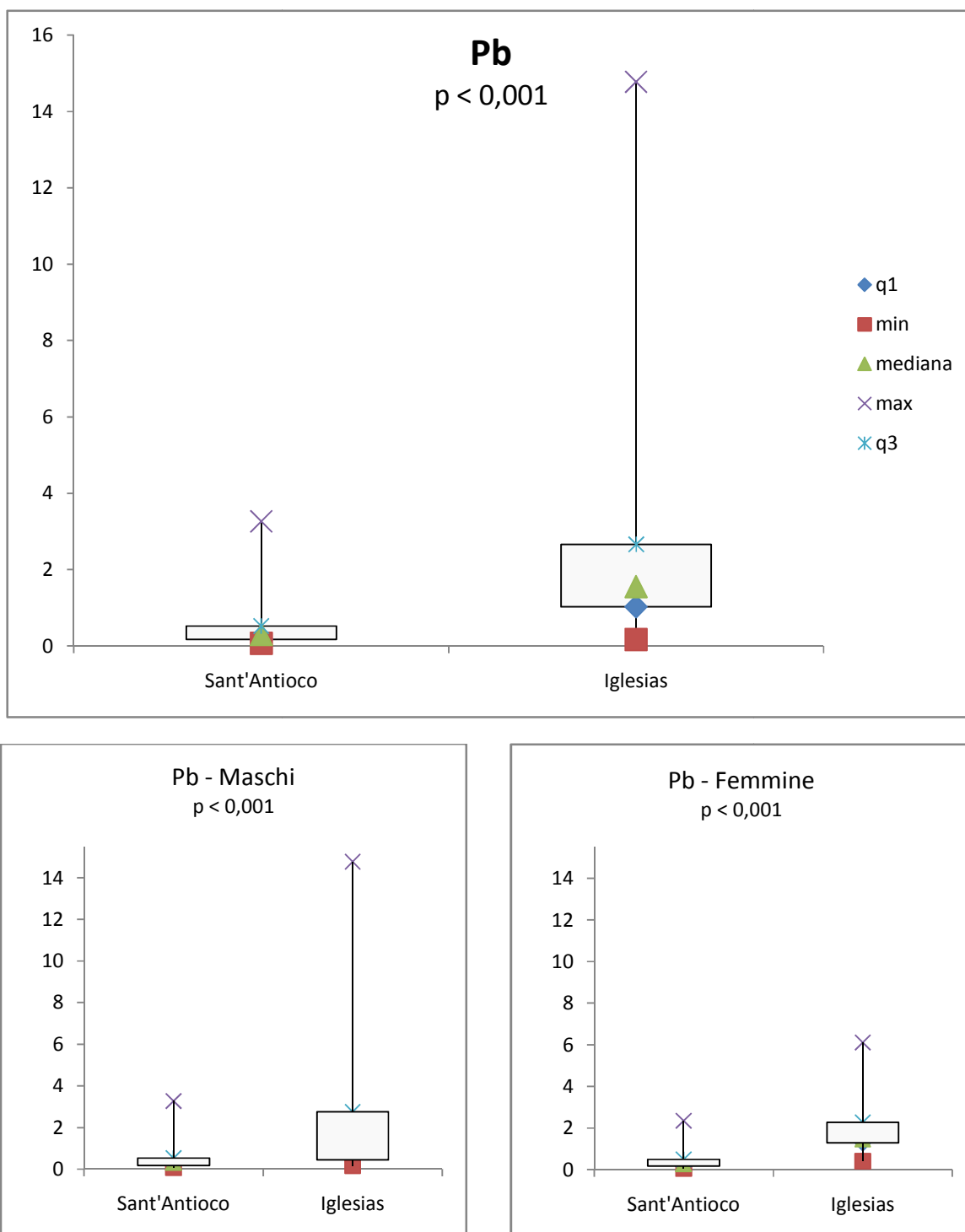
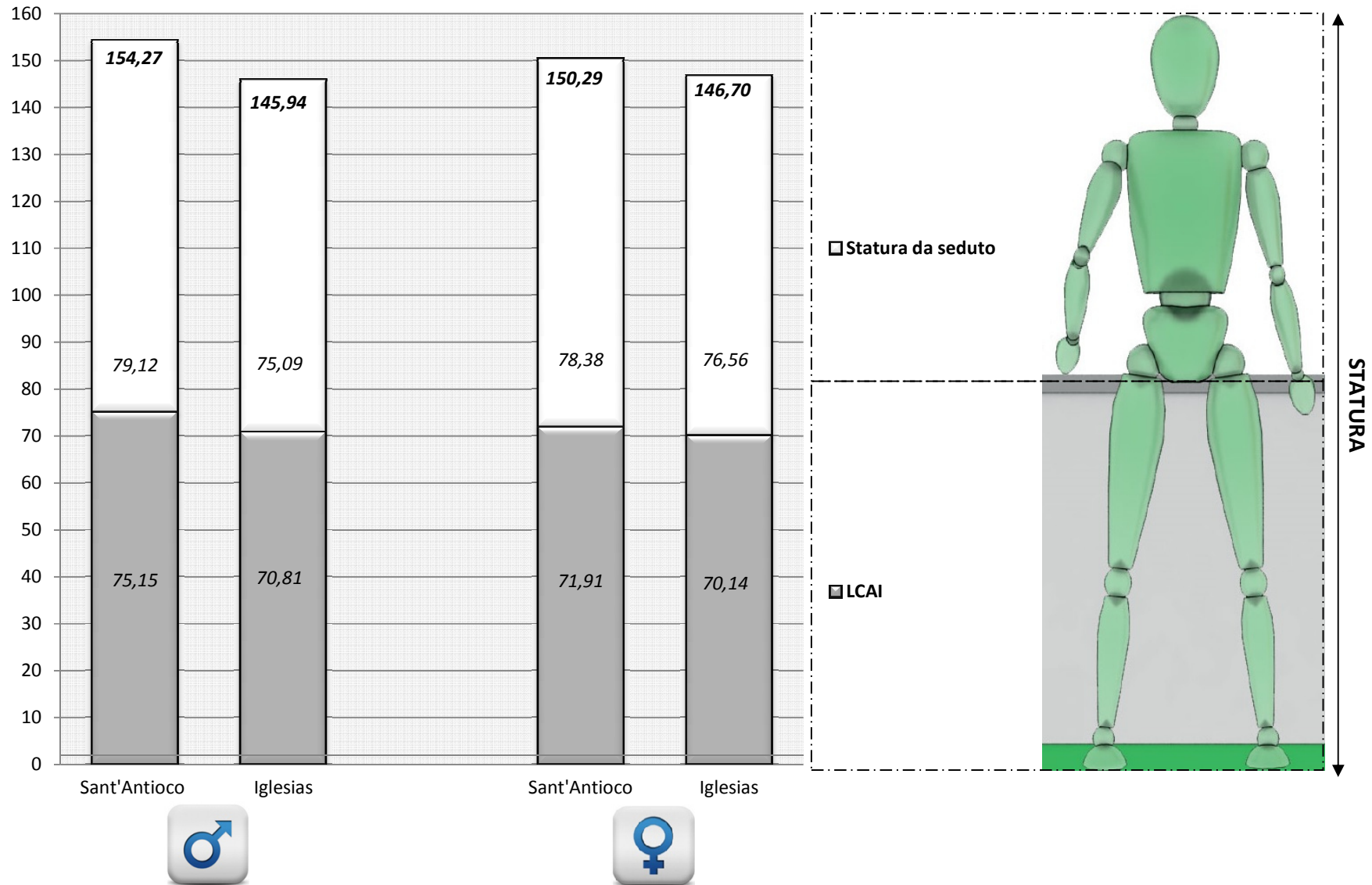


