

P. Apostoli, S. Catalani

## Meccanismi di azione cancerogena per elementi metallici e loro specie classificati R40 - Parte 3

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

**RIASSUNTO.** In questa parte del contributo sulla cancerogenesi degli elementi metallici vengono trattati i meccanismi di azione di antimonio, piombo, vanadio e loro specie classificati da UE come R40, anche se considerati in modo differente rispetto alla loro probabile o possibile cancerogenicità dalle diverse Agenzie o Società Scientifiche che se ne sono occupate.

Anche per questi elementi e loro specie l'effetto cancerogeno dipende dalla capacità dell'elemento di passare attraverso le membrane cellulari e di interagire con i siti target a seconda dello stato di ossidazione, carica, solubilità, proprietà di legame, struttura stereochimica. Si conferma anche per i tre elementi esaminati un'assente o modesta azione genotossica diretta, l'importanza di induzione di stress ossidativo, inibizione dei meccanismi di riparazione del DNA, alterazione dei segnali di trasduzione e la modificazione dell'espressione genica con interazioni molecolari diverse per ogni elemento-specie. Una particolare attenzione è stata posta all'esame della possibile-probabile azione cancerogena del piombo anche alla luce dell'ultima classificazione IARC che ha spostato l'elemento dal gruppo 2B a quello 2A, con non irrilevanti potenziali conseguenze per le future decisioni dell'UE in merito all'attribuzione della frase di rischio.

Gli studi sui meccanismi di azione di antimonio, piombo, vanadio hanno inoltre confermato l'ipotesi che gli elementi metallici possano agire in combinazione ad esempio con cancerogeni organici. Tale effetto che deriva soprattutto dalla loro capacità di interferire con i processi di riparazione del DNA.

**Parole chiave:** piombo, vanadio, antimonio, loro specie, cancerogenesi, meccanismi di azione diretti ed indiretti.

**ABSTRACT. MECHANISMS OF ACTION FOR METALLIC ELEMENTS AND THEIR SPECIES CLASSIFIED AS R40 BY EU.** In this part of our survey we dealt with other metallic elements and species (antimony, lead and vanadium) classified by EU as R40 and not with the risk phrases R45 and R49. They are also differently considered by different Agency and Scientific Societies in respect to their carcinogenicity.

Also for Pb, Sb, V and related species the carcinogenic effect is related with oxidation state, charge, the solubility, type of binding, stereochemistry. Some common mechanisms of carcinogenesis are the induction of oxidative stress, to inhibition of DNA repair, from activation of mitogenic signalling, to epigenetic modification of gene expression and each species lead to specific molecular interactions and were subject to different bioavailability.

We focused in particular the mechanisms of action for lead, element moved in last IARC examination from group 2B to group 2A, with important potential consequences for EU classification. In general for metallic elements even differently classified in respect to their carcinogenicity, knowledge of action mechanisms would give additional tools to reach more adequate risk assessment procedures and the preventive-health surveillance measures.

**Key words:** lead, vanadium, antimony, their species, direct and indirect mechanisms of carcinogenic action.

### Introduzione

Questa ultima parte della rassegna sulla cancerogenicità degli elementi metallici tratta dei meccanismi di azione di antimonio, piombo, vanadio e loro specie non ancora classificati R45 o R49, ma variamente considerati dalle diverse Agenzie e Società Scientifiche internazionali (1).

Come riportato nella parte generale, la frase di rischio generalmente loro attribuita è R40 "Possibilità di effetti cancerogeni - prove insufficienti". Su di essi si richiama l'attenzione in quanto "considerati preoccupanti per l'uomo, a causa dei loro possibili effetti cancerogeni" e sono contrassegnati almeno dal simbolo e dall'indicazione di composto o sostanza "nocivo". Per i preparati valgono le stesse indicazioni quando contengano almeno una sostanza con la frase che caratterizza sostanze cancerogene di categoria 3.

