

P. Apostoli, S. Catalani

Meccanismi di azione per gli elementi metallici e loro specie classificati cancerogeni R45 ed R49 dall'UE - Parte 2

Dipartimento di Medicina Sperimentale e Applicata, Sezione di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale. Università degli Studi di Brescia

RIASSUNTO. Gli elementi metallici o loro specie classificati R45 ed R49 sono come noto arsenico, berillio, cadmio, cobalto, cromo e nichel. Essi sono prevalentemente deboli mutageni e non formano addotti con il DNA.

L'effetto cancerogeno degli elementi cancerogeni dipende dalla loro abilità di penetrare nella cellula e di interagire con i siti target; caratteristiche determinanti risultano essere pertanto lo stato di ossidazione, la carica, la solubilità, le proprietà di legame, la struttura stereochimica e la possibilità di interagire con altri xenobiotici.

I meccanismi non genotossici responsabili della cancerogenicità degli elementi metallici possono essere ricondotti a stress ossidativo, inibizione dei meccanismi di riparazione del DNA, alterazione dei segnali di trasduzione e a modificazione dell'espressione genica. Viene sottolineato come ogni specie metallica può esercitare però distinte interazioni molecolari alcune delle quali saranno presentate e discusse in questo contributo, nel quale si sottolinea anche l'importanza della possibile interazione tra elementi metallici ed altri cancerogeni organici.

Parole chiave: elementi metallici e specie R45 ed R49, meccanismi di azione diretti ed indiretti, cancerogenesi.

ABSTRACT. *MECHANISMS OF ACTION FOR METALLIC ELEMENTS AND THEIR SPECIES CLASSIFIED CARCINOGEN R 45 AND R 49 BY EU.* In this paper we will deal with mechanism of carcinogenic action of metallic elements and their species (arsenic, beryllium, cadmium, cobalt, chromium, nickel) identified by EU as carcinogen R 45 or R 49.

The carcinogenic effect depended on the ability of to penetrate the cell and interacted with the target sites, therefore the state of oxidation, charging, the solubility, type of binding, stereochemistry and the ability to interact with other xenobiotics were crucial.

The carcinogenic metallic elements classified R45 or R49 are essentially weak mutagen and do not form adducts with the DNA as initial step of their carcinogenicity

In spite of the wide range of metallic elements physicochemical properties, some common general mechanisms of carcinogenesis emerge: from the induction of oxidative stress, to inhibition of DNA repair, from activation of mitogenic signalling, to epigenetic modification of gene expression. However, each species lead to specific molecular interactions and were subject to different bioavailability. It has been also strongly supported the hypothesis that the metallic elements may act as a co-carcinogen with other organic compounds, for example with PAH.

Key words: metallic elements and species, carcinogens R45, R49, mechanisms, carcinogenic action.

Introduzione

Come noto gli obblighi conoscitivi, preventivi e di controllo, anche sanitario sono, per la nostra legge, da indirizzare verso composti o sostanze identificati con le frasi di rischio R45 ed R49 (Può provocare il cancro" e "Può provocare il cancro per inalazione, rispettivamente). Tratteremo pertanto prioritariamente i meccanismi di azione di arsenico, berillio, cadmio, cobalto, cromo e nichel o loro specie cui sono state attribuite le frasi di rischio richiamate ed in un successivo contributo gli altri elementi e specie con diverse frasi, soprattutto R40 (Possibilità di effetti cancerogeni - Prove insufficienti), quali piombo, vanadio ed antimonio.

Nel periodo di elaborazione di questo lavoro che aveva come obiettivo quello di riunire tutte le informazioni disponibili sulla cancerogenesi degli elementi metallici è stato pubblicato un fascicolo monografico di Archives of Toxicology sulla tossicità degli elementi metallici (1) con una review di Beyersmann et al. (2) che tratta proprio i meccanismi di azione di quelli identificati come cancerogeni. Questo articolo, uscito in coincidenza con il nostro progetto in elaborazione da alcuni mesi, è risultato prezioso per la verifica ed il completamento di alcune parti della nostra trattazione.

L'obiettivo della nostra rassegna rimane quello di facilitare la comprensione delle ragioni che hanno portato alla identificazione e classificazione dell'elemento o di sue specie, di cogliere eventuali loro peculiarità e di proporre una loro collocazione assoluta e relativa rispetto alla loro capacità di causare tumori negli esposti. Il tutto, valorizzando soprattutto gli indicatori di dose e di effetto precoce, dovrebbe consentire una sempre più adeguata messa a punto di criteri e metodi di misura dell'esposizione e del rischio ed una più efficace individuazione delle misure di prevenzione e sorveglianza sanitaria.

Arsenico (As)

L'arsenico è un tradizionale cancerogeno ambientale ed occupazionale. Esso si trova naturalmente nelle falde acquifere e nel particolato atmosferico sia di origine antropica che naturale. La concentrazione di arsenico in organismi marini e alghe, sotto forma di arsenobetaina e arsenozuccheri, è più

alta di quella presente in altri cibi di origine animale o vegetale. In alcune specie di pesci si trovano concentrazioni comprese tra 1-10 mg/kg, mentre in pesci di fondali, crostacei e alghe possono contenere fino a 100 mg di As/Kg. L'arsenobetaina, specie organica dell'As, è la più comune forma arsenicale presente in pesci e molluschi (3).

L'esposizione occupazionale ad arsenico inorganico avviene in settori professionali quali le fonderie di metalli non ferrosi, la produzione del vetro, la produzione e uso di pesticidi.

È noto da tempo che l'inalazione di arsenico può causare tumore polmonare, mentre l'ingestione può essere causa di tumori cutanei, respiratori, epatici e vescicali (4).

La concentrazione di arsenico nei polmoni può essere 15-20 volte più alta negli esposti professionali che nei soggetti di controllo (5).

L'arsenico è assorbito dall'organismo sia nelle sue specie inorganiche trivalenti o pentavalenti (As(III) o As(V)) che in quelle organiche (composti a differente grado di metilazione fino all'arsenobetaina). In condizioni anaerobiche predomina l'As(III) più tossico dell'As(V) a causa di un veloce assorbimento cellulare di una maggiore capacità a legarsi ai siti sulfidrilici delle proteine e di una maggiore tendenza a formare radicali liberi (6).

L'arsenico nonostante la sua bassa attività genotossica, è in grado di indurre alterazioni cromosomiche come aberrazioni, aneuploidia e scambi di cromatidi fratelli ma non mutazioni puntiformi ed esplica la sua azione cancerogena praticamente attraverso tutti i meccanismi possibili, fra cui: stress ossidativo, danni al DNA, inibizione dei processi di riparazione, alterazione della metilazione del DNA, aberrazioni cromosomiche, attivazione dei segnali di trasduzione dell'espressione genica, modificazioni del controllo del ciclo e della differenziazione cellulari ed agisce a livello della modulazione dei segnali responsabili della crescita cellulare (7).

La conversione enzimatica dell'arsenico inorganico nelle specie mono e dimetilate è stata a lungo considerata come un meccanismo di detossificazione delle specie inorganiche e si è ritenuto che solo le specie inorganiche fossero dotate di potere cancerogeno. Studi più recenti hanno invece dimostrato che l'acido dimetilarsinico (DMA) e l'acido monometilarsinico (MMA) possono essere cancerogeni ad alte dosi e citotossici per la formazione di intermedi reattivi con conseguente proliferazione cellulare (8-10).

Su modelli cellulari ed animali l'arsenico trivalente e probabilmente alcune specie metilate possono attivare segnali di trasduzione con conseguente aumento della proliferazione cellulare, ridurre segnali anti-proliferazione, inibire la differenziazione cellulare e annullare i processi che controllano le divisioni cellulari. L'aumento della proliferazione cellulare è mediato da diversi meccanismi fra cui l'attivazione del fattore di trascrizione AP-1 attraverso la chinasi mitogen-activated protein (MAP) e la proteina chinasi C (PKC) (11).

Dong (12) ha dimostrato che l'esposizione di cellule JB6 a basse dosi di arsenico (0,5-24 μm) induce trasformazione cellulare mentre l'esposizione ad alte concentrazioni (50-100 μm) induce apoptosi, probabilmente a causa della tossicità dell'arsenico. L'apoptosi indotta dall'arseni-

co non è dipendente dal soppressore tumorale p53 come è stato dimostrato studiando l'effetto dell'arsenico su due linee cellulari di fibroblasti una p53^{+/+} e una p53^{-/-}. Il trattamento con arsenico ha indotto apoptosi in entrambe le linee cellulari, proprietà questa che può essere sfruttata utilizzando l'arsenico nell'indurre apoptosi in tumori con mutazioni p53 (13).