Fig. 3 – Confronto tra la statura e le sue componenti (statura da seduto e lunghezza dell'arto inferiore) nel campione, suddiviso per sesso e Comune (misure espresse in cm)



BIBLIOGRAFIA

- Abrahamsen B., Madsen J.S., Tofteng C.L., Stilgren L., Bladbjerg E.M., Kristensen S.R., Brixen K., Mosekilde L., (2003). A common methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) polymorphism is associated with low bone mineral density and increased fracture incidence after menopause: longitudinal data from the Danish osteoporosis prevention study. *J Bone Miner Res.* 18(4):723-9.
- Abrahamsen B., Jørgensen H.L., Nielsen T.L., Andersen M., Haug E., Schwarz P., Hagen C., Brixen K., (2006). MTHFR c.677C>T polymorphism as an independent predictor of peak bone mass in Danish men--results from the Odense Androgen Study. *Bone.* 38(2):215-9. Epub 2005 Oct 5.
- Affifi A.A., Clark V., (1984). Computer-aided multivariate analysis. Lifetime Learning Publication, Belmont California, pp. 51.
- Afridi H.I., Kazi T.G., Kazi N., Sirajuddin, Kandhro G.A., Baig J.A., Shah A.Q., Wadhwa S.K., Khan S., Kolachi N.F., Shah F., Jamali M.K., Arain M.B. (2010) Evaluation of status of cadmium, lead, and nickel levels in biological samples of normal and night blindness children of age groups 3-7 and 8-12 years. *Biol Trace Elem Res;* 142:350-361.
- Al-Saleh I., Nester M., Devol E., Shinwari N., Al-Shahria S. (1999) Determinants of blood lead levels in Saudi Arabian schoolgirls. *Int J Occup Environ Health,* 5: 107-114.
- Akesson A., Berglund M., Schütz A., Bjellerup P., Bremme K., Vahter M., (2002). Cadmium exposure in pregnancy and lactation in relation to iron status. *Am J Public Health.* 92(2):284-7.
- Akesson A, Bjellerup P, Lundh T, Lidfeldt J, Nerbrand C, Samsioe G, Skerfving S, Vahter M., (2006). Cadmium-induced effects on bone in a population-based study of women. *Environ Health Perspect.,* 114(6):830-4.

- Anderson, A., Hahlin, M. (1981). Cadmium effects from phosphorus fertilization in field experiments. *Swedish journal of agricultural research* 11: 3-10.
- Anway M.D., Cupp A.S., Uzumcu M., Skinner M.K., (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science.*, 328(5979):690.
- Anwar M., (2005). Arsenic, cadmium and lead levels in hair and toenail samples in pakistan. *Environ Sci.*, 12(2):71-86.
- Arai H., Miyamoto K., Taketani Y., Yamamoto H., Iemori Y., Morita K., Tonai T., Nishisho T., Mori S., Takeda E., (1997). A vitamin D receptor gene polymorphism in the translation initiation codon: effect on protein activity and relation to bone mineral density in Japanese women. *J Bone Miner Res.*, 12(6):915-21.
- ATSDR, (2001). Hair analysis panel discussion: exploring the state of the science. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/hair_analysis
- ATSDR, (2007). Toxicological profile for Lead. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- Baker E.L., Goyer R.A., Fowler B.A., Khettry U., Bernard O.B., Alder S., White R., Babayan R. e Feldman R.G., (1980). Occupational lead exposure, nephropathy and renal cancer. *Am. J. Ind. Med.*, 1: 139-148.
- Ballew C., Khan L.K. Kaufmann R., Mokdad A., Miller D.T., Gunter E.W. (1999) Blood lead concentration and children's anthropometric dimensions in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), 1988-1994. *J.Pediatr.*, 134: 623-630.
- Bao Q.S., Lu C.Y., Song H., Wang M., Ling W., Chen W.Q., Deng X.Q., Hao Y.T., Rao S., (2009). Behavioural development of school-aged children who live

around a multi-metal sulphide mine in Guangdong province, China: a cross-sectional study. *BMC Public Health* 9:217.

- Barbieri F.L., Cournil A., Souza Sarkis J.E. Bénéfice E., Gardon J., (2011). Hair trace elements concentration to describe polymetallic mining waste exposure in Bolivian Altiplano. *Biol Trace Elem Res.*, 139(1):10-23.

- Barbosa F., Tanus-Santos J.E., Gerlach R.F., Parsons P.J. (2005) A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ. Health Perspect.*, 113: 1669-1674.

- Barry e Mossman, (1970). Lead concentration in human tissues. *Br. J. Ind. Med.*, 27 pp. 339–351

- Bathum L., von Bornemann Hjelmberg J., Christiansen L., Madsen J.S., Skytthe A., Christensen K., (2004). Evidence for an association of methylene tetrahydrofolate reductase polymorphism C677T and an increased risk of fractures: results from a population-based Danish twin study. *Osteoporos Int.*, 15(8):659-64. Epub 2004 Jan 16.

- Bergomi M., Borella P., Fantuzzi G., (1989). Blood, teeth and hair: 3 different materials used to evaluate exposure to lead and cadmium in children living in an industrial zone. *Ann Ig.*, 1(5):1185-96.

- Bernstein J., Evan A.P. e Gardner K.D., (1987). Epithelial hyperplasia in human polycystic kidney disease. Its role in pathogenesis and risk of neoplasia. *Am J Pathol.*, 129: 92-101.

- Bjerrum N., 1936. Bjerrum's Inorganic Chemistry, 3rd Danish ed., Heinemann, London (1936).

- Boni, M., Costabile, S., De Vivo, B., Gasparrini, M., (1999). Potential environmental hazard in the mining district of southern Iglesias (SW Sardinia, Italy). *J Geochem Explor.*, 67:417–430.

- Boschetti M., Larizza D., Calcaterra V., Arvigo M., Fazzuoli L., Di Battista E., Ferone D., Minuto F.M., (2009). Effect of environment on growth: auxological

and hormonal parameters in African and Italian children. *Growth Horm IGF Res.*, 19(3):238-41.

- Bradman A., Eskenazi B., Sutton P., Athanasoulis M., Goldman L.R., (2001). Iron deficiency associated with higher blood lead in children living in contaminated environments. *Environ Health Perspect.*, 109(10):1079-84.

- Canfield R.L., Henderson C.R., Cory-Slechta D.A., Cox C., Jusko T.A., Lanphear B.P. (2003) Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg per deciliter. *N. Engl. J. Med.*, 348: 1517-1526.

- Campbell T.F., Needleman, H.L., Riess, J.A., Tobin, M.J. (2000) Bone lead levels and language processing performance. *Dev. Neuropsychol.*, 18: 171-186.

- Campbell J.R., Auinger P., (2007). The association between blood lead levels and osteoporosis among adults--results from the third national health and nutrition examination survey (NHANES III). *Environ Health Perspect.*, 115(7):1018-22.

- Caramelli D., (2009). *Antropologia molecolare. Manuale di base.* Firenze University Press

- Cardia P., Pau M., Ibba A., Flore C., Cherchi P., Casula D., (1989). Blood lead levels in children of S.W. Sardinia. *Eur J Epidemiol.*, 5:378-381.

- Carneiro M.F., Moresco M.B., Chagas G.R., de Oliveira Souza V.C., Rhoden C.R., Barbosa F. Jr., (2011). Assessment of trace elements in scalp hair of a young urban population in Brazil., *Biol Trace Elem Res.*, 143(2):815-24.

