

## EFFETTI NEUROTOSSICI DEL MERCURIO: STUDI EPIDEMIOLOGICI REGIONALI

Marika Mariuz (a), Gabriella Trani (a), Paolo de Altì (b), Katia Crovatto (b), Anna Pino (c)

(a) *Direzione centrale salute, politiche sociali e disabilità, Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, Trieste*

(b) *Direzione centrale difesa dell'ambiente, energia e sviluppo sostenibile, Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, Trieste*

(c) *Dipartimento Ambiente e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Il mercurio (Hg) è un inquinante estremamente pericoloso per la salute umana e la sua tossicità si differenzia in funzione della forma chimica di assunzione pur rimanendo il sistema nervoso centrale e il rene i due principali organi bersaglio. Il Hg può essere presente nell'ambiente nelle forme chimiche di mercurio elementare, inorganico e organico.

Il mercurio elementare ( $\text{Hg}^0$ ), liquido e altamente volatile a temperatura ambiente, viene emesso in atmosfera sotto forma di vapore da numerose fonti sia antropiche che naturali. Escludendo le esposizioni di tipo professionale la principale fonte di esposizione umana è rappresentata dai vapori rilasciati dall'amalgama delle otturazioni dentali.

Studi effettuati sull'uomo hanno mostrato che il 70-80% del  $\text{Hg}^0$  inalato viene assorbito dai polmoni e passa nel torrente circolatorio per essere distribuito in tutto il corpo. Il  $\text{Hg}^0$  viene assorbito molto poco attraverso il tratto gastrointestinale (0,04%) probabilmente a causa della sua rapida ossidazione a livello gastrico nel catione mercurico ( $\text{Hg}^{2+}$ ) e del successivo legame con i gruppi sulfidrilici (-SH) delle proteine. Anche l'assorbimento cutaneo è trascurabile (assorbimento pari al 2% dell'assorbimento polmonare). Una volta all'interno dei globuli rossi il  $\text{Hg}^0$  viene rapidamente ossidato a  $\text{Hg}^{2+}$  a opera dell'enzima catalasi e si accumula in questa forma in diversi tessuti primi tra tutti i reni. Grazie all'elevata liposolubilità il  $\text{Hg}^0$  è in grado di attraversare la barriera placentare mentre viene escreto solamente in minima quantità nel latte materno. In seguito a esposizione il tempo di dimezzamento della concentrazione del  $\text{Hg}^0$  nel sangue va dai 3 ai 18 giorni.

Le forme inorganiche del mercurio (IHg) possono avere stato di ossidazione +1 e +2 e derivano dall'unione del Hg con elementi non metallici come il cloro (Cl), lo zolfo (S) e l'ossigeno (O). I composti corrispondenti allo stato di ossidazione +2 (composti mercurici) hanno natura prevalentemente covalente, tendono a idrolizzarsi in soluzione acquosa, volatilizzano con il calore e vengono facilmente ridotti allo stato +1 (composti mercuriosi) e a  $\text{Hg}^0$ . I composti corrispondenti allo stato di ossidazione +1 (composti mercuriosi), nei quali due atomi di Hg sono legati da un legame covalente metallo-metallo a formare lo ione dimero  $\text{Hg}_2^{2+}$ , hanno natura ionica, si formano con minore frequenza e tendono facilmente al disproporzionamento  $\text{Hg}_2^{2+} \rightarrow \text{Hg} + \text{Hg}^{2+}$ .

Gli effetti tossici dovuti all'esposizione al IHg sono stati associati principalmente a esposizioni di tipo lavorativo; nella popolazione generale la principale fonte di esposizione al IHg è costituita dai vapori di  $\text{Hg}^0$  rilasciati dalle otturazioni dentali. Meno del 10% del IHg assunto con la dieta è assorbito dal tratto gastrointestinale.

A livello del sangue il  $\text{Hg}^{2+}$  è trasportato per più del 50% a livello plasmatico e presenta un tempo di dimezzamento pari a circa 28 giorni. Il  $\text{Hg}^{2+}$  non è in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e la placenta mentre viene escreto nel latte materno legato alle albumine e alle caseine sieriche.

Esistono diversi composti organici del mercurio tra i quali il più pericoloso e diffuso è il monometilmercurio o metilmercurio (MeHg). Il MeHg non ha applicazioni industriali ma si

origina dalla metilazione dei cationi  $Hg^{2+}$  a opera di alcuni batteri anaerobi che vivono nel suolo e nei sedimenti marini, lacustri e fluviali.

La maggior parte del MeHg presente nell'ambiente è un prodotto della respirazione dei batteri anaerobi zolfo-riducenti. Nella reazione di metilazione un atomo o un gruppo ionico di un composto del Hg (stato di ossidazione +2) è rimpiazzato da un gruppo metile ( $-CH_3$ ) originando il catione monometilmercurico ( $CH_3Hg^+$ ). Il catione monometilmercurico si combina rapidamente con anioni quali lo ione cloruro ( $Cl^-$ ), lo ione idrossido ( $OH^-$ ), lo ione nitrato ( $NO_3^-$ ) e altri gruppi anionici tipicamente presenti negli acidi umici e fulvici del suolo e dei sedimenti.

La neurotossicità del MeHg è nota soprattutto in seguito ad alcune vicende di intossicazione collettiva del secolo scorso, prima fra tutte quella che interessò negli anni '50-'60 la città di Minamata in Giappone, dove l'assunzione di pesce contaminato dal Hg rilasciato nelle acque della baia da un complesso industriale per la produzione dell'acetaldeide interessò con gravi conseguenze oltre 12.000 persone (Tsubaki & Irukayama, 1977). Le persone intossicate manifestarono disordini neurologici caratterizzati da atassia, parestesia, indebolimento del campo visivo, perdita dell'udito, difficoltà ad articolare le parole, disordine mentale e nei casi più gravi paresi e morte. I bambini nati da donne che avevano consumato pesce contaminato presentarono alla nascita marcate anomalie neurologiche, ritardo mentale e paralisi cerebrale anche in assenza di effetti tossici rilevabili nelle madri. I livelli di Hg misurati nei capelli dei bambini erano compresi tra 10 e 100 ppm, mentre non erano disponibili misurazioni su quelli materni. Un altro episodio di intossicazione dovuta al MeHg avvenne in Iraq tra il 1971 e il 1972. L'esposizione in questo caso avvenne attraverso il consumo di pane preparato utilizzando sementi trattate con il MeHg come fungicida. Anche in questo caso i bambini esposti in utero al MeHg (in particolare durante il terzo trimestre di gestazione) mostrarono la più alta sensibilità manifestando grave ritardo mentale, ipotonia muscolare e ariflessia. In entrambi gli episodi di intossicazione si riscontrò un periodo di latenza (16-38 giorni in Iraq e diversi anni in Giappone) tra l'esposizione al MeHg e la manifestazione dei sintomi neurotossici (Harada, 1995).