Le forme inorganiche di arsenico (sia III che V) mostrano un basso nullo o potenziale potere mutageno in modelli animali e batterici e solo in combinazione con altri agenti come luce UV, radiazione ionizzanti e agenti alchilanti provocano danni al DNA. L'arsenico inibisce anche i processi di riparazione del DNA aumentando quindi l'azione mutagena e cancerogena di agenti direttamente genotossici (14).

Lau et al., (15) hanno dimostrato che una coesposizione a arsenico e benzo(a)pirene (BaP) aumenta la trasformazione cellulare di 100 volte rispetto alla singola esposizione. Studi *in vivo* mostrano che l'arsenico potenzia la formazione di addotti al DNA a basse dosi; il livello di addotti BaP-DNA in polmoni e cute è superiore in seguito a coesposizione con arsenico e nel caso del polmone la differenza è statisticamente significativa ($p=0,038$) (14).

Maier et al., (16), riportano che l'arsenico potenzia il legame del BaP con il DNA *in vitro* aumentando il livello di addotti BaP-DNA di 17 volte. Lo studio *in vivo* riporta il medesimo andamento anche se con un aumento inferiore.

Poche però le evidenze epidemiologiche che indicano come l'arsenico e il fumo di sigarette agiscano sinergicamente promuovendo lo stress ossidativo e quindi l'ossidazione al DNA (17).

Sono stati indagati gli effetti dell'As(III) sull'espressione genica delle cicloossigenasi 2 (COX₂) delle cellule endoteliali e si è visto che l'induzione è associata a un aumento di due volte del livello di prostaglandine, infatti una *overexpression* di COX₂ inducibili sono associate a infiammazioni vascolari e proliferazioni cellulari. L'aumento delle COX da parte dell'arsenico passa attraverso la stimolazione dell'attività delle proteine chinasi IkappaB kinase (IKK) (18).

Nessun enzima dei sistemi di riparazione del DNA è inibito dall'arsenico con eccezione della polimerasi polyADP-ribose (PARP), è quindi improbabile che l'effetto dell'arsenico sui meccanismi di riparazione del DNA avvenga attraverso una interazione diretta con gli enzimi addetti ma indirettamente attraverso una modulazione genica.

La misura delle specie dell'arsenico nel monitoraggio biologico può risultare di grande utilità. La valutazione delle diverse specie dell'arsenico presenti nell'urina di lavoratori esposti ad anidride arseniosa dell'ordine di 30-150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ha dimostrato l'importanza della speciazione attraverso la correlazione nelle urine fra arsenico nell'aria e la somma di As(III) e As(V) (19). L'arsenico trivalente risulta essere la specie più attiva e la sua misura nelle urine rappresenta il miglior indicatore degli effetti "critici" di questo elemento come il cancro.

Un aspetto particolare dell'arsenico è emerso da studi epidemiologici che hanno messo in evidenza come il rischio relativo di tumore nella popolazione esposta a

livelli ≤ 60 ppb nell'acqua potabile è inferiore del rischio nella popolazione non esposta (20,21). L'evidenza che l'arsenico può avere un effetto ormesico, ossia avere una opposta azione in base alla dose e in genere protettiva a basse dosi, è stata osservata nei confronti di specifici meccanismi d'azione come la proliferazione cellulare (22), la riparazione del DNA (23), telomerasi (24) e stress ossidativo (25). Le dosi per cui l'arsenico trivalente induce una azione protettiva nei confronti di culture cellulari umane sono comprese fra 0.1 e 2 μ M (26), a queste dosi si osserva variazioni nella regolazione genica della trascrizione che porta a modificazioni del livello di proteine e dell'attività enzimatica. A dosi maggiori (>10 μ M) l'arsenico induce danni a DNA e mitocondri e apoptosi (27) e una de regolazione di alcuni geni la cui espressione era invece indotta dalla basse dosi di arsenico (23, 24).

L'azione cancerogena dell'arsenico passa attraverso tutti i principali meccanismi di azione che portano a proliferazione e instabilità genica, non tralasciando la sua rilevante azione co-cancerogena verso altri e più diffusi composti organici.

Considerata la diffusione, l'azione cancerogena di questo elemento è stata a lungo studiata evidenziando i numerosi meccanismi implicati e l'importanza della specie coinvolta, certo risulta essere il coinvolgimento delle specie inorganiche e si sta aprendo un impegnativo dibattito su quello di alcuni metaboliti organici metilati.

Berillio (Be)

In natura il berillio si trova sotto forma di silicato di alluminio, e dal punto di vista chimico mostra proprietà simili a quelli dei composti di alluminio dal quale è a volte difficilmente separabile. Sottoforma di leghe, come quelle Be-Cu, è impiegato nel settore elettronico, automobilistico, militare e aerospaziale e si può trovare nelle produzioni di alluminio.

Solo un limitato numero di studi però è stato dedicato ai meccanismi di azione cancerogeni e mutageni del berillio.

Il berillio può entrare nella cellula attraverso lo stesso carrier del magnesio e competere con esso nei siti di legame biochimici come gruppi fosfati di nucleotidi e acidi nucleici (2).

Il berillio e i suoi sali inducono trasformazioni cellulari su culture di mammiferi, si legano a nucleoproteine, inibiscono enzimi coinvolti nella sintesi del DNA e inducono mutazioni geniche (28).

Saggi di mutazioni e aberrazioni cromosomiche sul berillio e i suoi composti hanno fornito risultati contraddittori. I test batterici sono negativi mentre quelli su cellule di mammiferi mostrano un'evidenza di induzione di mutazioni, aberrazioni cromosomiche e trasformazioni cellulari (29).

Come il cadmio, il berillio non partecipa a reazioni redox in condizioni fisiologiche. Ulteriori meccanismi di azione del berillio sono stati individuati nella deregolazione della proliferazione cellulare e dell'attivazione dei segnali di trascrizione.

Per i tumori polmonari, una esposizione di berillio di 17 μ g/g di polmone induce tumori maligni e/o benigni nel

50% degli animali trattati di entrambi i sessi, con una sopravvivenza ≥ 1 ; si nota una sostanziale molteplicità tumorale ma non sono presenti mutazioni geniche di proteine e geni in grado di controllare la proliferazione cellulare come K-ras e p53 (30).

La proliferazione cellulare indotta da fluoruri di berillio (BeF_n) dipende dalla disponibilità cellulare di Ca^{2+} , un aumento di Ca^{2+} causa attivazione di proteina chinasi C (PKC) la quale promuove eventi cellulari legati alla fosforilazione di proteine (31).

Il BeF_n provoca un aumento dei livelli di Ca^{2+} e questo può spiegare la genotossicità e citotossicità attraverso la modulazione di segnali di trasduzione.

Non tutti i sali del berillio inducono gli stessi effetti e il fluoruro di berillio rappresenta una situazione unica con effetti sui segnali di trasduzione e sul metabolismo energetico, inibendo, ad esempio, le ATPasi (32).

L'esposizione dei macrofagi peritoneali a BeF_2 causa un aumento di 1,5-2 volte l'espressione delle proteine c-fos e c-myc e della fosforilazione di MEK1, ERK1, p38 MAPK e JNK (28).

Il solfato di berillio provoca trasformazioni morfologiche potenzialmente cancerogene su cellule di mammiferi attribuite all'amplificazione genica di K-ras e c-jun e alcune trasformazioni cellulari berillio-indotte hanno un potenziale neoplastico dato dall'instabilità genomica (33).

Hamada et al., (34) studiando linee cellulari esposte a Be dimostrano che non vi sono aumenti nei livelli dei principali fattori di trascrizione, NF-k; AP-1; AP-2; CREB; C/EPB; Sp-1; Egr-1; Ets; NF-Y e Oct-1 coinvolti invece nei meccanismi degli altri elementi metallici.

Studio in vivo su topi esposti a dosi crescenti di berillio mostrano un aumento del numero totale di cellule, un aumento della percentuale di neutrofili, elevati livelli di proteine totali e attività della β -glucuronidasi e lattato deidrogenasi nel BAL dei topi esposti a alte dosi di berillio.