- Caroli S., Senofonte O., Violante N., Fornarelland L., Powar A., (1992). Assessment of reference values for elements in hair of urban normal subjects. *Microchem J.*, 46:174–183

- Carvalho, A.S.C., Santos, A.S., Pereira, S.F.P., Alvares, C.N., (2009) . Levels of As, Cd, Pb and Hg found in the hair from people living in Altamira, Pará, Brazil: environmental implications in the Belo Monte area. *J Braz Chem Soc.*, 20(6):1153–1163.
- CDC (2004). Work Group of the Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. A Review of the Evidence of Health Effects of Blood Lead Levels < 10 µg/dL in Children. Atlanta, GA:Centers for Disease Control and Prevention.
- Chatt A., Katz S.A. (1988). Hair Analysis. Applications in the Biomedical and Environmental Sciences, VCH, Weinheim.
- Choie D.D., Ritcher G.W., (1980). Effect of lead toxicity on the kidney. In: "Lead Toxicity", R.L. Singhal and J.A. Thomas, eds., Urban and Schwarzenber, Baltimore.
- Chuang H.Y., Yu K.T., Ho C.K., Wu M.T., Lin G.T., Wu T.N., (2004). Investigations of vitamin D receptor polymorphism affecting workers' susceptibility to lead. *J Occup Health.*, 46:316-322.
- Cidu, R., Fanfani, L., (2002). Overview of the environmental geochemistry of mining districts in southwestern Sardinia, Italy. *Geochem-Explor Environ.*, (3):243–251.
- Cidu, R., Biddau, R., Nieddu, G., (2007). Rebound at Pb–Zn mines hosted in carbonate aquifers: influence on the chemistry of ground water. *Mine Water Environ.*, 26:88–101.
- Cidu, R., Biddau, R., Fanfani, L., (2009). Impact of past mining activity on the quality of groundwater in SW Sardinia (Italy). *J Geochem Explor.*, 100:125–132.

- Cidu, R., (2011). Mobility of aqueous contaminants at abandoned mining sites: insights from case studies in Sardinia with implications for remediation. *Environ Earth Sci.*, 64:503–512.
- Chojnacka K., Zielińska A., Górecka H., Dobrzański Z., Górecki H., (2010). Reference values for hair minerals of Polish students. *Environ Toxicol Pharmacol.*, (3):314-9.
- Columbano A., Ledda G.M., Siriqu P., Perra T., Pani P., (1983). Liver cell proliferation induced by a single dose of lead nitrate. *Am J Pathol.*, 110: 83-88.
- Coelho P., Costa S., Costa C., Silva S., Walter A., Ranville J., Pastorinho M.R., Harrington C., Taylor A., Dall'Armi V., Zoffoli R., Candeias C., da Silva E.F., Bonassi S., Laffon B., Teixeira J.P., (2014). Biomonitoring of several toxic metal(loid)s in different biological matrices from environmentally and occupationally exposed populations from Panasqueira mine area, Portugal. *Environ Geochem Health.* 36(2):255-69.
- Cole T.J., Flegal K.M., Nicholls D., Jackson A.A., (2007). Body mass index cut offs to define thinness in children and adolescents: international survey. *BMJ.* 335(7612):194.
- Cooper W.C., (1980). Occupational lead exposure: what are the risks?. *Science.*, 208(4440):129-31
- Cooper W.C., Gaffey W.R., (1975). Mortality of lead workers. *J Occup Med.*, 17(2):100-7.
- Council directive 77/312/EEC, 1977. On biological screening of the population for lead.
- Czerny B., Krupka K., Ożarowski M., Seremak-Mrozikiewicz A., (2014). Screening of trace elements in hair of the female population with different types of cancers in Wielkopolska region of Poland. *ScientificWorldJournal.*, doi: 10.1155/2014/953181. Epub 2014 Dec 15

- Danubio M.E., Sanna E., (2008). Secular changes in human biological variables in Western countries: an updated review and synthesis. *J Anthropol Sci.*, 86:91-112.
- De Palma G., Scotti E., Mozzoni P., Alinovi R., Apostoli P., Neri G., Soleo L., Cassano F., Carta P., Murgia N., Muzi G., Mutti A., (2005). Polimorfismo ALAD ed indicatori di dose e di effetto dell'esposizione professionale a piombo inorganico. *G Ital Med Lav Erg.*, 27:1, Suppl, 39-42
- De Vivo B., Boni M., Marcello A., Costabile S., Di Bonito M., Russo A., (1999). Cartografia Geochimica della Sardegna (Sardinia Geochemical Mapping). In: *Cartografia geochimica ambientale, primi esempi di applicazione. Mem. Descr. Carta Geologica d'Italia 1999; Vol. LV, Servizio Geologico Nazionale*, pp. 97–106.
- De Vivo B., Boni M., Lima A., Marcello A., Pretti S., Costabile S., Gasparrini M., Iachetta A., Tarzia M., (2006). Cartografia geochimica ambientale e carte d'intervento per l'uso del territorio del Foglio Cagliari, Sardegna meridionale. *Mem. Descr. Carta Geologica d'Italia 2006, Servizio Geologico Nazionale*, vol. LXIX Ed De Vivo B. pp. 1–38.
- Di Paolo J.A., Casto B.C., (1979). Quantitative studies of in vitro morphologic transformation of Syrian hamster cells by inorganic metal salts. *Cancer Res.*, 39: 1008-1019.
- Dingwall-Fordyce I., Lane R.E. (1963). A follow-up study of lead workers. *Brit J Industr Med* 20:313-315
- Dongarrà G., Lombardo M., Tamburo E., Varrica D., Cibella F., Cuttitta G., (2011). Concentration and reference interval of trace elements in human hair from students living in Palermo, Sicily (Italy). *Environ Toxicol Pharmacol.*, 32, 27–34.

- Dooyema C.A., Neri A., Lo Y.C., Durant J., Dargan P.I., Swarthout T., Biya O., Gidado S.O., Haladu S., Sani-Gwarzo N., Nguku P.M., Akpan H., Idris S., Bashir A.M., Brown M.J. (2011). Outbreak of Fatal Childhood Lead Poisoning Related to Artisanal Gold Mining in Northwestern Nigeria, 2010. *Environ Health Perspect*; 1-31.
- Dorea J.G., Horner M.R., Bezerra V.L., Pereira M.G., Salomon J.B., (1982). Hair zinc levels and nutritional status in urban children from Ilheus, Bahia, Brazil. *Hum Nutr Appl Nutr.*, 36(1):63-7.
- Dunicz-Sokolowska A., Właźlak E., Surkont G., Radomska K., Długaszek M., Graczyk A., (2007). Contents of bioelements and toxic metals in the Polish population determined by hair analysis. Part IV. Adults aged 40 to 60 years. *Magnes Res.*, 20(2):136-47.
- Duffus J.H., (2003). "Heavy metals" a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, Vol. 75, No. 9, pp. 1357
- Engström A., Michaëlsson K., Suwazono Y., Wolk A., Vahter M., Akesson A., (2011). Long-term cadmium exposure and the association with bone mineral density and fractures in a population-based study among women. *Bone Miner Res.*, 26(3):486-95.
- EMEP, (2009). Persistent Organic Pollutants in the Environment. Joint MSC-E & CCC Report
- EPA, (1986). 600/8-83-021F. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- EPA, (1989). Evaluation of the Potential Carcinogenicity of Lead and Lead Compounds.
- Ersoy B., Balkan C., Gunay T., Egemen A. (2005). The factors affecting the relation between the menarcheal age of mother and daughter. *Child Care Health Dev.*, 31:303-8.