Sia il cervello dell'adulto che quello del feto risultano estremamente sensibili alla tossicità del MeHg anche se il sistema nervoso in via di sviluppo risulta essere particolarmente reattivo all'azione di questo tossico. Il MeHg è in grado di attraversare facilmente la barriera emato-encefalica e la barriera placentare attraverso dei carriers aminoacidici. I neonati e i bambini inoltre possono essere esposti al MeHg anche attraverso il latte.

Nell'uomo il 95% del MeHg ingerito attraverso il cibo è assorbito dal tratto gastrointestinale, da qui passa al sistema circolatorio dove viene trasportato per il 90% all'interno dei globuli rossi grazie ai legami con i gruppi  $-SH$  dell'emoglobina e per il 10% nel plasma. Nel corpo quasi tutto il MeHg si trova legato all'albumina, al glutatione (GSH) o alla o alla L-Cisteina (L-Cys) e la formazione di questi complessi sembra essere alla base del maggiore o minore assorbimento del MeHg all'interno dei diversi organi. La formazione di complessi con la D-cisteina (D-Cys) invece ostacola la penetrazione del MeHg all'interno delle cellule endoteliali dei capillari cerebrali mentre la formazione di complessi con la L-metionina (L-Met) la abolisce totalmente. Nei tessuti dei pesci il MeHg si ritrova prevalentemente proprio sotto forma di complessi MeHg-L-Cys, aumentando in questo modo il rischio di contaminazione attraverso il consumo di pesce. Una parte del MeHg penetrato nel cervello viene rapidamente demetilato alla forma inorganica  $Hg^{2+}$ ; i meccanismi con i quali il MeHg esercita la propria neurotossicità non sono stati ancora del tutto compresi, ma sembrano essere correlati alla capacità del catione  $Hg^{2+}$  di legarsi ai gruppi  $-SH$  di enzimi, canali ionici e recettori di membrana causando l'inibizione dei più importanti sistemi antiossidanti cellulari quali l'N-acetil-L-cisteina (NAC), l'acido alfa-lipoico (ALA) e il GSH oltre che la produzione di radicali liberi. All'interno del sistema nervoso centrale il MeHg si accumula all'interno degli astrociti con tempi di dimezzamento estremamente lunghi e causando intense disfunzioni neurologiche.

L'eccitotossicità è un fenomeno di tossicità neuronale conseguente all'esposizione a elevate concentrazioni di glutammato (Glu), il principale neurotrasmettitore eccitatorio del sistema nervoso centrale.

I recettori ionotropici postsinaptici del Glu sono regolati dal N-metil-D-aspartato (NMDA) e una volta attivati dal proprio ligando o da altri fattori lasciano fluire ioni  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  all'interno del neurone e ioni  $\text{K}^+$  al suo esterno. L'eccitotossicità è una delle cause principali delle neurotossicità del MeHg ed esiste una correlazione molto forte tra le aree del cervello caratterizzate da elevata incidenza di danni neuronali indotti dal Hg e le aree con la maggior densità di recettori NMDA. Ad esempio, le cellule cerebellari molecolari e del Purkinje, che vengono risparmiate in condizioni di avvelenamento cronico da Hg, hanno una scarsissima popolazione di recettori NMDA. Al contrario le cellule granulari cerebellari, che sono un bersaglio primario nella neurodegenerazione indotta dal Hg, esprimono un'elevata densità di recettori NMDA. Un'elevata densità di recettori NMDA è presente anche nella corteccia visiva primaria un sito particolarmente coinvolto nel danno indotto dal MeHg.

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

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

Il MeHg inoltre è in grado di alterare la corretta omeostasi dei mitocondri attraverso l'interazione con i gruppi -SH di specifiche proteine coinvolte nella produzione/detossificazione dei radicali liberi.

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

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

L'inibizione dei sistemi antiossidanti cellulari associata alla produzione di radicali liberi sembra essere connessa anche a un aumento del rischio di malattie cardio e cerebro-vascolari.

Il tempo di dimezzamento del MeHg nel sangue è pari a 70 giorni negli individui adulti, a 90 giorni nei bambini e a 46 giorni nelle donne che allattano. Il MeHg viene escreto per il 90% attraverso le feci e in minima parte attraverso le urine e il sudore; l'escrezione del MeHg inoltre segue il ciclo entero-epatico, previa demetilazione a livello intestinale, rallentando in questo modo il processo di eliminazione.

Il MeHg assunto dalla donna in gravidanza attraverso la dieta può causare danni persistenti al sistema nervoso centrale del feto anche in assenza di effetti tossici nelle madri, con danni rilevabili sia durante lo sviluppo embrionale che in età scolare, determinando nel cervello fetale in via di sviluppo un'errata differenziazione, divisione e migrazione neuronale attraverso il legame con i gruppi SH delle tubuline, le principali proteine che costituiscono i microtubuli neuronali. La sensibilità del cervello fetale in via di sviluppo è da 2 a 5 volte maggiore rispetto a quella dell'adulto.

Escludendo le esposizioni di tipo professionale, la principale fonte di esposizione umana al MeHg è costituita dal consumo di pesce, frutti di mare e mammiferi marini. Il MeHg è un composto fortemente tossico e biodisponibile e una volta assorbito dai produttori primari tende a bioaccumularsi nel passaggio attraverso la catena alimentare acquatica. I grandi pesci predatori che occupano i vertici della catena alimentare acquatica risultano essere la fonte più importante di introduzione di MeHg nell'organismo umano.