È stato dimostrato che il berillio blocca alcuni enzimi addetti alla sintesi del DNA e il processo di incorporazione della timidina nel DNA epatico, per questo si ipotizza che il berillio si leghi a nucleoproteine che portano a specifiche inibizioni dei processi di replicazione del DNA (35).

Gli studi sui meccanismi di azione specifici e responsabili di tale cancerogenicità sono pochi. I principali meccanismi di azione sono la genotossicità e l'alterazione della proliferazione cellulare.

In generale il tumore polmonare correlato all'esposizione a berillio è legato ad alti livelli di esposizione associati anche a polmoniti acute da berillio proprie degli anni 50 quando i livelli di esposizione negli ambienti di lavoro erano di molto superiori rispetto a quelli odierni (29).

Cadmio (Cd)

Le principali attività lavorative che espongono a cadmio sono la saldatura specie nelle lavorazioni orafe, l'elettrodeposizione galvanica, la produzione di pigmenti, la fabbricazione di accumulatori Ni/Cd, o quella di apparecchiature radio e televisioni, lavorazioni della ceramica e delle materie plastiche.

Il fumo di tabacco è un'importante via di esposizione per la popolazione generale: una sigaretta contiene 1-2µg di cadmio che si traduce in 0.1-0.2µg di cadmio inalato (36).

Nell'uomo l'esposizione a cadmio è stata associata a tumori soprattutto polmonari e con minore decrescente evidenza a prostata, rene, fegato, pancreas e stomaco (37-39).

Il cadmio è un cancerogeno non-genotossico e risulta non mutageno in test su batteri e solo debolmente mutageno in test su cellule di mammiferi, tuttavia è provato che il cadmio è co-mutageno in test su cellule di mammiferi quando combinato con agenti genotossici attraverso l'inibizione dei processi di riparazione al DNA (40).

Molti studi indicano che il cadmio probabilmente agisce attraverso meccanismi indiretti o epigenetici, compresa l'attivazione di processi oncogeni o soppressione di apoptosi.

I meccanismi coinvolti sono essenzialmente indiretti come la generazione di ROS, in modo indiretto ossia attraverso una inibizione degli enzimi antiossidanti, l'inibizione dei sistemi di riparazione del DNA, il danneggiamento dei sistemi di difesa cellulare come gli antiossidanti, l'interferenza con i segnali di trasduzione e la distruzione dell'adesione cellulare (41).

L'espressione di geni antiossidanti come quelli che codificano per la sintesi di superossido dismutasi e catalasi sono depressi dal cadmio e questa può essere la via attraverso il quale il cadmio induce perossidazione lipidica, stress ossidativo e tossicità correlata (42).

Vi sono però studi discordanti che suggeriscono una sorta di adattamento dovuta all'esposizione prolungata a cadmio in cui si osserva un aumento dell'attività della superossido dismutasi (SOD) e della catalasi (43).

L'esposizione a cadmio induce l'espressione di geni che codificano per la sintesi di metallothioneine (MT), dei proteine implicate nella sopravvivenza delle cellule quando esposte ad eventi in grado di perturbarne l'omeostasi come le heat shock proteins (HSPs) e geni coinvolti nella risposta a stress ossidativo e coinvolti nella sintesi del glutatione (GSH).

La mancanza di espressione di MT in condizioni basali o cadmio-stimolate può essere una causa di suscettibilità cancerogena a cadmio.

Da studi su roditori si può dedurre che l'effetto protettivo di MT dipende dalla distribuzione del cadmio, dall'inducibilità dei geni MT e dal livello di MT nei vari tessuti e specie (44) ad esempio Ren et al. (45), hanno mostrato che il trattamento con cadmio nei ratti provoca un aumento di MT nel fegato ma non nei testicoli e questo può essere la causa dell'alta suscettibilità di questo organo al cadmio.

I macrofagi alveolari in soggetti fumatori accumulano significative quantità di cadmio senza un conseguente aumento di MT indicando quindi una saturazione delle stesse; l'aumento di cadmio nelle cellule alveolari può contribuire allo sviluppo di tumori nei soggetti fumatori (46).

L'attivazione di proto-oncogeni ad opera del cadmio è un meccanismo epigenetico che coinvolge l'inibizione della metilazione del DNA che rappresenta uno strumento cellulare di repressione genica a larga scala, l'ipometilazione è associata alla *overexpression* di proto-oncogeni (47).

Il cadmio induce una sovra espressione di geni di risposta veloce, immediate early responses genes (IEGs) come

c-fos, c-jun, c-myc (48,49) e l'attivazione di altri fattori di trascrizione come MTF1, USF, NF-Kb, NRF2 (50).

Prove in vitro su cellulari epiteliali epatiche di ratto ha dimostrato che l'esposizione acuta a cadmio provoca una marcata inibizione di una proteina chinasi mitogen-attivata (MAPKs) e una espressione delle MT con conseguente alterazione dei segnali di trasduzione e una resistenza ai processi di apoptosi, meccanismi responsabile sia della promozione dei tumori che della progressione (51).

Il cadmio altera la concentrazione di molti secondi messaggeri cellulari (come la concentrazione di calcio intracellulare) e modifica l'attività di proteine chinasi e fattori di trascrizione.

Il cadmio inoltre si può sostituire al calcio della E-caderina, glicoproteina transmembrana che gioca un ruolo chiave nell'adesione cellulare implicata anche nella proliferazione, apoptosi, differenziazione e invasione tumorale (52).

Le cellule esposte a cadmio mostrano "adattamenti" cellulari: ad esempio il livello di antiossidanti cresce in risposta alla presenza di ROS cadmio-indotti; così come l'induzione di geni MT ad opera del cadmio porta ad un aumento di metallothioneine che legandosi al metallo riducono la concentrazione di cadmio libero nella cellula.

Il cadmio può indurre apoptosi in diversi organi, induce apoptosi in cellule polmonari umane attraverso un meccanismo mediato dai mitocondri ma indipendente dall'attività delle caspasi (53).

La determinazione di biomarker di esposizione e di effetto come b-2-microglobulina, N-acetil-D-glucosaminidasi e albumina urinaria su una popolazione cinese esposta a cadmio e arsenico inorganico ha messo in evidenza come la co-esposizione a questi due elementi porta a una maggiore incidenza di danno renale rispetto all'esposizione del singolo elemento (54,55).

La cancerogenicità del cadmio e delle sue specie, a lungo discussa e controversa (si veda la classificazione di IARC seguita di poco tempo ad un documento della stessa agenzia che si concludeva diversamente), si manifesta attraverso la formazione di specie reattive dell'ossigeno (anche se indirette) la deregolazione della proliferazione cellulare e l'inibizione dei meccanismi di riparazione al DNA, meccanismo quest'ultimo che insieme all'antagonismo della stimolazione dei meccanismi cellulari citoprotettivi concorre a rendere il cadmio un potente co-cancerogeno di radiazioni UV, agenti alchilanti e ossidanti.

Cobalto (Co)

La maggiore esposizione professionale a polveri contenenti cobalto avviene durante la produzione di metalli duri con concentrazioni che possono arrivare all'ordine dei mg/m³ di cobalto metallico (56).

Alcune specie del cobalto sono classificate R49 dalla UE, il cobalto solfato, il cobalto cloruro e recentemente in seguito al trentesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE l'acetato di cobalto, il nitrato di cobalto e il carbonato di cobalto, mentre la IARC classifica il cobalto e i suoi composti come 2B (sospetti cancerogeni).

I composti del Co(II) inducono danni al DNA, cross link del DNA, mutazioni geniche, scambio di cromatidi fratelli e aneuploidia in studio *in vitro* su cellule animali e umane (57).

Poiché le diverse specie del cobalto hanno differenti proprietà tossiche, mutagene e cancerogene nella valutazione del rischio cancerogeno è importante differenziare le diverse specie in particolare modo ioni di Co(II); cobalto metallico e particelle metalliche di cobalto metallico in associazione con tungsteno carburo (WC-CO).

I meccanismi di azione dimostrati per il cobalto riguardano plausibilmente sia i composti solubili, ad esempio il cobalto cloruro e solfato ed anche cobalto metallico sono rapidamente solubilizzato nei fluidi biologici che quelli insolubili. Tuttavia *in vivo* la solubilità del Co(II) è relativamente limitata poiché questi cationi precipitano in presenza di concentrazioni fisiologiche di fosfati e si legano a proteine specifiche come l'albumina (58).