- Eveleth P.B., Tanner J.M., (1990). *Worldwide variation in human growth*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Factor-Litvak P., Wasserman G., Kline J.K., Graziano J. (1999). The Yugoslavia prospective study on environmental lead exposure. *Environmental Health Perspectives*, 107: 9-15.
- Faulk C., Dolinoy D.C., (2011). Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. *Epigenetics*. 6(7):791-7.
- Feinberg A.P., (2007). An epigenetic approach to cancer etiology. *Cancer J.*, 13(1):70-4.
- Ferre´-Huguet N., Nadal M., Schuhmacher M., Domingo J.L. (2009). Monitoring metals in blood and hair of the population living near a hazardous waste incinerator: temporal trend. *Biol Trace Elem Res.*, 128:191–199.
- Floris G., Peretti A., Sanna E., Spadaccino E., Tringali G. (1995). Comparison of blood lead levels between two Sardinian groups of children. *L'Igiene Moderna*, 104: 875-882.
- Floris G., Sanna E. (1997). Secular trends in Sardinia. In: *Growth and development in the changing world* (D.F. Roberts, P. Rudan, T. Skaric-Juric Eds.) 89-110. Croatian Anthropological Society, Zagreb.
- Floris G., Sanna E. (1998). Some aspects of the secular trends in Italy. In: *Secular Growth Changes in Europe* (E.B. Bodzar and C. Susanne Eds.) pp. 207-232. Eötvös University Press, Budapest.
- Floris G., Palmas L., Sanna E. (1999). Anthropometric comparison of two groups of Sardinian children (6-10 years) living in different historical-linguistic and geographical areas of the island. *Biom Hum Anthropol.*, 17: 119-125.

- Freeman N.C., Sheldon L., Jimenez M., Melnyk L., Pellizzari E., Berry M. (2001). Contribution of children's activities to lead contamination of food. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, 11:407-13.
- Fleming D.E., Chettle D.R., Wetmur J.G., Desnick R.J., Robin J.P., Boulay D., Richard N.S., Gordon C.L., Webber C.E., (1998). Effect of the delta-aminolevulinate dehydratase polymorphism on the accumulation of lead in bone and blood in lead smelter workers. *Environ Res.*, 77(1):49-61.
- Freund R., Wilson W., (1997). *Statistical methods*. Academic Press, NY.
- Friberg L., Kjellström T., Nordberg G.F., (1986). Cadmium. In: Friberg L., Nordberg G.F., Vouk V.B. Eds., *Handbook On The Toxicology Of Metals*, Vol. 2, 2nd ed. Elsevier, New York, p.130
- Frisancho R., Ryan A.S. (1991). Decreased stature associated with moderate blood lead concentrations in Mexican-American children. *Am. J. Clin. Nutr.*, 54: 516-519.
- Frosst P., Blom H.J., Milos R., Goyette P., Sheppard C.A., Matthews R.G., Boers G.J., den Heijer M., Kluijtmans L.A., van den Heuvel L.P., Rozen R., (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet.* 1995 May;10(1):111-3.
- Furman A., Laleli M., (2000). Semi-occupational exposure to lead: a case study of child and adolescent street vendors in Istanbul. *Environ Res.*, 83:41-45.
- Gardner R.M., Kippler M., Tofail F., Bottai M., Hamadani J., Grandér M., Nermell B., Palm B., Rasmussen K.M., Vahter M., (2013). Environmental exposure to metals and children's growth to age 5 years: a prospective cohort study. *Am J Epidemiol.*, 15;177(12):1356-67.
- Gerber G.B., Léonard A., Jacquet P., (1980). Toxicity, mutagenicity and teratogenicity of lead. *Mutat Res.*, 76(2):115-41.
- Goering P.L., Waalkes M.P., Klaasen C.D., (1995). Toxicology of cadmium". In: *Toxicology Of Metals, Biochemical Aspects*. Goyer R.A. e Cherian

M.G. Eds., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcellona, Budapest, p. 189

- Goyer R.A., (1996). 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,
- Goodman L.S., e Gilman A., (2005). In: Le basi farmacologiche della terapia. McGraw-Hill.
- Grasgruber P., Cacek J., Kalina T., Sebera M., (2014). The role of nutrition and genetics as key determinants of the positive height trend. *Econ Hum Biol.*, 15:81-100.
- Graziano J.H., (1994). Validity of lead exposure markers in diagnosis and surveillance. *Clin Chem.*, 40(7 Pt 2):1387-90. Review.
- Gundacker C., Gencik M., Hengstschläger M., (2010). The relevance of the individual genetic background for the toxicokinetics of two significant neurodevelopmental toxicants: mercury and lead. *Mutat Res.*, 705(2):130-40.
- HESI, (2004). Health and Environmental Science Institute. <http://www.hesiglobal.org/S>
- Hossain M.B., Vahter M., Concha G., Broberg K., (2012). Low-level environmental cadmium exposure is associated with DNA hypomethylation in Argentinean women. *Environ Health Perspect.*, 120(6):879-84.
- Haefliger P., Mathieu-Nolf M., Locicero S., Ndiaye C., Coly M., Diouf A., Faye A.L., Sow A., Tempowski J., Pronczuk J., Filipe Junior A.P., Bertollini R., Neira M. (2009). Mass lead intoxication from informal used lead-acid battery recycling in dakar, senegal. *Environ Health Perspect*; 117:1535-1540.
- Haynes E.N., Kalkwarf H.J., Hounung R., Wenstrup R., Dietrich K., Lanphear B.P., (2003). Vitamin D Receptor FokI Polymorphism and Blood Lead Concentration in Children. *Environ Health Perspectives.*, 113:111.

- Hursh J.B., Morrow P.E., Beiter H. Amato F., Gibb F.R.,(1980). Pulmonary retention of lead: an experimental study in man. *Environ Res.*, 21: 373
- IARC, (1993). Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry". *Intl Agency Res Cancer.*, Vol 58. Lyon, France, P. 119
- Iglesias V., Steenland K., Maisonet M., Pino P., (2011). Exposure to lead from a storage site associated with intellectual impairment in Chilean children living nearby. *Int J Occup Environ Health*; 17:314-321.
- Ignasiak Z., Slawinska T., Rozek K., (2006). Lead and growth status of schoolchildren living in the copper basin of south-western Poland: Differential effects on bone growth. *Ann Human Biol.*, 33: 401-414.
- Ignasiak Z., Sławinska T., Rozek K., Malina R., Little B.B., (2007). Blood lead level and physical fitness of schoolchildren in the copper basin of south-western Poland: indirect effects through growth stunting. *Ann Hum Biol*; 34:329-343.
- Järup, L., (2003). Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull.*, 68:167-182.
- Järup L, Akesson A. (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 238(3):201-8.
- Jacob B., Ritz B., Heinrich J., Hoelscher B., Wichmann H.E., (2000). The effect of low-level blood lead on hematologic parameters in children. *Environ Res.*, 82:150–159.
- Khalil N., Cauley J.A., Wilson J.W., Talbott E.O., Morrow L., Hochberg M.C., Hillier T.A., Muldoon S.B., Cummings S.R., (2008). Relationship of blood lead levels to incident nonspine fractures and falls in older women: the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res.*, 23:1417–1425.
- Kang H.K., Infante P.F. e Carra J.S., (1980). Occupational lead exposure and cancer. *Science*, 207: 935-936.