Nei pesci il MeHg, solubile in acqua, penetra sia attraverso l'alimentazione sia attraverso le branchie accumulandosi nei muscoli assiali. I livelli di Hg nei pesci generalmente aumentano con l'età, le dimensioni e il peso; l'accumulo varia significativamente tra le specie e si assume sia correlato alla dieta, in quanto è maggiore nei pesci di acqua dolce e salata aventi livelli trofici più elevati (Miklavcic *et al.*, 2011). All'interno dello stesso livello trofico, pesci diversi possono differire notevolmente nel contenuto di Hg e la concentrazione di Hg in un pesce non può essere stimata in modo affidabile sulla base delle concentrazioni determinate nelle altre matrici ambientali quali ad esempio l'acqua e i sedimenti. I tempi di dimezzamento del MeHg, se gli organismi acquatici esposti vengono spostati in aree non contaminate, vanno da 6 mesi per i mitili (*Mytilus*) a 2 anni per il luccio (*Esox lucius*) (Majori *et al.*, 1967).

L'esposizione al MeHg attraverso il consumo di pesce differisce notevolmente dall'avvelenamento acuto da MeHg. Attraverso il consumo di pesce l'organismo umano è esposto a concentrazioni estremamente basse di MeHg per periodi di tempo estremamente lunghi. Da molti anni si discute relativamente ai benefici e ai rischi derivanti dal consumo di pesce durante la gravidanza.

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

Sebbene i diversi studi effettuati a livello internazionale (Grandjean *et al.*, 1998; Debes *et al.*, 2006; Hibbeln *et al.*, 2007; Davidson *et al.*, 2008a; Davidson *et al.*, 2008b; Holmes *et al.*, 2009; Suzuki *et al.* 2010; Bose-O'Reilly *et al.*, 2010; Llop *et al.*, 2012; Strain *et al.*, 2015; Van Wijngaarden *et al.*, 2017; Vejrup *et al.*, 2018) non abbiano portato a risultati univoci relativi ai possibili effetti neurologici causati dall'esposizione prolungata a basse dosi di MeHg, l'Agenzia per la protezione dell'ambiente americana (*Environmental Protection Agency*, EPA) ha stabilito per il MeHg un valore di assunzione massimo quotidiano pari a 0,1 µg/kg di peso corporeo (EPA, 1997), il *Joint Expert Committee on food Additives* (JEFCA) della FAO/WHO (*Food and Agriculture Organization/World Health Organization*) ha stabilito, per la protezione del feto dagli effetti neurotossici, un valore provvisorio di assunzione massimo settimanale (*Provisional Tolerable Weekly Intake*, PTWI) pari a 1,6 µg/kg di peso corporeo (corrispondente a 0,23 µg/kg al giorno) (WHO, 2004), mentre gli esperti della *European Food Safety Authority* (EFSA) hanno indicato un valore di assunzione massimo settimanale (TWI) più basso, pari a 1,3 µg/kg. La

differenza tra i valori di assunzione tollerabili riflette differenti presupposti nella valutazione del rischio, oltre che metodologie diverse nell'analisi dei dati e nei fattori di incertezza utilizzati (NRC, 2000).

L'EPA ha anche calcolato attraverso un modello statistico e utilizzando un fattore di incertezza pari a 10, il *Benchmark Dose Level* (BMDL) che definisce il *cut-off* tra presunta innocuità e tossicità; come valori di cut-off sono stati scelti una concentrazione di mercurio totale (THg) pari a 1,2 µg/g nei capelli materni e una concentrazione di THg pari a 5,8 µg/L nel sangue del cordone.

Il valore BMDL rappresenta il limite inferiore di confidenza al 95% della dose che aumenterebbe la probabilità che il 5% della popolazione ottenesse un punteggio anormale al Boston Naming Test, un test neuropsicologico per i bambini in età scolare che valuta l'abilità di scegliere la parola appropriata per l'espressione di un particolare concetto. Le concentrazioni di THg misurate nei capelli vengono solitamente utilizzate come *Provisional tolerable weekly intake* di esposizione principale negli individui per i quali si possano escludere esposizioni occupazionali o ambientali e per i quali la principale fonte di esposizione sia costituita dal MeHg assunto attraverso la dieta. Negli individui che consumano pesce circa l'80% del Hg presente nei capelli è sotto forma di MeHg, di conseguenza misurando la concentrazione di THg si ottiene una buona stima dell'effettiva quantità di MeHg assorbito dal follicolo del capello dal torrente circolatorio.

La concentrazione di THg presente nei campioni di capelli riflette la concentrazione di MeHg presente nel sangue nel momento in cui il capello si è formato. Dato che l'emivita del Hg nel sangue corrisponde a circa 50 giorni, la concentrazione di THg nel sangue costituisce una misura di esposizione recente mentre la concentrazione di THg nei capelli permette di ricapitolare l'esposizione di diversi mesi addietro. La concentrazione di Hg misurata nel sangue del cordone costituisce invece un ottimo *biomarker* per valutare l'esposizione al MeHg nel feto; il MeHg viene trasportato attivamente attraverso la placenta e il Hg presente nel sangue del cordone è quasi totalmente nella forma di MeHg. Considerato che il cordone ombelicale si sviluppa prevalentemente nel corso del secondo e del terzo trimestre di gestazione, la concentrazione di MeHg nel sangue del cordone può essere considerata come un indicatore dell'esposizione fetale media al Hg durante il terzo trimestre.

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

Considerando che la concentrazione media di MeHg nel pesce marino e d'acqua dolce è pari a circa 0,2 mg/kg una donna di 70 kg potrebbe consumare all'incirca 35 g di pesce al giorno ovvero approssimativamente una porzione (150 g) di pesce a settimana.

La *Food and Drug Administration* (FDA) ed EPA hanno inoltre emanato una serie di raccomandazioni destinate sia alle donne in età fertile, con lo scopo di limitare il consumo di pesce evitando in particolare il consumo dei pesci predatori al vertice della catena alimentare acquatica, che alle donne in gravidanza, con lo scopo di evitare esposizioni potenzialmente dannose per il feto (US-FDA, 2001; HHS, 2004).