Una particolare attenzione verrà riservata al piombo, elemento ben noto alla tossicologia industriale ed ambientale e la cui possibile azione cancerogena è stata oggetto di dibattito negli ultimi 10 anni.

Nell'esposizione verrà seguito anche per antimonio, piombo e vanadio lo schema utilizzato in precedenza, completando così, si spera utilmente per il lettore, la tematica della cancerogenicità degli elementi metallici.

### Antimonio (Sb)

Per le sue proprietà fissative, indurenti e di resistenza al calore l'antimonio è attualmente utilizzato in composizione con altre sostanze nella produzione di: ceramiche, vetro, coloranti, fuochi pirotecnici, semiconduttori, materiali resi resistenti al calore quali tessuti (ad esempio per interni di autoveicoli), plastica, gomma, carta e nell'industria elettrica. Ne è stato anche proposto l'impiego al posto dell'arsenico nella produzione del vetro.

Pochi sono gli studi sulla cancerogenicità dell'antimonio non solo per il suo ridotto impiego nelle attività lavorative e la relativamente scarsa presenza tra i componenti della crosta terrestre, ma anche per la sua frequente associazione con l'arsenico e la conseguente difficoltà nel discriminarlo (2). Simili sono anche le caratteristiche tossicocinetiche: ad esempio l'antimonio trivalente penetra nelle cellule animali allo stesso modo dell'arsenico trivalente.

Come l'arsenico trivalente l'antimonio trivalente (come il potassio antimonio tartrato, PAT), induce una tossicità mediata da stress ossidativo su culture di micociti producendo direttamente ROS, attraverso trasformazioni cellulari in grado di formarle (3). L'esposizione a PAT è associata a una perdita di potenziale di membrana mitocondriale. Tuttavia, diversamente dall'arsenico è anche in grado di generare apoptosi senza l'attivazione delle caspasi (4).

Le specie trivalenti e quelle pentavalenti dell'antimonio sono risultate negative ai test di genotossicità su cellule non mammifere mentre su cellule mammifere l'Sb(III) è risultato debolmente genotossico. Dati contrastanti hanno fornito gli studi sulla capacità del triossido di antimonio ( $Sb_2O_3$ ) di indurre aberrazioni cromosomiche (5,6).

L'arsenico trivalente è più citotossico e più potente nell'induzione di micronuclei nei linfociti umani rispetto all'antimonio. Un significativo aumento della frequenza di micronuclei si ottiene con una concentrazione  $0.5\mu M$  di As(III) e di  $5\mu M$  di Sb(III).

Il numero di micronuclei indotti da entrambi gli elementi non possono essere soppressi da una co-incubazione di superossido dismutasi o catalasi. Questo dimostrerebbe che l'induzione del danno al DNA avviene soprattutto in seguito a stress ossidativo.

Alcuni autori, attraverso studi *in vitro*, hanno evidenziato che l'esposizione combinata ad arsenico e antimonio abbia un effetto additivo (7), al contrario di Gebel et al (8) hanno sostenuto che l'Sb(III) riduce l'induzione di micronuclei *in vitro* causata dall'arsenico, probabilmente per affinità competitiva sui gruppi sulfidrilici e una inibizione non competitiva dell'assorbimento cellulare.

L'esposizione per inalazione di alcune specie dell'antimonio è stata messa in relazione all'induzione di tumori polmonari su roditori e in lavoratori di fonderie di metalli non ferrosi. In questo caso è tuttavia difficile escludere la simultanea esposizione con altri composti cancerogeni tipici di questa attività produttiva, arsenico in particolare (9).