- Kafourou A., Touloumi G., Makropoulos V., Loutradi A., Papanagiotou A., Hatzakis A., (1997). Effects of lead on the somatic growth of children. *Arch Environ Health.*, 52(5):377-83.
- Kapka L., Baumgartner A., Siwinska E., Knudsen L.E., Anderson D. e Mielzynska D., (2007). Environmental lead exposure increases micronuclei in children. *Mutagenesis*, 22:201-207.
- Kaji M., Nishi Y., (2006). Lead and Growth. *Clin Pediatr Endocrinol.*, 15(4): 123-128
- Kehoe R.A., Thamann F., Cholack J., (1933). Lead absorption and excretion in certain trades. *J. Ind. Hyg.* 15: 306–319
- Kim R., Hu H., Rotnitzky A., Bellinger D., Needleman H., (1995). A longitudinal study of chronic lead exposure and physical growth in Boston children. *Environ Health Perspect.*, 103(10):952-7.
- Kippler M., Tofail F., Hamadani J.D., Gardner R.M., Grantham-McGregor S.M., Bottai M., Vahter M., (2012a). Early-life cadmium exposure and child development in 5-year-old girls and boys: a cohort study in rural Bangladesh. *Environ Health Perspect.*, 120(10):1462-8
- Kippler M., Tofail F., Gardner R., Rahman A., Hamadani J.D., Bottai M., Vahter M., (2012b). Maternal cadmium exposure during pregnancy and size at birth: a prospective cohort study. *Environ Health Perspect.*, 120(2):284-9.
- Kordas K., Lopez P., Rosado J.L., García Vargas G., Alatorre Rico J., Ronquillo D., Cebrián M.E., Stoltzfus R.J., (2004). Blood lead, anemia, and short stature are independently associated with cognitive performance in Mexican school children. *J Nutr.*, 134(2):363-71.
- Koziolec T., Strecker D., Durska G., Radomska K. (1989). The relationship between hair lead content of 0-12 month infants and the method of their feeding. *Bromat Chem Toksykol.*, 30: 69-74.

- Kjellström T., (1979). Exposure and accumulation of cadmium in populations from Japan, the United States, and Sweden. *Environ Health Perspect.*, 28:169-97.
- Kjellström T. (1992). Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. *IARC Sci Publ.*, 118:301-10.
- Kordas K., Queirolo E.I., Ettinger A.S., Wright R.O., Stoltzfus R.J., (2010). Prevalence and predictors of exposure to multiple metals in preschool children from Montevideo, Uruguay. *Sci Total Environ.* 15;408(20):4488-94.
- Krieg E.F. Jr., Butler M.A., Chang M.H., Liu T., Yesupriya A., Lindegren M.L., Dowling N.; CDC/NCI NHANES III Genomics Working Group. Lead and cognitive function in ALAD genotypes in the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Neurotoxicol Teratol.*, 31(6):364-71.
- Krieg E.F. Jr., Butler M.A., Chang M.H., Liu T., Yesupriya A., Dowling N., Lindegren ML; CDC/NCI NHANES III Genomics Working Group. (2010). Lead and cognitive function in VDR genotypes in the third National Health and Nutrition Examination Survey. *Neurotoxicol Teratol.*, 32(2):262-72.
- Lakshmi Priya M.D., Geetha A., (2011). Level of trace elements (copper, zinc, magnesium and selenium) and toxic elements (lead and mercury) in the hair and nail of children with autism. *Biol Trace Elem Res.*, 142:148-58.
- Lanphear B.P., Hornung R., Ho M., Howard C.R., Eberly S., Knauf K., (2002). Environmental lead exposure during early childhood. *J Pediatr.*, 140:40-7.
- Lauwers M.C., Hauspie R.C., Susanne C., Verheyden J., (1986). Comparison of biometric data of children with high and low levels of lead in the blood. *Am J Phys Anthropol.* 1986 (1):107-16.
- Lauwerys R., Roels H., Regniers M., Buchet J.P., Bernard A., Goret A., (1979). Significance of cadmium concentration in blood and in urine in workers exposed to cadmium. *Environ Res.* 20(2):375-91.

- LeBeau M.A., Montgomery M.A., Brewer J.D., (2011). The role of variations in growth rate and sample collection on interpreting results of segmental analyses of hair. *Forensic Sci Int.*, 210(1-3):110-6.
- Lech T., (2002). Lead, Copper, Zinc, and Magnesium in hair of children and young people with some neurological disease. *Biological Trace Element Research*, 85:111-126.
- Leita, L., De Nobili, M., Pardini, G., Ferrari, F., Sequi, P., (1989). Anomalous contents of heavy metals in soils and vegetation of a mine area in S.W. Sardinia, Italy. *Water Air Soil Pollut.*, 48(3):423-433.
- Lettre G., (2011). Recent progress in the study of the genetics of height. *Hum Genet.*, 129(5):465-72.
- Lidsky T.I., Schneider J.S., (2003). Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain*; 126:5-19.
- Lilis R., (1981). Long-term occupational lead exposure: chronic nephropathy and renal cancer: a case report. *Am. J. Ind. Med.*, 2: 293-297.
- Little B.B., Spalding S., Walsh B., Keyes D.C., Wainer J., Pickens S., Royster M., Villanacci J., Gratton T., (2009). Blood lead levels and growth status among African-American and Hispanic children in Dallas, Texas--1980 and 2002: Dallas Lead Project II. *Ann Hum Biol*, 36(3):331-41.
- Li Y., Zhang X., Yang L., Li H., (2012). Levels of Cd, Pb, As, Hg, and Se in hair of residents living in villages around Fenghuang polymetallic mine, southwestern China. *Bull Environ Contam Toxicol.*, 89(1):125-8.
- Liu J., McCauley L., Compher C., Yan C., Shen X., Needleman H., Pinto-Martin J.A., (2011). Regular breakfast and blood lead levels among preschool children. *Environ Health*; 10:28.
- Lustrino, M., Fedele, L., Melluso, L., Morra, V., Ronga, F., Geldmacher, J., Duggen, S., Agostini, S., Cucciniello, C., Franciosi, L., Meisel, T., (2013). Origin

and evolution of Cenozoic magmatism of Sardinia (Italy). A combined isotopic (Sr-Nd-Pb-O-Hf-Os) and petrological view. *Lithos.*, 180-181, 138–158.

- Malina R.M., Peña Reyes M.E., Tan S.K., Buschang P.H., Little B.B., Koziel S., (2004). Secular change in height, sitting height and leg length in rural Oaxaca, southern Mexico: 1968-2000. *Ann Hum Biol.*, 31(6):615-33.
- Manton W.I., Angle C.R., Stanek K.L., Kuntzelman D., Reese Y.R., Kuehnemann T.J., (2003). Release of lead from bone in pregnancy and lactation. *Environ Res.*, 92:139-151.
- Martin R., Saller K., (1957). *Lehrbuch der anthropologie*. Stuttgart: Fisher Verlag.
- Mascie-Taylor C.G., Boldsen J.L., (1985). Regional and social analysis of height variation in a contemporary British sample. *Ann Hum Biol.*, 12:315-324.
- Massidda M., Corrias L., Bachis V., Culigioni C., Piras F., Cugia P., Scorcu M., Calò M.C., (2014). Genetic Polymorphisms and Skeletal Muscle Injuries among Italian Soccer Players. *Ann Sports Med Res*, (1): 1004.
- Medas, D., Cidu, R., Lattanzi, P., Podda, F., Wanty, R.B., De Giudici, G., (2012a). Hydrozincite seasonal precipitation at Naracauli (Sardinia – Italy): Hydrochemical factors and morphological features of the biomineralization process. *Appl. Geochem.*, 27:1814–1820.
- Medas, D., Cidu, R., Lattanzi, P., Podda, F., De Giudici, G., (2012b.) Natural biomineralization in the contaminated sediment-water system at the ingurtoosu abandoned mine. In: Kothe, E., Varma, A. (Eds.), *Bio-Geo Interactions in Metal-Contaminated Soils (Soil Biology)*, vol. 31; pp. 113–130 (In).
- Menezes-Filho J.A., Viana G.F., Paes C.R., (2012). Determinants of lead exposure in children on the outskirts of Salvador, Brazil. *Environ Monit Assess.* 184(4):2593-603.