Pur rimanendo dell'incertezza sul livello minimo di esposizione prenatale al MeHg che sia causa di effetti tossici rilevabili sul sistema nervoso fetale, la letteratura disponibile fornisce consistenti evidenze della neurotossicità di esposizioni prenatali al MeHg corrispondenti a concentrazioni di THg nei capelli materni comprese tra 10 e 20 ppm.

Il Golfo di Trieste è una delle aree maggiormente soggette ad inquinamento da Hg dell'intero Mediterraneo (Covelli *et al.*, 2011; Emili *et al.*, 2011). Le cause di questa contaminazione sono da attribuirsi alla presenza nella vicina città slovena di Idrija dei giacimenti minerari di cinabro,

il minerale naturale del mercurio che chimicamente è un solfuro di mercurio (stato di ossidazione +2) con formula cristallochimica HgS.

Per anni le acque del torrente Idrijca, che attraversa la città di Idrija, hanno drenato i suoli mercuriferi del distretto minerario confluendo poi nel fiume Isonzo, il quale ha trasportato i sedimenti contaminati fino alla propria foce nel Golfo di Trieste. Il fiume Isonzo costituisce il principale apporto di acqua dolce al golfo di Trieste e il sistema Isonzo-Idrijca rappresenta l'anello di congiunzione tra la fonte di contaminazione e le sedi di accumulo parziale, ovvero l'area centrale del Golfo di Trieste, e finale, ovvero la Laguna di Grado e Marano (Kotnik *et al.*, 2005).

L'attività estrattiva della seconda più importante miniera di Hg al mondo si è protratta per circa 500 anni riducendosi gradualmente fino alla definitiva chiusura nel 1996. Complessivamente sono state scavate più di 5 milioni di tonnellate di roccia mineralizzata a Hg, essenzialmente HgS ma anche Hg nativo (Mlakar, 1974).

Sebbene la provenienza del Hg nell'area di Idrija sia legata al giacimento, la maggior parte del metallo rinvenibile nei suoli, nei sedimenti superficiali e lungo le sponde del fiume Isonzo e del suo affluente Idrijca è Hg rimobilizzato dall'attività mineraria, rilasciato nell'atmosfera dai condotti di ventilazione della miniera, dai camini dell'impianto di "arrostimento" della roccia mineralizzata e successivamente ricaduto al suolo con le precipitazioni. Gli stessi residui di lavorazione del minerale sono stati abbandonati in prossimità degli impianti lungo le sponde del corso d'acqua. Si stima che solo il 73% delle complessive 144.000 tonnellate di metallo estratto sia stato recuperato (Gosar *et al.*, 1997), mentre la restante parte sia stata dissipata nell'ambiente circostante. Gli apporti isotopici, dispersi prevalentemente verso occidente a causa del sistema di circolazione antiorario delle correnti che caratterizzano l'Adriatico settentrionale, hanno contribuito ad incrementare le concentrazioni di Hg non solo nei sedimenti ma anche nella componente biotica delle adiacenti lagune di Marano e Grado (Brambati, 1997).

In aggiunta, lo sversamento di Hg nel fiume Aussa immissario della Laguna di Marano, determinato dall'impianto cloro-soda del complesso industriale di Torviscosa (UD), è iniziato nel 1949 e si è protratto fino al 1984 quando sono stati adottati metodi di recupero e depurazione adeguati (Daris *et al.*, 1993). Per tali ragioni, l'ambiente lagunare risulta aver subito, rispetto al Golfo di Trieste, una duplice contaminazione con modalità e tempi differenti in relazione alle due sorgenti menzionate.

Inizialmente, a causa della diffusa presenza di mercurio sulle matrici ambientali, la Laguna di Grado e Marano era stata dichiarata, con Decreto ministeriale 468 del 18 settembre 2001, "Sito d'intervento di bonifica di interesse nazionale". Successivamente, a seguito degli esiti della caratterizzazione dei sedimenti, con Decreto del Ministro dell'ambiente e della tutela del territorio e del mare 222 del 12 dicembre 2012, il perimetro del sito "Laguna di Marano e Grado" è stato ridefinito escludendo dalla precedente perimetrazione l'intero perimetro lagunare.

Nel 1999 un piccolo studio di coorte di nuovi nati (Coorte del Nord Adriatico) condotto dall'Università degli Studi di Udine ha esplorato la relazione tra l'esposizione prenatale al MeHg attraverso il consumo di pesce in gravidanza e lo sviluppo neurologico dei bambini nati tra il 1999 e il 2001 in 17 Paesi del Friuli Venezia Giulia (FVG) centrale e meridionale.

Furono arruolate 243 coppie mamma-bambino, 203 delle quali provenivano da 3 Paesi situati nella laguna (Grado, Marano Lagunare e Carlino) caratterizzati da un'economia basata sulla pesca mentre le restanti coppie provenivano da 14 Paesi situati nell'entroterra.

Le concentrazioni di THg e di MeHg vennero misurate nei campioni di capelli e di latte materno prelevati a due mesi dal parto e nei capelli dei bambini prelevati a 18 mesi, mentre le informazioni relative alla storia medica e occupazionale delle donne arruolate, alle caratteristiche socio-demografiche e allo stile di vita della famiglia, alla gravidanza, al parto e allo stato di salute del neonato furono raccolte attraverso un questionario strutturato somministrato alle donne arruolate nello studio.

Il consumo di pesce fresco locale e non, in scatola e surgelato durante la gravidanza e l'allattamento e il consumo di pesce da parte dei bambini a 18 mesi vennero indagati attraverso la somministrazione di un questionario semi-quantitativo che permise di rilevare il tipo, la frequenza e la provenienza del pesce fresco consumato dalle mamme e dai bambini nel periodo estivo e invernale. Lo sviluppo neuropsicologico di 52 bambini nati all'interno della coorte venne valutato a 18 mesi di età attraverso la somministrazione del *Denver Developmental Screening Test II* (DDST II).