Studi *in vitro* hanno dimostrato che ioni di Co(II) possono interferire sull'integrità del DNA agendo direttamente attraverso l'induzione di rotture o indirettamente attraverso l'inibizione di specifici sistemi di riparazione; invece l'inalazione di cobalto solfato ha prodotto una chiara risposta cancerogena in studi sperimentali su animali.

Il cobalto può generare ROS attraverso reazione Fenton o Haber-Weiss simili (ossia formazione di un radicale idrossile (OH⁻) attraverso reazioni con il perossido di idrogeno (H₂O₂); è stato dimostrato che l'esposizione di diverse linee cellulari a sali solubili del cobalto aumenta la produzione di ROS. La produzione di ROS cobalto-mediata su cellule neuronali PC12 si crede essere causata da apoptosi cobalto mediata (59).

Il cobalto simula lo stato di ipossia stabilizzando la sub-unità alfa di HIF-1 (hypoxia inducible factor) e aumentando di conseguenza l'espressione di geni regolatori dell'ipossia (hypoxic-regulated) come eritropoietina, fattori di crescita endoteliali (VEGF) e altri processi che consentono la sopravvivenza delle cellule soprattutto a bassa presenza di ossigeno (60).

L'ipossia è una caratteristica comune dei tessuti tumorali e la crescita del tumore è influenzata dall'attivazione di HIF-1 α che porta ad un aumento dell'attività glicolitica e angiogenetica.

Uno studio *in vitro* (61) ha mostrato come il cobalto agisce sugli astrociti portando a una deplezione di ATP, ad apoptosi e necrosi dose-dipendente; i mitocondri sono risultati essere i principali target, essi in seguito a una diminuzione del potenziale di membrana rilasciano fattori apoptogeni come AIF (apoptosis induction factor) (62).

La somministrazione *in vivo* di cobalto cloruro può stimolare la sintesi di eritropoietina la quale può condurre ad un aumento della proliferazione degli eritroblasti (63).

Può indurre attività DNA-binding di NF- κ B che può indurre la trascrizione di adesioni cellulari. Concentrazioni micromolari di cobalto producono danni alla cromatina delle basi del DNA attraverso la formazione di radicali idrossilici in presenza di perossido di idrogeno (64).

Gli ioni di Co(II) competono con lo zinco in proteine zinc-finger alcune delle quali controllano la trascrizione genica e geni addetti alla riparazione del DNA, come la capa-

cià di legarsi e riparare il DNA della proteina p53, proteina zinco dipendente, modulabile da parte degli ioni Co(II) (65).

Le particelle di cobalto metallico hanno una attività biologica che non risulta mediata dagli ioni di Co(II) e quando miscelati a carburi metallici hanno differenti proprietà genotossiche e cancerogene.

Lison et al (66,67) hanno dimostrato che cancerogenicità e genotossicità del cobalto metallico non si esplicano attraverso la solubilizzazione di ioni Co(II).

Il cobalto metallico può ridurre l'ossigeno in specie reattive, la formazione di queste specie risponde quindi a meccanismi differenti rispetto agli ioni di cobalto che producono ROS attraverso reazioni Fenton-simili (68).

È interessante sottolineare che, al contrario di quanto ipotizzato per molti altri elementi metallici, l'attività biologica non è esclusivamente mediata dalla forma ionica dissolta in un media biologico. Esso può interferire con il DNA anche attraverso l'inibizione di sistemi di riparazione, processo che dipende dalla solubilizzazione del Co(II) dalla superficie delle particelle (69).

La recente dimostrazione della capacità della particelle di metallo duro (WC-CO, carburo di tungsteno-cobalto) di produrre una grande quantità di specie reattive dell'ossigeno ha fornito nuove basi per interpretare la loro azione infiammatoria e il potenziale mutageno e cancerogeno. Il meccanismo di formazione dei ROS coinvolge l'ossidazione del cobalto metallico catalizzato sulla superficie della particelle di carburo, la riduzione dell'ossigeno disciolto in specie reattive e la produzione di cationi di cobalto solubili (67).

In vitro le particelle di metallo duro causano un significativo incremento di fenomeni di rottura del DNA, un aumento di circa tre volte rispetto all'esposizione a cobalto metallico da solo (68).

La cancerogenicità del cobalto risulta debole, la formazione delle specie reattive dell'ossigeno generata indirettamente da H₂O₂ può causare danni al DNA e mutazioni tuttavia con mutagenicità molto bassa.

L'evidenza di genotossicità *in vivo* di particelle WC-CO è debole mentre maggiore sembra la valutazione complessiva degli studi epidemiologici, attività che può essere spiegata attraverso le interazioni fisicochimiche fra il cobalto e la particelle di carburo di tungsteno.

Cromo (Cr)

Le lavorazioni principali nelle quali vengono impiegati composti a base di cromo sono l'industria metallurgica nella produzione lavorazione di acciai speciali, quella galvanica, la produzione di cromati e di acido cromico.

I cromati (Cr VI) spesso sono intermedi tecnici nella fabbricazione di composti di Cr(III) e cromo metallico pertanto i composti di Cr (III) possono non essere completamente puri e contenere tracce di cromo esavalente.

Nella pratica vi è sufficiente evidenza di cancerogenicità del Cr(VI) in tre attività industriali che comportano (o comportavano nel passato) esposizioni ad elevate concentrazioni di Cr(VI) per via aerea: la produzione di cromati, la produzione di pigmenti di cromati e le attività di cromatura (70).

La maggior fonte di esposizione a Cr(VI) per la popolazione generale è dovuta essenzialmente all'inquinamento industriale e alla possibile contaminazione delle falde acquifere.

L'esposizione a Cr(VI) è in grado di indurre una serie di alterazioni dirette a carico del DNA, quali mutazioni puntiformi ed aberrazioni cromosomiche (DNA strand breaks, DNA interstrand cross-links, DNA-protein cross-links con formazioni di addotti Cr-DNA) e modificazioni di macromolecole provocate dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno, nonché fenomeni di perossidazione lipidica con conseguente danno strutturale e funzionale delle membrane, queste alterazioni, che rappresentano gli effetti di differenti cinetiche degli enzimi di riparazione del DNA, sono descritte in uno studio relativo alla citotossicità, alla cancerogenicità ed ai meccanismi di danno ossidativo di diverse forme di cromo (71), ma sono già state da tempo studiate (72,73).

È noto e largamente accettato che i composti scarsamente solubili del Cr(VI) sono cancerogeni per l'uomo e si sono rivelati tali anche i composti relativamente idrosolubili o mediamente solubili. Le minori evidenze dei composti maggiormente solubili potrebbe dipendere dalla più breve emivita biologica e dalla minore interazione con agenti co-cancerogeni, mentre sono mutageni nelle condizioni sperimentali (71-76).

La maggioranza dei ricercatori in questo campo affermano che la cancerogenicità del cromo richiede comunque una esposizione elevata per organi target specifici come il polmone e i seni nasali e paranasali (70, 76-78).

L'aumento di tumori in altri siti, occasionalmente riportati in studi epidemiologici, sono inconsistenti dal punto di vista statistico essendo tra l'altro controbilanciati da studi che dimostrano un calo degli stessi tipi di tumore.

Nel caso del Cr(VI) tralasciando i possibili meccanismi che si verificano dopo la comparsa dei danni al DNA come riparazione, apoptosi, replicazione o promozione cellulare, non sembrano esserci dubbi sull'esistenza di modelli tossicocinetici che restringono la disponibilità del Cr(VI) in certi tessuti e di modelli metabolici aventi effetti sulla disponibilità verso il DNA che fanno ipotizzare all'esistenza di un valore soglia per la comparsa di processi di cancerogenesi.

Infatti il Cr(VI) può essere ridotto nei fluidi biologici, in cellule non-target e nei compartimenti umani, il che rappresenta un meccanismo di detossificazione.

In modelli animali l'esistenza di un meccanismo di soglia è fortemente supportato dalla mancanza di cancerogenicità dei composti di Cr(VI) nella maggioranza degli studi disponibili in letteratura; sperimentalmente l'induzione di un tumore avviene sotto particolari condizioni che superano i meccanismi di difesa ad esempio, (i) a dosi estremamente alte in grado di provocare una risposta positiva o negativa e comunque senza nessuna gradazione degli effetti (ii) solo nel sito di ingresso, in quanto una volta introdotto viene ridotto e detossificato (iii) solo in certi target e in base al potere del meccanismo di detossificazione (iv) quando è somministrato in singola e massiva dose e non in dosi frazionate che sono più facilmente neutralizzate.