- Min K.B., Min J.Y., Cho S.I., Kim R., Kim H., Paek D., (2008). Relationship between low blood lead levels and growth in children of white-collar civil servants in Korea. *Int J Hyg Environ Health.*, 211:82-7.
- Moore M.R., (1973). Plumbosolvency of waters, *Nature (London)*, 243 pp. 222–223
- Morra, V., Secchi, F.A., Assorgia, A., (1994). Petrogenetic significance of peralkaline rocks from Cenozoic calc-alkaline volcanism from SW Sardinia, Italy. *Chem Geol.*, 118, 109–142.
- Morton J., Carolan V.A., Gardiner P.H.E., (2002). Removal of exogenously bound elements from human hair by various washing procedures and determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 455:23–34.
- Navas-Acien A., Guallar E., (2008). Measuring arsenic exposure, metabolism, and biological effects: the role of urine proteomics. *Toxicol Sci.*, 106:1-4.
- Nawrot T.S., Staessen J.A., Roels H.A., Munters E., Cuypers A., Richart T., Ruttens A., Smeets K., Clijsters H., Vangronsveld J., (2010). Cadmium exposure in the population: from health risks to strategies of prevention. *Biometals.*, 23(5):769-82.
- NHANES, 1999—2000. National Health and Nutrition Examination Survey. http://www.cdc.gov/nchs/about/major/nhanes/nhanes99_00.htmS.
- Nogawa K., Tsuritani I., Kido T., Honda R., Yamada Y., Ishizaki M., (1987). Mechanism for bone disease found in inhabitants environmentally exposed to cadmium: decreased serum 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D level. *Int Arch Occup Environ Health.*, 59(1):21-30.

- Nowak B., (1998). Contents and relationship of elements in human hair for a non-industrialised population in Poland. *Sci Total Environ.*, 209:59–68.
- Nowak B., Chmielnicka J., (2000). Relationship of lead and cadmium to essential elements in hair, teeth, and nails of environmentally exposed people. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 46:265–274.
- Olivi L., Cascio S., Wang S., Bressler J., (2002). Mobilization of intracellular calcium in kidney epithelial cells is inhibited by lead. *Toxicology.* 176(1-2):1-9.
- Olympio K.P., Gonçalves C., Günther W.M., Bechara E.J., (2009). Neurotoxicity and aggressiveness triggered by low-level lead in children: a review. *Rev Panam Salud Publica*; 26:266-275.
- Onalajia A.O., Claudio L., (2000). Genetic susceptibility to lead poisoning. *Environ Health Perspect.*, 108:23-28.
- Ozden T.A., Gökçay G., Ertem H.V., Süoğlu O.D., Kiliç A., Sökücü S., Saner G., (2008). Elevated hair levels of cadmium and lead in school children exposed to smoking and in highways near schools. *Clin Biochem.*, 40(1-2):52-6.
- Paglia D.E., Valentine W.N., Dahlgren J.G., (1975). Effects of low-level lead exposure on pyrimidine 5'-nucleotidase and other erythrocyte enzymes. Possible role of pyrimidine 5'-nucleotidase in the pathogenesis of lead-induced anemia. *J Clin Invest.* 56(5):1164-9.
- Pandiani M., (2000). *Trattato di medicina funzionale. Tecniche Nuove Edizioni* pp. 15
- Park E.J., Kim D.S., Park K., (2008). Monitoring of ambient particles and heavy metals in a residential area of Seoul, Korea. *Environ Monit Assess.*, 137(1-3):441-9.
- Pawlas N., Broberg K., Olewińska E., Prokopowicz A., Skerfving S., Pawlas K., (2012). Modification by the genes ALAD and VDR of lead-induced cognitive effects in children. *Neurotoxicology.*, 33(1):37-43.

- Pawlas N, Broberg K, Olewińska E, Kozłowska A, Skerfving S, Pawlas K., (2015). Genetic modification of ALAD and VDR on lead-induced impairment of hearing in children. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 39(3):1091-1098.
- Pereira, R., Ribeir, R., Goncálves, F., (2004). Scalp hair analysis as a tool in assessing human exposure to heavy metals (S. Domingos mine, Portugal). *Sci Total Environ.*, 327:81–92.
- Pokorski P.L., McCabe M.J. Jr., Pounds J.G., (1999). Lead inhibits meso-2,3-dimercaptosuccinic acid induced calcium transients in cultured rhesus monkey kidney cells. *Toxicology.*, 134(1):19-26.
- Predy V.R., (2012). *Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease*. Ed. Springer, pp 762.
- Raghavan S.R.V., Culver B.D., Gonick H.C., (1980). Erythrocyte lead binding protein after occupational exposure. I. Relationship to lead toxicity. *Environ Res.*, 22: 264
- Rahman A., Maqbool E., Zuberi H.S., (2002). Lead-associated deficits in stature, mental ability and behaviour in children in Karachi. *Ann. Trop. Paediatr.*, 22(4): 301-311.
- Rezende V.B., Barbosa F. Jr., Montenegro M.F., Sandrim V.C., Gerlach R.F., Tanus-Santos J.E., (2008). Haplotypes of vitamin D receptor modulate the circulating levels of lead in exposed subjects. *Arch Toxicol.*, 82:29-36.
- Rezende V.B., Amaral J.H., Quintana S.M., Gerlach R.F., Barbosa F., Tanus-Santos J.E., (2010). Vitamin D receptor haplotypes affect lead levels during pregnancy. *Sci Total Environ* 408:4955-4960.
- Robins J.C., Marsit C.J., Padbury J.F., Sharma S.S., Endocrine disruptors, environmental oxygen, epigenetics and pregnancy. *Front Biosci (Elite Ed).*, 3:690-700.

- Rodrigues J.L., Batista B.L., Nunes J.A., Passos C.J., Barbosa F. Jr., (2008). Evaluation of the use of human hair for biomonitoring the deficiency of essential and exposure to toxic elements. *Sci Total Environ.*, 405:370–376.
- Rossouw J., Offermeier J., van Rooyen J.M., (1987). Apparent central neurotransmitter receptor changes induced by low-level lead exposure during different developmental phases in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 91: 132
- Rutter M., Jones R., (1983). *Lead versus health*. New York : Wiley
- Sanin L.H., López S.R., Olivares E.T., Terrazas M.C., Silva M.A., Carrillo M.L., (2001). Relation between birth weight and placenta weight. *Biol Neonate.*, 80(2):113-7.
- Saraci M., Ziegler-Skylakakis K., (1999). Determination of lead in the blood of children in the town of Berat, Albania. *Chemosphere.*, 39(4):689-96.
- Shah F., Kazi T.G., Afridi H.I., Khan S., Kolachi N.F., Arain M.B., Baig J.A., (2011). The influence of environmental exposure on lead concentrations in scalp hair of children in Pakistan. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 74:727-32.
- Shen W., Zhang B., Liu S., Wu H., Gu X., Qin L., Tian P., Zeng Y., Ye L., Ni Z., Wang Q., (2015). Association of blood lead levels with methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms among Chinese pregnant women in Wuhan city. *PLoS One.* 27;10(2):e0117366.
- Sanders T., Liu Y., Buchner V., Tchounwou P.B., (2009). Neurotoxic effects and biomarkers of lead exposure: a review. *Rev Environ Health.* 24(1):15-45.
- Sanna E., Danubio M.E., (2009). Are changes in body dimensions of adult females from Italy (Sardinia and Latium) related to secular trend? *Homo.*, 60(5):451-60.
- Sanna E., Cosseddu G.G., Floris G., Peretti A., Peretti M., Tringali G., (1995). Blood lead levels in three groups of Sardinian children. *J Prev Med Hyg.*, 36:123-130.