---

## Piombo (Pb)

Il piombo riveste nella tossicologia occupazionale ed ambientale un ruolo di assoluto rilievo non solo per la sua diffusione particolarmente rilevante nell'800 e 900, per i molteplici quadri patologici acuti subacuti e cronici per vari organi ed apparati, ma anche perché su di esso sono state messe a punto alcune delle fondamentali metodologie per il dosaggio degli indicatori biologici di dose e di effetto. Attualmente il rischio di esposizione lavorativa a piombo si concentra in alcune attività come produzione di accumulatori, fusione del piombo, produzione di leghe metalliche come il bronzo, che lo contengono in diversa percentuale, taglio e saldatura, fusione di oggetti contenenti piombo o ricoperti con vernice al piombo. Nell'ambiente generale dopo la sua drastica riduzione nelle benzine (vale la pena di ricordarlo per prevenire gli effetti sulle capacità di apprendimento e più in generale sullo sviluppo cognitivo dei bambini) si ritrova ancora, seppure in concentrazioni minori, in aria suoli ed alimenti.

Gli effetti di tipo a mutageno e cancerogeno del piombo nell'uomo sono stati oggetto di ampio e spesso contrastato dibattito negli ultimi decenni: le maggiori critiche hanno riguardato una non adeguata considerazione del diverso comportamento fra i vari sali e specie del metallo; la perdurante carenza di adeguate misure dell'esposizione assorbimento pur disponendo da almeno 20-25 anni dell'indicatore biologico principe nel monitoraggio delle dosi degli elementi metallici quale la piombemia; per le discrepanze tra evidenze umane e quelle in animali da esperimento ad esempio in relazione agli organi bersaglio; perché in alcuni casi gli studi epidemiologici utilizzati per il piombo lo erano stati anche per altri elementi metallici come arsenico e cadmio.

Alcuni di questi limiti residuano anche nell'ultima rassegna IARC, che ha rivisto la classificazione del piombo da 2B a 2A (10) ed il loro peso dovrebbe essere attentamente valutato se si pensa ai meccanismi con cui l'UE attribuisce le frasi di rischio, in passato attribuite anche a sostanze o composti 2A e non solo ai cancerogeni certi di classe 1.

Il punto di partenza è a nostro avviso che, nonostante la notevole mole di studi condotti non è stato del tutto ed in modo convincente chiarito con quale meccanismo cancerogeno il piombo agirebbe.

Si afferma anzitutto che il piombo possiede un debole potere mutageno, pur a fronte di evidenze su una sua inibizione della sintesi del DNA e/o della sua riparazione e di una azione sinergica con altri agenti mutageni e cancerogeni (11,12).

I meccanismi coinvolti nella cancerogenesi del piombo sono molteplici e peculiari delle diverse specie coinvolte. Al riguardo le specie maggiormente studiate sono state il piombo acetato, subacetato e fosfato per tumori renali, il piombo acetato/subacetato per i gliomi e il piombo subacetato per adenomi polmonari. Diversi sono gli animali e le vie di somministrazione necessarie per la loro manifestazione (13,14). Il piombo ossido intratracheale, induce metaplasie alveolari e proliferazione adenomatosa nei polmoni di criceti e aumenta l'azione cancerogena del benzo(a)pirene (15). Effetti mitogenici più recenti sono stati osservati sul fegato di ratto in seguito ad esposizione a piombo nitrato e l'implicazione del piombo monossido nella patogenesi di adenoma polmonare nel polmone dei conigli (16, 17).

L'importanza di studi sperimentali per le patologie tumorali sull'uomo è di difficile valutazione, a causa non solo delle prevedibili difficoltà nel trasferimento all'uomo dei risultati *in vitro* o di quelli sulle diverse specie animali, ma per le differenti specie di piombo usate nella sperimentazione e coinvolte nell'esposizione: quella umana occupazionale ed ambientale ad esempio è prevalentemente collegata all'inalazione di piombo ossido.

Il diverso comportamento di quattro sali di piombo (acetato, cloruro, monossido e solfato) è stato, ad esempio, oggetto di una specifica indagine *in vitro*, indagando alcuni effetti citotossici e le comunicazioni intercellulari (GJIC) rispettivamente attraverso saggi di densità/proliferazione cellulare e saggi dye-transfer (18). L'effetto è stato valutato *in vitro* su linee cellulari epatiche di ratto note

per essere molto sensibili agli agenti promotori tumorali. Ogni specie del piombo testata ha mostrato effetti sulla proliferazione cellulare anche se con dosi e tempi differenti, ma nessuna si è dimostrata attiva sulle trasmissioni GJIC, classico indicatore di promozione tumorale.