Le concentrazioni di THg misurate nei campioni di capelli delle mamme risultarono direttamente associate con il consumo di pesce locale e raggiungevano livelli prossimi o superiori ai 10 ppm; inoltre, dopo aggiustamento per diversi potenziali fattori confondenti, il punteggio relativo alla scala di valutazione dello sviluppo motorio fine-adattivo del DDST II risultò inversamente associato alle concentrazioni di THg misurate nei campioni di capelli materni (Barbone *et al.*, 2004).

L'accertamento della presenza di deficit neurocomportamentali associati all'esposizione pre e postnatale al Hg, così come accade anche per altri contaminanti chimici ambientali, è molto complesso e richiede periodi di osservazione estremamente lunghi in quanto gli effetti neurotossici possono manifestarsi anche in età scolare e/o adolescenziale così come emerso da due importanti studi di coorte avviati negli anni Ottanta alle isole Faroe e alle isole Seychelles (Grandjean *et al.*, 1998; Myers *et al.*, 2003).

Proprio per questo motivo lo sviluppo neuropsicologico di 154 (63,3%) bambini nati all'interno della coorte del Nord Adriatico, arruolata dall'Università di Udine tra il 1999 e il 2001, venne rivalutato al raggiungimento dei 7/9 anni di età, attraverso la somministrazione della "Wechsler Intelligence Scale for Children" (WISC III); in occasione della valutazione neuropsicologica a ciascun bambino venne prelevato un campione di capelli mentre, attraverso un questionario auto-compilato da parte delle mamme, furono aggiornate le informazioni relative allo stato socio-economico, alla storia medica e alle abitudini alimentari della famiglia, allo stato di salute e alla dieta del bambino con particolare attenzione alla rilevazione del consumo di pesce.

Le concentrazioni di THg misurate nei campioni di capelli dei bambini a 7 anni risultarono abbastanza correlate con le concentrazioni di THg misurate nei capelli materni prelevati in occasione del parto (coefficiente di correlazione di Spearman:  $r_s = 0,35$ ;  $p < 0,0001$ ) e fortemente correlate al consumo di pesce da parte dei bambini ( $r_s = 0,50$ ,  $p < 0,0001$ ). Dopo aggiustamento per diversi potenziali fattori confondenti i bambini nati da madri con concentrazioni di THg nei capelli superiori o uguali a 2000 ng/g mostrarono punteggi di Quoziente Intellettivo (QI) totale, verbale e di performance di 4-5 punti inferiori rispetto ai bambini nati da donne con concentrazioni di THg inferiori ma queste differenze non risultarono statisticamente significative.

Il consumo di pesce fresco in gravidanza risultò positivamente associato con i punteggi di QI completo e di performance ottenuti dai bambini ma non con i punteggi di QI verbale. I livelli relativamente bassi di Hg trovati nei campioni biologici delle mamme e dei bambini arruolati nello studio non fornirono prove di un'esposizione elevata ed estesa al Hg nella popolazione in esame e non permisero di sviluppare raccomandazioni sul consumo di pesce in gravidanza ma indicarono che potrebbe essere auspicabile mantenere livelli di concentrazione di THg nei capelli  $< 2000$  ng/g (Deroma *et al.*, 2013).

Nel 2006 l'Università degli Studi di Udine in collaborazione con i ricercatori di Slovenia Croazia e Grecia ha dato avvio, nell'ambito del progetto di ricerca internazionale PHIME (*Public health impact of long term low level mixed element exposure in susceptible population strata*), a uno studio di coorte prospettico che ha permesso di arruolare e monitorare 2189 coppie madre-bambino residenti in aree costiere del Mediterraneo potenzialmente esposte attraverso il consumo di pesce al MeHg. Furono reclutate quattro diverse coorti di nuovi nati: nella città di Trieste, nella città di Ljubljana in Slovenia, nella città di Rijeka in Croazia e in quattro isole greche dell'Egeo.

L'obiettivo principale dello studio era quello di valutare la relazione tra l'esposizione prenatale a basse dosi di MeHg attraverso l'alimentazione materna ricca di pesce e lo sviluppo neuropsicologico dei bambini (Valent *et al.*, 2013a). L'arruolamento della coorte italiana prese avvio nell'aprile del 2007 presso l'Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) materno infantile Burlo Garofolo di Trieste e si concluse nel marzo del 2009.

I soggetti eleggibili per lo studio furono reclutati da una popolazione di donne gravide residenti in FVG da almeno cinque anni, maggiorenni, prive di patologie che potessero in qualche modo influire sul normale sviluppo neurologico dei loro bambini, aventi gravidanze singole e a decorso fisiologico. Furono arruolate 900 donne gravide tra la 20<sup>a</sup> e la 22<sup>a</sup> settimana di gestazione e di queste 767 risultarono ancora all'interno dello studio al momento del parto.

I parti avvennero tra il luglio del 2007 e l'agosto del 2009. Lo sviluppo neurologico e psicologico dei bambini nati all'interno delle quattro coorti fu valutato a 18±2 mesi di età attraverso la somministrazione del *Bayley test Scales of Infant and Toddler Development-third edition* (BSID III) lo strumento di valutazione di riferimento internazionale relativamente allo sviluppo cognitivo, linguistico, motorio, socio-emotivo e comportamentale dei bambini da 1 a 42 mesi. Le valutazioni neuropsicologiche, che hanno riguardato il livello di sviluppo cognitivo, di linguaggio, motorio e socio comportamentale raggiunto dai bambini furono condotte tra gennaio 2009 e febbraio 2011.

Dopo aver escluso i bambini nati pretermine (< 37<sup>a</sup> settimana di gestazione), quelli con malformazioni congenite o gravi problemi perinatali, quelli con gravi problemi di salute che potevano comprometterne lo sviluppo neurologico il BSID III fu somministrato a 632 bambini.