Le conclusioni di De Flora, spesso eleganti dal punto di

vista del disegno sperimentale e generalmente riconosciute come valide a livello scientifico, sono state messe in discussione in una review Salnikow et al. (11) che le hanno definite "ottimistiche" sulla base di risultati di studi epidemiologici (79) e di valutazione del rischio (80). Tali studi avrebbero dimostrato un rischio di cancro al polmone per esposizione inferiori ai $52 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (TLV- TWA proposto ACGIH₂₀₀₇ per il Cr(VI) è $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

Una risposta indiretta può venire da due recenti lavori dello stesso De Flora (81,82) che dimostra in studi *in vivo* su animali che la somministrazione orale di Cr(VI) (17.7 mg/kg) non aumenta la frequenza di micronuclei mentre la stessa quantità iniettata per via intraperitoneale induce clastogenesi in quanto by-passa i meccanismi di detossificazione.

Pertanto, anche a dosi fino a 10.000 volte superiori ai valori fissati dalle norme di molti stati sull'acqua potabile il Cr(VI) per via orale non è genotossico sulle cellule emopoietiche (70). I risultati di questi studi forniscono la prova che il cromo (VI), somministrato per via intra-gastrica o con l'acqua potabile, anche a dosi molto elevate, non è clastogenico.

Il Cr(VI) è un pro-cancerogeno, di per sé è completamente non-reattivo verso il DNA a condizione fisiologiche di pH e temperatura. Nel sistema biologico il Cr(VI) subisce una riduzione che porta a Cr(III), termodinamicamente più stabile. Quando questo avviene fuori dalla cellula è una sorta di detossificazione poiché il Cr(III) sono scarsamente permeabili, dentro la cellula, invece, la riduzione porta alla formazione di intermedi reattivi come Cr(IV) e Cr(V) e specie radicaliche reattive (11).

Il metabolismo del Cr(VI) nelle cellule avviene in parte con meccanismi enzimatici (come DT diaforasi, P450 reduttasi, aldeide deidrogenasi, ecc.) e soprattutto attraverso il trasferimento diretto di elettroni dall'ascorbato e da gruppi tiolici, a basso peso molecolare come glutatione e cisteina (83).

Il prodotto finale del metabolismo cellulare è il Cr(III) che forma stabili complessi di coordinazione con acidi nucleici e proteine (84).

La formazione di addotti cromo-DNA è la principale forma di lesione genetica cromo indotte su cellule di mammiferi, considerate responsabili delle mutazioni generate durante la riduzione del Cr(VI) con cisteina e ascorbato.

L'evidenza della persistenza degli addotti totali e la mutagenicità e tossicità dei danni cromo indotti nelle cellule NER-deficienti sono la dimostrazione che gli addotti formati sono substrato per nucleotide excision repair (NER) (11).

Il legame del cromo è base specifico anche se non in modo assoluto e nel caso del DNA è verso la guanina, mentre per l'RNA l'acido poliriboguanilico (poli(G)) (85).

I cromati sono gli unici elementi metallici cancerogeni in grado di generare direttamente specie reattive dell'ossigeno in seguito all'interazione diretta con riducenti cellulari.

Studi hanno dimostrato che il Cr(VI) oltre a reagire con H_2O_2 portando alla produzione di radicali idrossilici è in grado di ossidare direttamente basi (guanina o 8-oxo-dG) attraverso sottrazione di elettroni e conseguente addizione all'ossigeno, quindi senza coinvolgere la produzione di ROS (84, 86).

Tramite i composti a valenza intermedia, il Cr(VI) sarebbe in grado di provocare l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare (NF)-kappa B, mentre l'attivazione del fattore AP1 è associata alla fosforilazione della MAP chinasi P38 e JNK e non tramite proteine chinasi extracellular-signal-regulated (ERK) (87).

È stato anche ipotizzato un possibile meccanismo epigenetico per la genotossicità del cromo, studiando un sistema in vitro in grado di causare la metilazione del DNA delle regioni promotrici in cellule transgeniche (G12) di mammifero, V79 derivate. Studi in vitro hanno dimostrato che i livelli di p53 in linee cellulari tumorali umane aumentano in seguito ad esposizione di Cr(VI), questo dimostra che i meccanismi coinvolti nella riparazione di insulti cromo-correlati sono mediati dal p53, dall'arresto del ciclo cellulare e dall'apoptosi (88).

Tuttavia altri studi hanno dimostrato che oltre al p53 viene attivato anche il gene mutato nell'ataxia telangiectasia (ataxia telangiectasia-mutated, ATM) che risulta essere il principale segnale coinvolto nell'apoptosi cellulare indotta dal cromo e che paradossalmente contribuisce anche alla sopravvivenza cellulare (89).

Dalle evidenze analizzate la cancerogenicità del cromo si esplica attraverso meccanismi potenti e selettivi come la formazione diretta di ROS, l'attivazione di fattori di trascrizione che portano a danni al DNA e mutazioni geniche, oltre all'induzione di geni promotori; tuttavia, in pratica la cancerogenicità del cromo è strettamente vincolata dallo stato di ossidazione, dall'entità dell'esposizione e dalla capacità di arrivare ai siti target bypassando i meccanismi di detossificazione.

Nichel (Ni)

Il nichel è usato e presente nella metallurgia specifica e dei rottami che lo contengono, nella galvanica, nell'industria chimica. È stato stimato che lavoratori impiegati nella prime fasi della produzione del nichel dal minerale possono essere esposti a concentrazioni ambientali di 170-460 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ di miscele di composti del nichel solubili e insolubili (90).

Diverse specie del nichel sono state misurate anche nella produzione di acciai speciali e Valsania et al (91) usando il metodo di Zatka modificato (92) hanno cercato di quantificare valutato le diverse specie mediante una lisciviazione sequenziale che consente la separazione di quattro frazioni diverse, nichel solubile, nichel solfidrico, nichel metallico e nichel ossido. Con questo metodo è stato possibile distinguere concentrazioni di 0.006 mg/m^3 per il nichel solubile e ossido, 0.018 mg/m^3 per il nichel metallico e 0.034 mg/m^3 per il nichel solfidrico.

Il modello della cancerogenesi del nichel si basa sulla biodisponibilità degli ioni di nichel (Ni II) nei siti nucleari delle cellule target. I fattori che influenzano questa disponibilità sono la granulometria delle particelle, le caratteristiche di superficie, i meccanismi di clearance del tratto respiratorio, l'assorbimento cellulare, e la solubilità (riferita alla facilità di rilascio degli ioni di Ni(II)).

Il primo aspetto da considerare nello studio dei meccanismi di azione cancerogeni del nichel e la solubilità delle diverse specie.

Le specie solubili del Ni(II) hanno un minore potere cancerogeno rispetto alle specie meno solubili come il nichel subsolfuro. La rapida clearance delle specie più solubili ne limita la concentrazione nei siti critici.

Le specie di nichel in grado di indurre tumori sono quelle (i) abbastanza insolubili da esser presenti nel polmone come particelle (ii) tali da penetrare nelle cellule tramite fagocitosi (iii) una volta dentro i fagosomi rilasciano grandi quantità di ioni Ni(II) (93).

La fagocitosi è un meccanismo di trasporto efficiente anche per le specie insolubili facendole arrivare ai target cellulari.

L'esempio più noto è rappresentato dal nichel subsolfuro. Questa specie è parzialmente solubile nei fluidi biologici ma riesce a entrare nelle cellule per endocitosi e una volta penetrato, a causa del pH acido dei fagosomi, rilascia ioni nichel che raggiungono il sito nucleare (94).

Al contrario le specie solubili si dissociano immediatamente in ioni Ni(II) la cui penetrazione nelle cellule è poco efficiente e contrastata da una rapida clearance polmonare e da un'alta affinità con le proteine. Queste specie solubili possono dare tuttavia reazioni infiammatorie e con effetti sulla proliferazione.

La cancerogenicità del Ni(II) è data essenzialmente dalla loro capacità di indurre variazioni epigenetiche come acetilazione e metilazione degli istoni, modifiche strutturali, alterazioni nella metilazione del DNA che si manifesta nella soppressione o attivazione di fattori di trascrizione (11).

I meccanismi con cui il Ni(II) induce ipermetilazione del DNA in culture cellulari non è chiaro, una delle ipotesi prevede che il Ni(II) si sostituisca al magnesio interferendo nel processo di condensazione della cromatina e attivando una metilazione del DNA (95).