Tutto ciò è risultato in linea con quanto dimostrato da altri autori che hanno studiato differenti sistemi *in vitro* e che a basse dosi non citotossiche di composti inorganici del piombo non hanno osservato alterazioni delle giunzioni cellulari (19-21).

Un ulteriore importante aspetto emerso dallo studio sopra richiamato (18) è stato quello della necessità di una corretta definizione delle concentrazioni di piombo nelle soluzioni che entrano effettivamente in contatto con i target che si vogliono indagare, considerata la capacità del metallo di formare complessi con anioni come Cl<sup>-</sup> e OH<sup>-</sup> e la formazione di precipitati come Pb(OH)<sub>2</sub> e Pb<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>.

La capacità del piombo di indurre danni cromosomici è stata oggetto di particolare attenzione nel secolo scorso. Si può al riguardo citare la revisione di Forni del 1980 (22). L'autrice esaminando tutti gli studi disponibili su uomo e mammiferi aveva notato evidenze contrastanti per le aberrazioni cromosomiche e per quelle cromosomiche, la cui spiegazione poteva, a sua detta, essere ricondotta a cambiamenti indotti dal piombo o suoi metaboliti nei terreni delle colture linfocitarie.

Negli anni successivi sono stati approfonditi gli aspetti dell'interazione piombo-DNA, indagando i livelli di rotture del singolo filamento di DNA (single strand breaks, SBB) in cellule ematiche mononucleari umane, anche se da solo non sembra in grado di procurare DNA-SBB.

Groot de Restrepo (23) hanno studiato la relazione fra queste rotture e i processi di riparazione del DNA dopo una esposizione *in vitro* di raggi X attraverso il Comet Assay, concludendo che il DNA-SBB in seguito ad irradiazione non è influenzato dalle concentrazioni di piombo. Il metallo sembra sensibilizzare le cellule al danno indotto da altri genotossici.

Il meccanismo di azione del piombo deve essere considerata anche in termini di dose; a alte concentrazioni il piombo può legare il DNA e cambiarne la conformazione (24), oltre che rompere acidi nucleici (25,26).

Vaglenov et al (27) e Minozzo et al (28) hanno dimostrato un significativo aumento della frequenza di micronuclei in esposti, Palus et al (29) riportano un'incidenza di micronuclei nei linfociti di esposti (con una PbB tra 280 e 655 µg/L) rispetto ai controlli (PbB tra 17 e 188 µg/L).

Ai dati sui danni cromosomici formulate in passato (30,31) si sono aggiunti quelli di studi sperimentali ed epidemiologici successivi che hanno mostrato evidenze già a basse dosi. Nel passato si ipotizzava che fosse un danno tissutale ad indurre una proliferazione cellulare, responsabile a sua volta di tumore ad esempio renale. Gli studi più recenti hanno chiaramente dimostrato che il piombo può indurre tumori a esposizioni inferiori di quelle che provocano danni tissutali negli organi target; questo è anche supportato dal fatto che gli organi nei quali il piombo induce proliferazione cellulare sono differenti da quelli in cui compare il tumore (32).

È tuttavia ormai accettato che la genotossicità diretta

del piombo avvenga solo a dosi citotossiche (33,34). *In vitro* l'esposizione sub-citotossica non induce crosslink a proteine del DNA, o aumenti nella frequenza di scambi di cromatidi fratelli in cellule trattate V79 (35).

Da differenti studi sperimentali emergono forti indicazioni in merito al coinvolgimento delle specie reattive dell'ossigeno nella genotossicità piombo-indotta.