In questo studio relativamente all'esposizione prenatale fu scelto di misurare la concentrazione di THg e MeHg nei campioni di capelli, di sangue venoso e di urina delle donne arruolate mentre per quanto riguarda l'esposizione postnatale fu misurata la concentrazione di THg e di MeHg nei campioni di sangue del cordone e di latte. Oltre al Hg furono presi in considerazione anche altri metalli pesanti che possono essere assunti con la dieta (piombo, cadmio, arsenico, manganese, rame, zinco e selenio), ma anche fattori nutrizionali ritenuti positivi per la crescita e lo sviluppo quali gli acidi grassi polinsaturi (*Poly-Unsaturated Fatty Acids*, PUFA) di cui è ricco il pesce. Nel corso dell'indagine non furono trascurate altre variabili che possono influire sulle funzioni neurocognitive dei bambini quali l'ambiente familiare, lo stato socioeconomico delle famiglie e il Quoziente Intellettivo (QI) materno (Valent *et al.*, 2013a).

I punteggi compositi ottenuti dai bambini nel test di sviluppo neurologico furono messi in relazione con le abitudini alimentari e lo stile di vita materno, eventuali esposizioni ambientali e/o occupazionali e soprattutto con le concentrazioni dei contaminanti rilevate nei campioni biologici analizzati. I risultati della coorte italiana hanno mostrato che durante la gravidanza le donne arruolate avevano consumato in media meno di due porzioni di pesce a settimana. Le concentrazioni medie di Hg misurate nei campioni biologici risultarono abbastanza basse (THg nei capelli materni: 1062 ng/g; THg nel sangue del cordone: 5,6 ng/g; THg nel latte: 0,3 ng/g) e moderatamente correlate con il consumo di pesce riferito dalle donne. La concentrazione di PUFA omega-3 misurata nel sangue venoso materno risultò bassamente correlata con il consumo di pesce riferito dalle donne. Dopo aggiustamento per i potenziali fattori di confondimento non emersero evidenze che il Hg avesse determinato effetti avversi sul neurosviluppo dei bambini mentre i punteggi compositi ottenuti dai bambini nelle cinque scale di valutazione del BSID III risultarono significativamente correlati con i fattori socioeconomici e con lo stile di vita della famiglia di appartenenza (Valent *et al.*, 2013b).

Attraverso una metanalisi eseguita su tutte e quattro le coorti mediterranee, si sono messi in relazione i punteggi compositi e scalari ottenuti dai bambini al BSID III e le concentrazioni di THg misurate nei campioni biologici. Le concentrazioni di THg misurate nei campioni di capelli materni e nel sangue del cordone sono risultate inversamente associate con il livello di sviluppo



motorio fine e grossolano ottenuto dai bambini; non sono invece emerse associazioni tra le concentrazioni di THg nei diversi campioni biologici considerati e i punteggi ottenuti dai bambini nella Scala Cognitiva e del Linguaggio. Le concentrazioni medie di THg misurate nei campioni di capelli, sangue del cordone e latte delle donne arruolate nelle altre tre coorti mediterranee furono rispettivamente: 381 ng/g, 2,1 ng/g e 0,3 ng/g nella coorte slovena; 968 ng/g, 5,1 ng/g e 0,3 ng/g nella coorte croata; 1408,5 ng/g, 7,7 ng/g e 1,7 ng/g nella coorte greca (Barbone *et al.*, 2019).

Il neurosviluppo di 470 dei bambini nati all'interno della coorte italiana è stato rivalutato all'età di 40 mesi; anche in questo caso l'obiettivo è stato quello di indagare i possibili effetti dell'esposizione a basse dosi di Hg attraverso l'alimentazione materna, in particolare attraverso il consumo di pesce, sullo sviluppo cognitivo dei bambini. In questo caso si è scelto di tenere conto anche dei potenziali effetti benefici connessi al consumo di pesce prendendo in considerazione l'esposizione pre e postnatale al selenio (Se) e il ruolo di antagonista nei confronti dei metalli pesanti svolto da questo elemento essenziale. Il punteggio cognitivo composito ottenuto dai bambini al BSID III è stato messo in relazione con le concentrazioni di THg e di Se misurate nel sangue cordonale, nel sangue venoso prelevato nel corso della gravidanza alle donne arruolate e nel latte materno.

Dopo aggiustamento per i potenziali fattori di confondimento non sono emerse delle chiare associazioni tra l'esposizione pre e postnatale al Hg e il neurosviluppo dei bambini esaminati, sebbene siano emerse alcune evidenze relative al ruolo antagonista del Se nei confronti dell'azione neurotossica esercitata dal Hg. Le possibili interazioni tra Se e Hg necessitano di ulteriori approfondimenti (Castriotta *et al.*, 2020).

Ad oggi gli studi scientifici che hanno indagato come la genetica possa influenzare la neurotossicità associata all'esposizione al Hg sono stati pochi e non hanno portato a risultati consistenti (Llop *et al.*, 2015). Alcuni studi effettuati sulla "Drosophila" hanno evidenziato come l'espressione ectopica del gene CYP6G1 conferisca resistenza all'azione neurotossica esercitata dal MeHg. Nell'uomo la sottofamiglia del gene CYP3A, omologo umano del gene CYP6G1, è costituita da quattro geni distinti (CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 e CYP3A43) localizzati nel cromosoma 7; tali geni, prevalentemente espressi nei tessuti di fegato, reni, intestino e placenta, sono responsabili del metabolismo di diversi xenobiotici e sono essenziali per la sintesi degli acidi grassi, molecole fondamentali per lo sviluppo del sistema nervoso. L'espressione dei geni CYP3A negli altri tessuti e in particolare a livello cerebrale è ad oggi poco conosciuta nonostante ci siano delle evidenze che i geni di questa sottofamiglia, in particolare il gene CYP3A7, siano espressi nel cervello fetale in via di sviluppo (Pavek & Dvorak, 2008). Considerato che il processo di demetilazione del MeHg costituisce il fattore maggiormente limitante alla sua eliminazione dal corpo umano, si è indagato il potenziale ruolo dei geni CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 e CYP3A43 nel metabolismo di questo tossico.