Più recenti osservazioni indicano nell'interazione con ascorbato un ulteriore possibile meccanismo dell'azione cancerogena del Ni(II); esso porterebbe ad una deplezione di ascorbato intracellulare con attivazione dei fattori di trascrizione dell'hypoxia-inducibile factor 1 (HIF-1), fattore coinvolto nel controllo dell'espressione genica dell'eritropoietina e una *up-regulation* dei geni che inducono ipossia cellulare (96). La risposta molecolare all'ipossia mediata da HIF-1 stimola angiogenesi, variazioni del metabolismo energetico e dell'omeostasi del ferro (97). Altre importanti modifiche indotte dalla perdita di ascorbato sono state ricercate nella induzione di stress da ipossia, nel danno dell'assemblaggio di proteine di collagene e nell'inattivazione di enzimi riparatori del DNA ascorbato-dipendenti (98).

L'esposizione a Ni(II) porta inoltre alla formazione di specie reattive dell'ossigeno, all'attivazione di fattori di trascrizione e alla conseguente interazione con l'espressione di geni correlati allo sviluppo del tumore (99,100).

Il Ni(II) e i suoi composti hanno inoltre un'azione sinergica con altre sostanze cancerogene mutageni. Studi in vitro su cellule animali hanno evidenziato che il cloruro di nichel può causare aumento nella frequenza delle mutazioni indotte dalla luce UV sul gene ipoxantina (guanina) fosforibosil-transferasi (hprt), lo scambio di cromatidi fratelli e aumentare in cellule embrionali di criceto la trasformazione morfologica indotta dal benzo(a)pirene (101).

Al riguardo, Hu et al., (102) hanno dimostrato che l'esposizione a nichel aumenta significativamente la frequenza delle mutazioni indotte da addotti-benzo(a)pirene diossido aumentando la genotossicità e mutagenicità degli idrocarburi policiclici aromatici attraverso l'inibizione del nucleotide excision repair (NER) implicato nella riparazione al DNA; la competizione del nichel con lo zinco presente nella struttura delle proteine del NER può essere rilevante nel meccanismo di tale inibizione.

In conclusione, gli ioni di nichel producono alterazioni significative nel metabolismo cellulare, che includono, stimolazione dell'attività glicolitica, alterazione dell'omeostasi del ferro, deficit di ascorbato e stress da ipossia cellulare, le alterazioni metaboliche possono portare a modificazioni dell'espressione genica attraverso variazioni epigenetiche. Inoltre, una coesposizione con sostanze cancerogene genotossiche può intensificare gli effetti del Ni.

La solubilità del nichel ossido nei fluidi biologici è molto bassa, questo si traduce in un debole rilascio di Ni(II) e si ipotizza che il tumore indotto dalle particelle di nichel ossido sia il risultato di processi infiammatori/proliferativi derivanti da una attivazione cronica dei macrofagi piuttosto che a effetti derivati dalla formazione di Ni(II) (103).

Il nichel esplica la sua azione cancerogena soprattutto attraverso tre meccanismi di azione: la formazione di ROS, l'interferenza con i meccanismi di riparazione e attraverso eventi epigenetici che portano ad un aumento della proliferazione cellulare. In ogni caso sono gli ioni di Ni(II) quelli che entrano in gioco in tutti i meccanismi esaminati e quindi risulta determinante la capacità da parte delle altre specie di nichel di liberare tali ioni.

Discussione e conclusioni

Gli elementi metallici e loro specie, classificati R45 ed R49 (e ad eccezione di alcune specie del Co, come cancerogeni certi dalla IARC e dalle principali agenzie) mentre presentano diverse, per numero e qualità, evidenze epidemiologiche nei lavoratori esposti o gruppi di popolazione generale, sono accomunati da un rilevante numero di dati sperimentali e che praticamente rappresentano tutti i meccanismi d'azione cancerogena.

Gli elementi metallici sono quindi responsabili di effetti sovrapponibili indotti però da meccanismi e interazioni molecolari differenti, ad esempio la formazione di specie reattive dell'ossigeno è azione comune di tutti gli elementi trattati, anche se raggiunta attraverso una via diretta o indirettamente attraverso l'inibizione degli enzimi con proprietà antiossidanti, come il cadmio; così come diversi sono i fattori di trascrizioni attivati o inibiti dagli elementi metallici responsabili i proliferazioni cellulari.

Le differenze nell'assorbimento, nella distribuzione, nel bilancio fra effetti detossificanti e di deregolazione possono spiegare la grande variazione di sensibilità degli organi verso gli elementi metallici cancerogeni.

Le principali differenze che li contraddistinguono si trovano nella presenza o meno di specie ioniche o complessi biodisponibili in grado di raggiungere e interagire con i target cellulari.

Le valutazioni conclusive anche su questo gruppo di elementi metallici saranno proposte nell'ultima parte di questo contributo per poterle comparare con quelle degli elementi metallici non ancora classificati da UE con le frasi di rischio R45 e R49 e poter meglio inquadrare i principali meccanismi di azione e discuterne le possibili implicazioni teoriche ed applicative.

Ringraziamenti

Si ringrazia il prof S De Flora per i preziosi consigli forniti per il paragrafo sul cromo.

Bibliografia

- 1) Hengstler JG, Bolt HM et al. Special Issue: Metal Toxicology. Arch Toxicol 2008; 82: 489-571.
- 2) Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. Arch Toxicol 2008; 82: 493-512.
- 3) Arsenic in Handbook on the toxicology of metals, third edition. Nordberg GF, Fowler BA., Nordbger M., Friberg LT. Burlington USA. Elsevier. 2007; 367-406.
- 4) Tapio S, Grosche B. Arsenic in the aetiology of cancer. Mutat Res 2006; 612: 215-246.
- 5) Liu YT, Chen Z. A retrospective lung cancer mortality study of people exposed to insoluble arsenic and radon. Lung Cancer 1996; 14: 137-148.
- 6) Kitchin KT, Wallace K. Arsenite binding to synthetic peptides based on the Zn finger region and the estrogen binding region of the human estrogen receptor-alpha. Toxicol Appl Pharmacol 2005; 206: 66-72.
- 7) Simeonova PP, Luster MI. Mechanisms of arsenic carcinogenicity: genetic or epigenetic mechanisms? J Environ Pathol Toxicol Oncol 2000; 19: 281-286.
- 8) Cohen SM, Ohnishi T, Arnold LL, Le XC. Arsenic induced bladder cancer in a animal model. Toxicol Appl pharmacol 2007; 222: 258-263.
- 9) Wei M, Wanibuchi H, Morimura K, Iwai S, Yoshida K, Endo G, Nakae D, Fukushima S. Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors. Carcinogenesis; 23: 1387-97.
- 10) Kligerman AD, Doerr CL, Tennant AH, Harrington-Brock K, Allen JW, WinkWeld E, Poorman-Allen P, Kundu B, Funasaka K, Roop BC, Mass MJ, DeMarini DM Methylated trivalent arsenicals as candidate ultimate genotoxic forms of arsenic: induction of chromosomal mutations but not gene mutations. Environ Mol Mutagen 2003; 42: 192-205.
- 11) Salnikow K, Zhitkovich A. Genetic and epigenetic in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: Nickel, Arsenic and Chromium. Chem Res Toxicol 2008; 21: 28-44.
- 12) Dong Z. The Molecular Mechanisms of Arsenic-Induced Cell Transformation and Apoptosis. Environ Health Perspec 2002; 110: 757-759.
- 13) Huang C, Ma W-Y, Li J, Dong Z. Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH2-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. Cancer Res 1999; 59: 3053-3058.
- 14) Evans CD, LaDow K, Schumann BL, Savage RE, Caruso J, Vonderheide A, Succop P, Talaska G. Effect of arsenic on benzo[a]pyrene DNA adduct levels in mouse skin and lung. Carcinogenesis 2004; 25: 493-497.
- 15) Lau AT, Chiu JF. Proteomic and biochemical analyses of in vitro carcinogen-induced lung cell transformation: synergism between arsenic and benzo[a]pyrene. Proteomics 2006; 6: 1619-1630.
- 16) Maier A, Schumann BL, Chang X, Talaska G, Puga A. Arsenic co-exposure potentiates benzo(a)pyrene genotoxicity. Mutat Res 2002; 517: 101-111.