Il piombo aumenta la produzione di perossido di idrogeno attraverso reazione Fenton-simile (36,37). L'interazione del piombo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è inibita dal sodioazide, EDTA, catalasi e glutazione (suggerendo una indipendenza sia dai radicali liberi che dal metallo) e potenziato dal mannitolo e dalla super ossido dismutasi.

Oltre a causare deplezione di glutazione e una up-regulation degli enzimi GST, spesso accompagnati da marker di stress ossidativo come la malondialdeide (38).

Come noto il piombo ha capacità di legarsi a proteine zinco-dipendenti e di cambiare la struttura conformazionale dell'eme per inibizione dell'acido aminolevulinico deidratasi (39).

Attraverso una interazione simile verso il gruppo cisteina-istidina delle proteine leganti lo zinco il piombo può spostare lo zinco e legarsi alle proteine zinc-finger alcune delle quali legate al DNA. Il piombo può avere effetti cancerogeni attraverso danni al DNA o attraverso l'inibizione dei meccanismi di riparazione o il *displacing* dello zinco nei legami DNA-proteine. Entrambi gli eventi sono importanti alla luce della protezione del DNA dagli insulti mutageni.

Molti studi di coorte su piombo e tumore, soprattutto in popolazioni di esposti professionalmente, sono limitati dalla mancanza di identificazione di controlli e covariate, soprattutto co-esposizioni ad altri agenti cancerogeni come fumo di sigaretta o altri metalli, presenti nelle stesse attività produttive, come quelle in cui erano presenti cadmio o arsenico (40).

Come visto a basse dosi il piombo non appare direttamente genotossico né *in vivo* né *in vitro*; questo ha portato a valorizzare il ruolo del piombo come un cancerogeno "facilitativo" o "permissivo" nei confronti di altri agenti, attraverso vari meccanismi fra cui l'inibizione della sintesi del DNA e la riparazione, il danno ossidativo, l'interazione con proteine leganti il DNA e proteine *soppressore* dei tumori (41).

I composti del piombo sono noti essere co-mutageni con altri agenti come raggi X, radiazioni UV, benzo(a)pirene, N-etil-N-idrossietilnitrosamina, N-4-fluoro-bifenilacetamide (14, 32).

Per concentrazioni di piombo nell'aria tra 1.5-50 µg/m<sup>3</sup>, in presenza di cobalto (8µg/m<sup>3</sup>) e cadmio (3.8µg/m<sup>3</sup>) si ha un aumento di almeno 5 volte nella formazione di DNA-SBB (42).

Il meccanismo che può spiegare questa interazione è una inibizione dei meccanismi di riparazione dei danni ossidativi al DNA, poiché un calo della capacità di riparazione può aumentare la suscettibilità ai ROS generati da cobalto, meccanismo che può spiegare anche la co-esposizione di piombo e agenti genotossici e mutageni, comprese radiazioni UV, radicali liberi, mutageni chimici così come l'interazione con inquinanti ambientali ubiquitari, pre-

sentiti in molti ambienti di lavoro e vita generale e composti presenti in miscele di inquinamento dell'aria e fumo di sigarette (14).

---

## Vanadio (V)

Circa l'85% del vanadio è utilizzato nella produzione di leghe e acciai speciali, il vanadio pentossido è anche un importante catalizzatore in industrie chimiche organiche e inorganiche (es nella produzione di acido solforico e materie plastiche) oltre che essere utilizzato in pigmenti e inchiostri dell'industria ceramica.

La possibile cancerogenesi del vanadio deve ancora essere definita in modo esaustivo. Sulla base di una sufficiente evidenza di cancerogenicità del pentossido di vanadio nella sperimentazione animale ed in assenza di informazioni relative alla correlazione tra esposizione al metallo e cancro umano, la IARC ha valutato il pentossido di vanadio come possibile cancerogeno per l'uomo (43) e l'UE gli attribuisce frase di rischio R68 (può causare danni irreversibili) La genotossicità dei composti del vanadio è mediata da meccanismi di induzione dello stress ossidativo, inibizione meccanismi di riparazione del DNA e interferenza con l'attività di proteine fosfatasi e chinasi.