Nel 2017 Llop *et al.*, hanno analizzato i dati relativi a 6 differenti studi di corte internazionali, tra cui anche le coorti mediterranee PHIME italiana e greca precedentemente descritte, allo scopo di indagare se e come le varianti polimorfiche della sottofamiglia del gene CYP3A siano in grado di influenzare l'associazione tra l'esposizione prenatale al MeHg e i punteggi ottenuti dai bambini alle rilevazioni neuropsicologiche. Sono stati analizzati i dati relativi a 2639 bambini, 573 bambini italiani, 281 bambini greci, 1160 bambini appartenenti a una coorte seychellese (Strain *et al.*, 2015) e 625 bambini spagnoli appartenenti alla coorte INMA (Guxens *et al.*, 2012). I dati raccolti, analizzati prima per ciascun paese e successivamente combinati attraverso l'approccio della metanalisi, hanno evidenziato come l'associazione tra l'esposizione prenatale al MeHg e lo sviluppo neuropsicologico potrebbe essere influenzata, in particolare nei bambini appartenenti alle coorti mediterranee, dai polimorfismi a carico dei geni CYP3A5 e CYP3A7 (Llop *et al.*, 2017). Saranno necessari ulteriori studi per indagare e comprendere meglio tale associazione.

## Bibliografia

- Barbone F, Rosolen V, Mariuz M, Parpinel M, Casetta A, Sammartano F, Ronfani L, Vecchi Brumatti L, Bin M, Castriotta L, Valent F, Latesha Little D, Mazey D, Snoj Tratnik J, Miklavcic Visnjevec A, Kodric J, Sofianou K, Spiric Z, Krsnik M, Osredkar J, Neubauer D, Kodric J, Stropnik S, Prpic I, Petrovic O, Vlastic-Cicvaric I, Horvat M. Prenatal mercury exposure and child neurodevelopment outcomes at 18 months: results from the mediterranean PHIME Cohort. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2019;222:9-21.
- Barbone F, Valent F, Pisa F, Daris F, Fajon V, Gibicar D, Logar M, Horvat M. Prenatal low level methyl mercury exposure and child development in an Italian coastal area. *Seychelles Medical & Dental Journal* 2004;7:149-54.
- Bose-O'Reilly S, McCarty KM, Steckling N, Lettmeier B. Mercury exposure and children's health. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care* 2010;40:86-215.
- Brambati A. *Metalli pesanti nelle lagune di Marano e Grado. Piano di studi finalizzato all'accertamento di sostanze persistenti nelle Lagune di Marano e Grado e al loro risanamento*. Trieste: Regione Friuli Venezia Giulia - Direzione Regionale dell'Ambiente, Servizio dell'Idraulica; 1997. p.175.
- Castriotta L, Rosolen V, Biggeri A, Ronfani L, Catelan D, Mariuz M, Bin M, Vecchi Brumatti L, Horvat M, Barbone F. The role of mercury, selenium and the Se-Hg antagonism on cognitive neurodevelopment: A 40-month follow-up of the Italian mother-child PHIME cohort. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2020;230:113604.
- Covelli S, Emili A, Acquavita A, Koron N, Faganeli J. Benthic biogeochemical cycling of mercury in two contaminated northern adriatic coastal lagoons. *Continental Shelf Research* 2011;31:1777-89.
- Daris F, Piani C, Mattassi G, Brisotto R. Distribuzione del mercurio in sedimenti e prodotti ittici delle Lagune di Grado e Marano. In: Regione autonoma Friuli Venezia Giulia (Ed.). *Atti del Convegno: il mercurio nelle lagune di Grado e Marano. Aspetti Igienico-Sanitari*. Trieste: FVG; 1993. p. 24-45.
- Davidson PW, Sloane-Reeves J, Myers GJ, Hansen ON, Huang LS, Georger LA, Cox C, Thurston SW, Shamlaye CF, Clarkson TW. Association between prenatal exposure to methylmercury and visuospatial ability at 10.7 years in the Seychelles child development study. *Neurotoxicology* 2008a;29:453-9.
- Davidson PW, Strain JJ, Myers GJ, Thurston SW, Bonham MP, Shamlaye CF, Stokes-Riner A, Wallace JM, Robson PJ, Duffy EM, Georger LA, Sloane-Reeves J, Cernichiari E, Canfield RL, Cox C, Huang LS, Jancius J, Clarkson TW. Neurodevelopmental effects of maternal nutritional status and exposure to methylmercury from eating fish during pregnancy. *Neurotoxicology* 2008b;29:767-75.
- Debes F, Budtz-Jørgensen E, Weihe P, White RF, Grandjean P. Impact of prenatal methylmercury exposure on neurobehavioral function at age 14 years. *Neurotoxicology and Teratology* 2006;28:536-47.
- Deroma L, Parpinel M, Tognin V, Channoufi L, Tratnik J, Horvat M, Valent F, Barbone F. Neuropsychological assessment at school-age and prenatal low-level exposure to mercury through fish consumption in an Italian birth cohort living near a contaminated site. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2013;216:486-93.
- Emili A, Koron N, Covelli S, Faganeli J, Acquavita A, Predonzani S, De Vittor C. Does anoxia affect mercury cycling at the sediment-water interface in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea)? Incubation experiments using benthic flux chambers. *Applied Geochemistry* 2011;26:194-204.
- EPA (Environmental Protection Agency). *Mercury study report to congress*. Vol. I: executive summary. Washington, DC: US EPA, office of air quality planning and standards, and office of research and development; 1997. (EPA-452/R-97-003). Disponibile all'indirizzo: <https://www3.epa.gov/airtoxics/112nmerc/volume1.pdf>; ultima consultazione 20 giugno 2022.
- Gosar M, Pirc S, Bidovec M. Mercury in the Idrijca River sediments as a reflection of mining and smelting activities of the Idrica mercury mine. *Journal of Geochemical Exploration* 1997;58:125-31.