- Sanna E., Cosseddu G.G., Floris G., Liguori A., Peretti M., Carbini L., (1999). Comparison of blood lead levels in three groups of Sardinian children. *Anthropol Anz.*, 57:111-121.
- Sanna E., Liguori A., Palmas L., Floris G., (2000). Monitoring blood lead levels of children from Portoscuso: a Sardinian village at risk of lead pollution. In: *Investigaciones en Biodiversidad Humana* (Varela T. Ed) pp. 935-943. Universidad de Santiago de Compostela-Sociedad Española de Antropología Biológica, Santiago de Compostela.
- Sanna E., Liguori A., Palmas L., Soro M.R., Floris G., (2001). New data on blood lead levels in two groups of Sardinian children. *Atti del XIII Congresso AAI, Roma-Sabaudia, ottobre 1999*, pp. 287-292. Cesi, Roma.
- Sanna E., Liguori A., Palmas L., Floris G., (2002). Blood lead levels in children from Sardinian villages at high risk of environmental crisis. *Int J Anthropol.*, 17:101-111.
- Sanna E., Liguori A., Palmas L., Soro M.R., Floris G., (2003). Blood and hairlead levels in boys and girls living in two Sardinian towns at different risk of lead pollution. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 55:293–299.
- Sanna E., Vargiu L., Rossetti I., Vallascas E., Floris G., (2007). Correlation between blood and hair lead levels in boys and girls of Sardinia (Italy). *J Anthropol Sci.*, 85:173–181.
- Sanna E., Floris G., Vallascas E., (2008). Town and gender effects on hair lead levels in children from three Sardinian towns (Italy) with different environmental backgrounds. *Biol Trace Elem Res.*, 124:52–59.
- Sanna E., De Micco A., Vallascas E., (2011). Evaluation of Association between Biomarkers of lead Exposure in Sardinian Children (Italy). *Biol. Trace Elem Res.*, 143:1383-1392.

- Sanna E. Vallasca E., (2011). Hair Lead Levels to evaluate the sub-clinical impact of lead on growth in Sardinian Children (Italy). *A J Hum Biol.*, 23:740-746.
- Sanna S., Jackson A.U., Nagaraja R., Willer C.J., Chen W.M., Bonnycastle L.L., Shen H., Timpson N., Lettre G., Usala G., Chines P.S., Stringham H.M., Scott L.J., Dei M., Lai S., Albai G., Crisponi L., Naitza S., Doheny K.F., Pugh E.W., Ben-Shlomo Y., Ebrahim S., Lawlor D.A., Bergman R.N., Watanabe R.M., Uda M., Tuomilehto J., Coresh J., Hirschhorn J.N., Shuldiner A.R., Schlessinger D., Collins F.S., Davey Smith G., Boerwinkle E., Cao A., Boehnke M., Abecasis G.R., Mohlke K.L., (2008).
- Scheepers P.T., (2008). The use of biomarkers for improved retrospective exposure assessment in epidemiological studies: summary of an ECETOC workshop. *Biomarkers.* 13:734-48.
- Schwartz J., Angle C., Pitcher H., (1986). Relationship between childhood blood lead levels and stature. *Pediatrics*, 77: 281-288.
- Schwartz B.S., Stewart W.F., Kelsey K.T., Simon D., Park S., Links J.M., (2000). Associations of tibial lead levels with Bsm1 polymorphisms in the vitamin D receptor in former organolead manufacturing workers. *Environ Health Perspect.*, 108:199–203.
- Senofonte O., Violante N., Fornarelli L., Beccaloni E., Powar A., Caroli S., (1989). Reference values for elements of toxicological, clinical and environmental interest in hair of urban subjects. *Ann Ist Sup San.*, 25: 385-392.
- Seidel S., Kreuzer R., Smith D., McNeel S., Gilliss D., (2001). Assessment of commercial laboratories performing hair mineral analysis. *JAMA.*, 285:67–72
- Schell L.M., (1991). Effect of pollutants on human prenatal and postnatal growth: noise, lead, polychlorobiphenyl compounds, and toxic wastes. *Yearb. Phys. Anthropol.*, 34: 157-188.

- Schell L.M., Denham M., Stark A.D., Parsons P.J., Schulte E.E., (2009). Growth of infants' length, weight, head and arm circumferences in relation to low levels of blood lead measured serially. *Am J Hum Biol.*, 21(2):180-7.
- Schell L.M., Burnitz K.K., Lathrop P.W., (2010). Pollution and human biology. *Ann Hum Biol.*, 37(3):347-66.
- Schell L.M., (2014). Culture, Urbanism and Changing Human Biology. *Glob Bioet.*, 3;25(2):147-154.
- Shargorodsky J., Curhan S.G., Henderson E., Eavey R., Curhan G.C., (2011). Heavy metals exposure and hearing loss in US adolescents., *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 137(12):1183-9
- Shi K.L., Guo R.R., Wang W.Y., Ma H., Yuan P.F., (2003). Association between vitamin D receptor gene polymorphism and the susceptibility of children to lead. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.*, 41(10):751-4.
- Sorahan T., Adams R.G., Waterhouse J.A., (1983). Analysis of mortality from nephritis and nephrosis among nickel-cadmium battery workers. *J Occup Med.* 25(8):609-12.
- Steckel R., (1995). Stature and the Standard of Living. *J Econ Lit.* Vol. 33, No. 4 (Dec., 1995), pp. 1903-1940
- Stupar J., Dolinsek F., Erzen I., (2007). Hair-Pb longitudinal profiles and blood-Pb in the population of young Slovenian males. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 68:134–143.
- Sukumar A., Subramanian R., (2007). Relative element levels in the paired samples of scalp hair and fingernails of patients from New Delhi. *Sci Total Environ.*, 372:474–479
- Stankov K., Bogdanovic G., Kojic V., Stankov S., Jojic N., Popovic L., Popovic S., (2011). Expression analysis of genes involved in epigenetic regulation and apoptosis in human malignant haematopoietic cell lines treated with 5-azacytidine. *J BUON.*, 16(1):116-22.