- 17) Hays AM, Srinivasan D, Witten ML, Carter DE, Lantz RC. Arsenic and cigarette smoke synergistically increase DNA oxidation in the lung. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006; 19: 129-138.
- 18) Tsai SH, Liang YC, Chen L, Ho FM, Hsieh MS, Lin JK. Arsenite stimulates cyclooxygenase-2 expression through activating IkappaB kinase and nuclear factor kappaB in primary and ECV304 endothelial cells. *J Cell Biochem* 2002; 84: 750-758.
- 19) Apostoli P, Bartoli D, Alessio L, Buchet JP. Biological monitoring of occupational exposure to inorganic arsenic. *Occup Environ Med* 1999; 56: 825-32.
- 20) Lamm SH., Engel A, Kruse MB, Feinleib M, Byrd DM, Lai SH., Wilson R. Arsenic in drinking water and bladder cancer mortality in the United States: an analysis based on 133 US counties and 30 years of observation. *J Occup Environ Med* 2004; 46: 298- 306.
- 21) Mahata J, Ghosh P, Sarkar JN, Ray K, Natarajan AT., Giri AK. Effect of sodium arsenite on peripheral lymphocytes in vitro: individual susceptibility among a population exposed to arsenic through in vivo. *Toxicol Sci* 2004; 76: 271- 279.
- 22) Soucy N, Ihnat M, Kamat C, Hess L, Post M, Klei L, Clark C, Barchowsky A. Arsenic stimulates angiogenesis and tumorigenesis in vivo. *Toxicol Sci* 2003; 76: 271- 279.
- 23) Snow E, Hu Y, Klein C, McCluskey K, Schuliga M, Sykora P. Regulation of redox and DNA repair genes by arsenic: low dose protection against oxidative stress? In: Chappel, W.R., Abernathy, C.O.2003.
- 24) Zhang TC, Schmitt MT, Mumford JL.Effects of arsenic on telomerase and telomeres in relation to cell proliferation and apoptosis in human keratinocytes and leukemia cells in vitro. *Carcinogenesis* 2003; 24: 1811 - 1817.
- 25) Snow ET, Sykora P, Durhama TR, Kleinb CB. Arsenic, mode of action at biologically plausible low doses: What are the implications for low dose cancer risk? *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 207: S557 - S564.
- 26) Smith KR, Klei LR, Barchowsky A. Arsenite stimulates plasma membrane NADPH oxidase in vascular endothelial cells. *Am J Physiol.*: Lung Cell. *Mol. Physiol* 2001; 280, L442- L449.
- 27) Bode AM., Dong ZG. The paradox of arsenic: molecular mechanisms of cell transformation and chemotherapeutic effects. *Crit Rev Oncol/Hematol* 2002; 42: 5 - 24.
- 28) Misra UK, Gawdi G, Pizzo SV. Beryllium fluoride-induced cell proliferation: a process requiring P21ras-dependent activated signal transduction and NF- κ B-dependent gene regulation *J Leukoc Biol.* 2002; 71: 487-494
- 29) Gordon T, Bowser D. Beryllium: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutat Res* 2003; 10: 533: 99-105.
- 30) Finch GL, Hoover MD, Hahn FF, Nikula KJ, Belinsky SA, Haley PJ, Griffith WC. Animal Models of Beryllium-induced Lung Disease. *Environ Health Perspect* 1996; 104S: 973-979.
- 31) Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C *Science* 1992; 258: 607-614.
- 32) Sankaran B, Bhagat S, Senior AE. Inhibition of P-glycoprotein ATPase activity by beryllium fluoride. *Biochemistry* 1997; 36: 6847-6853.
- 33) Keshava N, Zhou G, Spruill M, Ensell M, Ong TM. Carcinogenic potential and genomic instability of beryllium sulphate in BALB/c-3T3 cells. *Mol Cell Biochem* 2001; 222: 69-76.
- 34) Hamada H, Sawyer RT, Kittle LA, Newman LS. Beryllium-stimulation does not activate transcription factors in a mouse hybrid macrophage cell line. *Toxicology* 2000; 143: 249-261.
- 35) Sunderman FW Jr. Carcinogenic effects of metals. *Fed Proc.* 1978 Jan; 37: 40-6.
- 36) Elinder CG, Kjellström T, Hogstedt C, Andersson K, Spång G. Cancer mortality of cadmium workers. *Br J Ind Med* 1985; 42: 651-655.
- 37) Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res* 2003; 533: 107- 120.
- 38) Bertin G, Averbeck D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review) *Biochimie* 2006; 88; 1549-1559.
- 39) Waalkes MP. Cadmium carcinogenesis in review. *J. Inorg.Biochem* 2000; 79: 241-244.
- 40) Hartwig A, Schwerdtle T. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicol Lett* 2002; 127: 47-54.
- 41) Waisberg M, Joseph P, Hale B, Beyersmann D. Molecular and cellular mechanism of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003; 192: 95-117.
- 42) Liu J, Kadiiska MB, Corton JC, Qu W, Waalkes MP, Mason RP, Liu Y, Klaassen CD. Acute cadmium exposure induces stress-related gene expression in wild-type and metallothionein-I/II-null mice. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 525-35.
- 43) Zikic RV, Stajn AS, Ognjanovic BI, Saicic ZS, Kostic MM, Pavlovic SZ, Petrovic VM. The effect of cadmium and selenium on the antioxidant enzyme activities in rat heart. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 1998; 17.: 259-264
- 44) Misra RR, Crance KA, Bare RM, Waalkes MP. Lack of correlation between the inducibility of metallothionein oxidative stress. *Cell Biol Toxicol* 1997; 18: 29-42.
- 45) Ren A, Gao Y, Liu S.[Response of some protective enzymes in *Brassica chinensis* seedlings to Pb²⁺, Cd²⁺ and Cr⁶⁺ stresses] *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* 2002 Apr; 13: 510-2.
- 46) Grasseschi RM, Ramaswamy RB, Levine DJ, Klaassen CD, Wesseilus LJ. Cadmium accumulation and detoxification by alveolar macrophages of cigarette smokers. *Chest* 2003; 124: 1924-1928.
- 47) Takiguchi M, Achanzar WE, Qu W, Li G, Waalkes MP. Effects of cadmium on DNA-(cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp Cell Res* 2003; 286: 355-365.
- 48) Achanzar WE, Achanzar KB, Lewis JG, Webber MM, Waalkes MP. Cadmium induces c-myc, p53, and cjun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 164: 291-300.
- 49) Joseph P, Muchnok TK, Klshis ML, Roberts JR, Antonini JM, Whong WZ, Ong T. Cadmium-induced cell transformation and tumorigenesis are associated with transcriptional activation of c-fos, c-jun, and c-myc proto-oncogenes: role of cellular calcium and reactive oxygen species. *Toxicol Sci* 2001; 61: 295-303.
- 50) Thevenod F, Friedmann JM, Katsen AD, Hauser IA. Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappa_α activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 1887-1896.
- 51) Qu W, Fuquay R, Sakurai T. Waalkes MP. Acquisition of apoptotic resistance in Cadmium-induced malignant transformation: specific perturbation of JNK signal transduction pathway and associated Metallothionein over expression. *Mol Carcinog* 2006; 45: 561-571.
- 52) Prozialeck WC, Lamar PC, Lynch SM. Cadmium alters the localization of N-cadherin, E-cadherin, and-catenin in the proximal tubule epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 189: 180-195.
- 53) Shih CM, Wu JS, Ko WC, Wang LF, Wei YH, Liang HF, Chen YC, Chen TC. Mitochondria-mediated caspase-independent apoptosis induced by cadmium in normal human lung cells. *J Cell Biochem* 2003; 89: 335-347.
- 54) Nordberg GF, Biomarkers of exposure, effects and susceptibility in humans and their application in studies of interactions among metals in China. *Toxicol Letter*, in press
- 55) Nordberg GF, Jin T, Zhang A, Buchet JP, Bernard A. Biomarkers of cadmium and arsenic interactions. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005; 206: 191-197.
- 56) Kraus T, Schramel P, Schaller KH, Zöbelein P, Weber A, Angerer J. Exposure assessment in the hard metal manufacturing industry with special regard to tungsten and its compounds. *Occup Environ Med* 2001; 58: 631-4.
- 57) IARC, Chlorinated Drinking-water; Chlorination By-products; Some Other Halogenated Compounds; Cobalt and Cobalt Compounds, 1991, Vol. 51.
- 58) Merritt K, Brown SA, Sharkey NA. Blood distribution of nickel, cobalt, and chromium following intramuscular injection into hamsters. *J Biomed Mater Res* 1984; 18: 991-1004.
- 59) Zou W, Zeng J, Zhuo M, Xu W, Sun L, Wang J, Liu XJ. Involvement of caspase-3 and p38 mitogen-activated protein kinase in cobaltchloride-induced apoptosis in PC12 cells *Neurosci Res* 2002; 15; 67: 837-43.
- 60) Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *Biol Chem* 1994; 23; 269: 23757-63.