- Grandjean P, Weihe P, White RF, Debes F. Cognitive performance of children prenatally exposed to “safe” levels of methylmercury. *Environmental Research* 1998;77:165-72.
- Guxens M, Ballester F, Espada M, Fernandez MF, Grimalt JO, Ibarluzea J, Olea N, Rebagliato M, Tardon A, Torrent M, Vioque J, Vrijheid M, Sunyer J. Cohort profile: the INMA-INfancia y Medio Ambiente (environment and childhood) project. *International Journal of Epidemiology* 2012;41:930-40.
- Harada M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Critical Reviews in Toxicology* 1995;25:1-24.
- Henderson J, Myers GJ, Davidson PW. Prenatal exposure to methyl mercury from fish consumption and polyunsaturated fatty acids: associations with child development at 20 months of age in an observational study in the Republic of Seychelles. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2015;101:530-7.
- HHS (United States Department of Health and Human Services). *What you need to know about mercury in fish and shellfish*. Washington, DC: EPA-FDA; 2004 (Document No. EPA-823-R-04-005).
- Hibbeln JR, Davis JM, Steer C, Emmett P, Rogers I, Williams C, Golding J. Maternal seafood consumption in pregnancy and neurodevelopmental outcomes in childhood (ALSPAC study): an observational cohort study. *Lancet* 2007;369:578-85.
- Holmes P, James KAF, Levy LS. Is low-level environmental mercury exposure of concern to human health? *Science of the Total Environment* 2009;408:171-82.
- Kotnik J, Horvat M, Dizdarevic T. Current and past mercury distribution in air over the Idrija Hg mine region, Slovenia. *Atmospheric Environment* 2005;39:7570-79.
- Llop S, Ballester F, Broberg K. Effect of gene-mercury interaction on mercury toxicokinetics and neurotoxicity. *Early Life Environmental Health* 2015;2:179-94.
- Llop S, Guxens M, Murcia M, Lertxundi A, Ramon R, Riaño I, Rebagliato M, Ibarluzea J, Tardon A, Sunyer J, Ballester F, INMA Project. Prenatal exposure to mercury and infant neurodevelopment in a multicenter cohort in Spain: study of potential modifiers. *The American Journal of Epidemiology* 2012; 175:451-65.
- Llop S, Tran V, Ballester F, Barbone F, Sofianou-Katsoulis A, Sunyer J, Engstrom K, Alhamdow A, Love TM, Watson GE, Bustamante M, Murcia M, Iniguez C, Shamlaye CF, Rosolen V, Mariuz M, Horvat M, Tratnik JS, Mazej D, van Wijngaarden E, Davidson PW, Myers GJ, Rand MD. CYP3A genes and the association between prenatal methylmercury exposure and neurodevelopment. *Environment International* 2017;105:34-42.
- Majori L, Nedoclan G, Modonutti GB. Inquinamento da mercurio nell'Alto Adriatico. *Acqua e Aria* 1967;3:164-72.
- Miklavcic A, Stibilj V, Heath E, Polak T, Snoj Tratnik J, Klauz J. Mercury selenium, PCB's and fatty acids in fresh and canned fish available on the Slovenian market. *Food Chemistry* 2011;124:711-20.
- Mlakar I. Basic parameters of the production of the Idrija Mercury Mine through the centuries to today (in Slovene). *Idrijski razdgladi* 1974;19(3-4):1-40.
- NRC (National Research Council). *Toxicological effects of Methylmercury*. Washington, DC: National Academy Press; 2000. DOI: 10.17226/9899.
- Pavek P, Dvorak Z. Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Current Drug Metabolism* 2008;9:129-43.
- Strain JJ, Yeates AJ, van Wijngaarden E, Thurston SW, Mulhern MS, McSorley EM, Watson GE, Love TM, Smith TH, Yost, K, Harrington D, Shamlaye CF, Henderson J, Myers GJ, Davidson PW. Prenatal exposure to methylmercury from fish consumption and polyunsaturated fatty acids: associations with child development at 20 months of age in an observational study in the Republic of Seychelles. *American Journal of Clinical Nutrition* 2015;101:530-7.

- Suzuki K, Nakai K, Sugawara T, Nakamura T, Ohba T, Shimada M, Hosokawa T, Okamura K, Sakai T, Kurokawa N, Murata K, Satoh C, Satoh H. Neurobehavioral effects of prenatal exposure to methylmercury and PCBs, and seafood intake: neonatal behavioral assessment scale results of Tohoku study of child development. *Environmental Research* 2010;110:699-704.
- Tsubaki T, Irukayama K. *Minamata disease: methylmercury poisoning in Minamata and Niigata*. Amsterdam: Kodansha/Elsevier Scientific; 1977.
- US-FDA (United States Food and Drug Administration). *Consumer advisory: an important message for pregnant women and women of childbearing age who may become pregnant about the risks of mercury in fish*. Silver Spring, MD: US-FDA; 2001.
- Valent F, Horvat M, Sofianou-Katsoulis A, Spiric Z, Mazej D, Little D, Prasouli A, Mariuz M, Tamburlini G, Nakou S, Barbone F. Neurodevelopmental effects of low-level prenatal mercury exposure from maternal fish consumption in a mediterranean cohort: study rationale and design. *Journal of Epidemiology* 2013a;23:146-52.
- Valent F, Mariuz M, Bin M, Little D, Mazej D, Tognin, V, Tratnik J, McAfee AJ, Mulhern MS, Parpinel M, Carozzi M, Horvat M, Tamburlini G, Barbone F. Associations of prenatal mercury exposure from maternal fish consumption and polyunsaturated fatty acids with child neurodevelopment: a prospective cohort study in Italy. *Journal of Epidemiology* 2013b;23:360-70.
- Van Wijngaarden E, Thurston SW, Myers GJ, Harrington D, Cory-Slechta DA, Strain JJ, Watson GE, Zareba G, Love T, Henderson J, Shamlaye CF, Davidson PW. Methyl mercury exposure and neurodevelopmental outcomes in the Seychelles child development study main cohort at age 22 and 24 years. *Neurotoxicology and Teratology* 2017;59:35-42.
- Vejrup K, Brandlistuen RE, Brantsæter AL, Knutsen HK, Caspersen IH, Alexander J, Lundh T, Meltzer HM, Magnus P, Haugen M. Prenatal mercury exposure, maternal seafood consumption and associations with child language at five years. *Environment International* 2018;110:71-79.
- WHO (World Health Organization). *Sixty-first report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA) 133*. Geneva: WHO; 2004. (Technical Report Series 922).