- Strumylaite L., Ryselis S., Kregzdyte R., (2004). Content of lead in human hair from people with various exposure levels in Lithuania. *Int J Hyg Environ Health.*, 207(4):345-51.
- Taylor A., (1986). Usefulness of measurements of trace elements in hair. *Ann Clin Biochem.*, 23 (Pt 4):364-78.
- Takenaka S., Oldiges H., König H., hochrainer D., Oberdörster G., (1983). Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in Wistar rats. *J.Natl Cancer Inst.*, 70: 367
- Tamburo E, Varrica D, Dongarrà G., (2014). Coverage intervals for trace elements in human scalp hair are site specific. *Environ Toxicol Pharmacol.*, 39(1):70-6.
- Theppeang K., Glass T.A., Banden-Roche K., Todd A.C., Rohde C.A., Links J.M., Schwartz B.S., (2008). Associations of bone minerals density and lead levels in blood, tibia, and patella in urban-dwelling women. *Envir Health Perspect.*, 116:784-790.
- Thun M.J., Schnorr T.M., Smith A.B., Halperin W.E., Lemen R.A., (1985). Mortality among a cohort of U.S. cadmium production workers--an update. *J Natl Cancer Inst.*, 74(2):325-33.
- Tola S., Hernberg S., Asp S., Nikkanen J., (1973). Parameters indicative of absorption and biological effect in new lead exposure: a prospective study. *Brit. J. Ind. Med.*, 30: 134
- Torrente M., Colomina M.T., Domingo J.L., (2005). Metal concentrations in hair and cognitive assessment in an adolescent population. *Biol Trace Elem Res.*, 104:215–221.
- Uitterlinden A.G., Fang Y., Van Meurs J.B., Pols H.A., Van Leeuwen J.P., (2004). Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.*, 338(2):143-56.

- Vallascas E., De Micco A., Deiana F., Banni S., Sanna E., (2013). Adipose tissue: another target organ for lead accumulation? A study on Sardinian children (Italy). *Am J Hum Biol.*, 25(6):789-94.
- Van de Wiel H.J. (2003) Determination of elements by ICP-AES and ICP-MS. *Horizontal*, 19: 11-33.
- van der Put N.M., Gabreëls F., Stevens E.M., Smeitink J.A., Trijbels F.J., Eskes T.K., van den Heuvel L.P., Blom H.J., (1998). A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *Am J Hum Genet.*, 62(5):1044-51.
- Vander A.J. (1988). Chronic effects of lead on the renin-angiotensin system. *Environ Health Perspect.*, 78:77-83.
- Vahter M., Akesson A., Lidén C., Ceccatelli S., Berglund M., (2007). Gender differences in the disposition and toxicity of metals. *Environ Res.* 104(1):85-95.
- Varrica D., Tamburo E., Milia N., Vallascas E., Cortimiglia V., De Giudici G., Dongarrà G., Sanna E., Monna F., Losno R., (2014). Metals and metalloids in hair samples of children living near the abandoned mine sites of Sulcis-Inglesiente (Sardinia, Italy). *Environ Res.*, 134:366-74.
- Venugopal B., Luckey T. D., (1978). *Metal Toxicity in Mammals. Vol. 2: Chemical Toxicity of Metals and Metalloids.* X. und 409 Seiten, zahlr. Tab. Plenum Press, New York and London.
- Villadsen M.M., Bünger M.H., Carstens M., Stenkjaer L., Langdahl B.L., (2005). Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism is associated with osteoporotic vertebral fractures, but is a weak predictor of BMD. *Osteoporos Int.* 16(4):411-6. Epub 2004 Aug 6.

- Vivoli G., Fantuzzi G., Bergomi M., Tonelli E., Gatto M.R., Zanetti F., Del Dot M., (1993). Relationship between low lead exposure and somatic growth in adolescents. *J Expo Anal Environ Epidemiol.*, 3(1):201-209.
- Waalkes M.P., Rehm S., (1994). Cadmium and prostate cancer. *J Toxicol Environ Health.*, 43(3):251-69.
- Wall J.D., Pritchard J.K., (2003). Assessing the performance of the haplotype block model of linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet.*, 73(3):502-15.
- Waterland R.A., Jirtle R.L., (2003). Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol.*, 23(15):5293-300.
- Weaver V.M., Lee B.K., Todd A.C., (2005). Associations of patella lead and other lead biomarkers with renal function in lead workers. *J Occup Environ Med.*, 47:235-243.
- Weisskopf M.G., Jain N., Nie H., Sparrow D., Vokonas P., Schwartz J., (2009). A prospective study of bone lead concentration and death from all causes, cardiovascular diseases, and cancer in the Department of Veterans Affairs Normative Aging Study. *Circulation* 120:1056–1064.
- Wetmur J.G., Lehnert G., Desnick R.J., (1991). The delta-aminolevulinate dehydratase polymorphism: higher blood lead levels in lead workers and environmentally exposed children with the 1-2 and 2-2 isozymes. *Environ Res.*, 56(2):109-19.
- WHO, (2010). *Childhood Lead Poisoning*. ed. Geneva, World Health Organization
- Wilhelm M., Pesch A., Rostek U., Begerow J., Schmitz N., Idel H., Ranft U., (2002). Concentrations of lead in blood, hair and saliva of German children living in three different areas of traffic density. *Sci Total Environ.*, 297:109-118.

- Wolfesperger M., Hauser G., Gossler W., Schlagenhauen C., (1994). Heavy metals in human hair samples from Austria and Italy influence of sex and smoking-habits. *Sci. Total Environ.*, 156:235-242.
- Xi-Biao Y., Cui-E W., Hua F., Shui-Lian Y., Yi-Wen L., Wei-Min N., (2003). Associations of Blood Lead Levels, Kidney Function, and Blood Pressure with delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase and Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms. *Toxicol Mech Methods.*, 13(2):139-46.
- Yant W.P., Schrenk H.H., Sayers R.R., Howarth A.A., Reinhart W.A., (1936). Urine sulfate determination as a measure of benzene exposure. *J. Ind. Hyg. Toxicol.* 18: 69.
- Yao C.X., Yin X.B., Song J., Li Z.B., Qian W., Zhao Q.G., Luo Y.M., (2008). Characteristics of six elements contents in human hairs in the vicinity of metal smelting factories. *Huan Jing Ke Xue.* 29(5):1376-9.
- Yasuda H., Tsutsui T., (2013). Assessment of infantile mineral imbalances in autism spectrum disorders (ASDs). *Int J Environ Res Public Health.*, Nov 11;10(11):6027-43.
- Zaida F., Chadrame S., Sedki A., Lekouch N., Bureau F., Arhan P., Bouglé D., (2007). Lead and aluminium levels in infants' hair, diet, and the local environment in the Moroccan city of Marrakech. *Sci Total Environ.*, 377:152–158.
- Zelikoff J.T., Li J.H., Hartwig A., Wang X.W., Costa M., Rossman T.G., (1988). Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis.* 9(10):1727-32.
- Zhang S.M., Dai Y.H., Xie X.H., Fan Z.Y., Tan Z.W., Zhang Y.F., (2009). Surveillance of childhood blood lead levels in 14 cities of China in 2004-2006. *Biomed Environ Sci.*, 22:288-296.

- Zhao Y., Wang L., Shen H.B., Wang Z.X., Wei Q.Y., Chen F., (2007). Association between delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) polymorphism and blood lead levels: a meta-regression analysis. *J Toxicol Environ Health A.*, 70(23):1986-94.
- Ziemsen B., Angerer J., Lehnert G., Benkmann H.G., Goedde H.W., (1986). Polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in lead-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health.*, 58(3):245-7.

RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare la Dott.ssa Elisabetta Vallasca, la Dott.ssa Laura Corrias, la Dott.ssa Valeria Bachis, la Dott.ssa Claudia Culigioni, la Dott.ssa Daniela Varrica, la Dott.ssa Elisa Tamburo e la Prof.ssa Carla Calò per l'aiuto nella realizzazione dello studio.

I miei più sentiti ringraziamenti vanno al Prof. Emanuele Sanna per l'aiuto, l'infinita disponibilità e amicizia datami in questi anni del mio Dottorato.

Nicola