- 61) Karovic O, Tonazzini I, Rebola N, Edström E, Lövdahl C, Fredholm BB, Daré E. Toxic effects of cobalt in primary cultures of mouse astrocytes. Similarities with hypoxia and role of HIF-1 α . *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 694-708.
- 62) Battaglia V, Compagnone A, Bandino A, Bragadin M, Rossi CA, Zanetti F, Colombatto S, Grillo MA, Toninello A. Cobalt induces oxidative stress in isolated liver mitochondria responsible for permeability transition and intrinsic apoptosis in hepatocyte primary cultures. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 31.
- 63) Suzuki Y, Shimizu H, Nagae Y, Fukumoto M, Okonogi H, Kadokura M. Micronucleus test and erythropoiesis: effect of cobalt on the induction of micronuclei by mutagens. *Environ Mol Mutagen* 1993; 22: 101-6.
- 64) Lloyd DR, Phillips DH, Carmichael PL. Generation of putative intrastrand cross-links and strand breaks in DNA by transition metal ion-mediated oxygen radical attack. *Chem Res Toxicol* 1997; 10: 393-400.
- 65) Méplan C, Richard MJ, Hainaut P. Metalloregulation of the tumor suppressor protein p53: zinc mediates the renaturation of p53 after exposure to metal chelators in vitro and in intact cells. *Oncogene* 2000; 19: 5227-36.
- 66) Lison D, De Boeck M, Verougstraete V, Kirsch-Volders M. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup Environ Med* 2001; 58: 619-625.
- 67) Lison D, Lauwerys R. Study of the mechanism responsible for the elective toxicity of tungsten carbide-cobalt powder toward macrophages. *Toxicol Lett* 1992; 60: 203-10.
- 68) Lison D, Carbonnelle P, Mollo L, Lauwerys R, Fubini B. Physicochemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species. *Chem Res Toxicol* 1995; 8: 600-6.
- 69) De Boeck M, Lison D, Kirsch Volders M. Evaluation of the in vitro direct and indirect genotoxic effects of cobalt compounds using the alkaline comet assay. Influence of interdonor and interexperimental variability. *Carcinogenesis* 1998; 19: 2021-9.
- 70) International agency for research on cancer. Chromium, Nickel and Welding. Lyon, IARC 1990, Vol. 49.
- 71) Dayan A.D, Paine AJ. Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of literature from 1985 to 2000. *Hum Exp Toxicol* 2001; 20: 439-451.
- 72) De Flora S, Morelli A, Basso C, Romano M, Serra D, De Flora A. Prominent role of DT-diaphorase as a cellular mechanism reducing chromium(VI) and reverting its mutagenicity. *Cancer Res* 1985; 45: 3188-3196.
- 73) De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Zanacchi P. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res* 1990; 238: 99-172.
- 74) De Flora S. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1990; 21: 533-541.
- 75) Langård S. Chromium carcinogenicity; a review of experimental animal data. *Sci Total Environ* 1988; 71: 341-50.
- 76) De Flora S. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 533-541.
- 77) Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). Toxicological Profile for Chromium. 2008.
- 78) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA. The human relevance of information on carcinogenic modes of action: overview. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33: 581-9.
- 79) Gibb HJ, Lees PS, Pinsky PF, Rooneym BC. Lung cancer among workers in chromium chemical production. *Am J Ind Med* 2000; 38: 115-126.
- 80) Park RM, Bena JF, Stayner LT, Smith RJ, Gibb HJ, Lees PS. Hexavalent chromium and lung cancer in the chromate industry: a quantitative risk assessment. *Risk Anal* 2004; 24: 1099-1108.
- 81) De Flora S, Ittcheva M, Balansky RM. Oral chromium(VI) does not affect the frequency of micronuclei in hematopoietic cells of adult mice and of transplacentally exposed fetuses. *Mutat Res* 2006; 610: 38-47.
- 82) De Flora S, D'Agostini F, Balansky R, Micale R, Baluce B, Izzotti A. Lack of genotoxic effects in hematopoietic and gastrointestinal cells of mice receiving chromium(VI) with the drinking water. *Mutat Res* 2008; 659: 60-7.
- 83) Beyersmann D. Effect of carcinogenic metals on gene expression. *Toxicol Lett* 2002; 28: 63-68.
- 84) Sugden KD, Campo CK, Martin BD. Direct oxidation of guanine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine in DNA by a high-valent chromium complex: a possible mechanism for chromate genotoxicity. *Chem Res. Toxicol* 2001; 14: 1315-1322.
- 85) Arakawa H, Ahmad R, Naoui M, Tajmir-Riahi HA. A comparative study of calf thymus DNA binding to Cr(III) and Cr(VI) ions. Evidence for the guanine N-7-chromium-phosphate chelate formation. *J Biol Chem* 2000; 275: 10150-10153.
- 86) Bose RN, Moghaddas S, Mazzer PA, Dudones LP, Joudah L, Stroup D. Oxidative damage of DNA by Cr(VI) complexes: relative importance of base versus sugar oxidation. *Nucl Acids Res* 1999; 27: 2219-2229.
- 87) Valko M, Morris H, Cronin MTD. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr med chem* 2005; 12: 1161-1208.
- 88) Wang S, Shi X. Mechanisms of Cr(VI)-induced p53 activation: the role of phosphorylation, mdm2 and ERK. *Carcinogenesis* 2001; 22: 757-762.
- 89) Ha L, Ceryak S, Patierno SR. Chromium (VI) activates ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein. Requirement of ATM for both apoptosis and recovery from terminal growth arrest. *J Biol Chem* 2003; 16: 17885-17894.
- 90) Kiilunen M, Utela J, Rantanen T, Norppa H, Tossavainen A, Koponen M, Paakkulainen H, Aitio A. Exposure to soluble nickel in electrolytic nickel refining. *Ann Occup Hyg* 1987; 4: 167-88.
- 91) Valsania MC, Pavan I, Pira E. Specie cancerogene del nichel: esperienze analitiche su matrici ambientali. Atti del convegno nazionale, i valori di riferimento nella stima e gestione del rischio cancerogeno, 13 dicembre 2004, pp 56-60.
- 92) Zatka VJ, Warner JS, Maskery D. Chemical speciation of nickel in airborne dusts: analytical method and results of an interlaboratory test program. *Env Sci tecnol* 1992; 26: 138-144.
- 93) Oller AR. Respiratory Carcinogenicity Assessment of Soluble Nickel Compounds. *Environ Health Perspect* 2003; 110: 841-844.
- 94) Oller AR, Costa M, Oberdörster G. Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 143: 152-166.
- 95) Lee YW, Klein CB, Kargacin B, Salnikow K, Kitahara J, Dowjat K, Zhitkovich A, Christie NT, Costa M. Carcinogenic nickel silences gene expression by chromatin condensation and DNA methylation: a new model for epigenetic carcinogens. *Mol Cell Biol* 1995; 15: 2547-57.
- 96) Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem* 2004; 279: 40337-40344.
- 97) Semenza GL, Wang GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 721-732.
- 98) Salnikow K, Kasprzak KS. Nickel Ascorbate Depletion: A Critical Step in Nickel Carcinogenesis? *Environ Health Perspect* 2005; 113: 577-584.
- 99) Savolainen H. Biochemical and clinical aspects of nickel toxicity. *Rev Environ Health* 1996; 11: 167-73.
- 100) Lu H, Shi X, Costa M, Huang C. Carcinogenic effect of nickel compounds. *Mol Cell Biochem* 2005; 279: 45-67.
- 101) Kasprzak KS, Sunderman FW Jr, Salnikow K. Nickel carcinogenesis. *Mutat Res* 2003; 533: 67-97.
- 102) Hu W, Feng Z., Tang MS. Nickel (II) enhances benzo[a]pyrene diol epoxide-induced mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism. for nickel (II)-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004; 25: 455-462.
- 103) Oller AR, Costa M, Oberdörster G. Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997; 143: 152-66.