Il vanadio pentossido è in grado di indurre danni ossidativi verso siti e rottura dei filamenti del DNA. L'inibizione della polimerizzazione dei microtubuli può essere spiegato attraverso l'effetto aneugenico, a carico del numero di cromosomi. Se questi effetti sono correlati a danni ossidativi o ad una interazione diretta dei cationi del vanadio non è chiara.

Il vanadio può inoltre aumentare la genotossicità di altri agenti genotossici, l'aumento dell'attività di fattori di trascrizione e dell'espressione genica si traduce in un aumento della trasformazione e proliferazione cellulare.

L'effetto indiretto attraverso l'inibizione di diversi enzimi coinvolti nella sintesi del DNA e nella riparazione contribuisce alla sua genotossicità. L'induzione di mutazioni dominanti letali nei topi può essere il risultato di uno o della combinazione di meccanismi sopra citati. Il vanadio è in grado di stimolare la differenziazione cellulare, di causare danni cellulari e al DNA attraverso la generazione di ROS e di alterare l'espressione genica.

Il vanadio pentossido è mutageno *in vitro* e probabilmente *in vivo* su topi. Sono state dimostrate attività aneugeniche e clastogeniche su culture cellulari mammifere. Dati sugli effetti genetici negli umani esposti a vanadio pentossido sono scarsi.

Gli studi sperimentali che si sono occupati dell'apoptosi indotta dal vanadio hanno dimostrato che la produzione dei ROS gioca un ruolo primario nell'induzione di questa risposta cellulare (44-46). Il danno a carico del DNA comporta delle modificazioni post-traslazionali a carico del fattore di trascrizione p53, il quale una volta attivato favorisce l'espressione di numerosi geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, nella riparazione del DNA e nell'apoptosi. L'attivazione del fattore di trascrizione p53 rappresenterebbe quindi la principale via metabolica coinvolta nell'apoptosi indotta dal vanadio, anche se rimane da

chiarire quali siano i geni da esso indotti (47). Un meccanismo molecolare, indipendente dall'attivazione del p53, che può favorire il programma apoptotico è rappresentato dall'alterazione della funzionalità mitocondriale.

Il vanadio è un inibitore aspecifico delle tirosin-fosfatasi (PTPs), l'inibizione esercitata nei confronti di questi enzimi può essere, a seconda della specie chimica del metallo, reversibile o irreversibile. L'inibizione di questa classe enzimatica comporta un aumento dell'attività chinasi intracellulare che a sua volta provocherebbe l'attivazione di diverse vie metaboliche in grado di garantire la sopravvivenza della cellula. Questo risulta essere il principale meccanismo molecolare sfruttato dal metallo per indurre una risposta di sopravvivenza cellulare (48,49).

Il vanadio è quindi in grado di causare risposte cellulari divergenti, lo stress ossidativo generato dalla riduzione intracellulare del metallo sarebbe il principale responsabile dell'attivazione delle vie metaboliche che conducono all'apoptosi. Il destino delle cellule può essere influenzato dalla concentrazione dello xeno biotico, poiché basse dosi di esposizione sono associate ad una risposta cellulare di sopravvivenza mentre dosi più elevate facilitano la trasduzione del segnale apoptotico. La diversa efficacia e durata dell'inibizione sulle PTPs, che è funzione della specie chimica del metallo a cui le cellule sono esposte, potrebbe suscitare risposte cellulari divergenti.

Nonostante i numerosi studi sul vanadio, non è stato ancora possibile definire il potenziale cancerogeno del metallo e rimane da chiarire la relazione tra esposizione ed apoptosi cellulare.

Oltre all'azione genotossica il vanadio può contribuire ad aumentare l'azione lesiva di altri composti (es UV) attraverso l'inibizione dei meccanismi di riparazione del DNA e influenza sulla proliferazione cellulare.

---

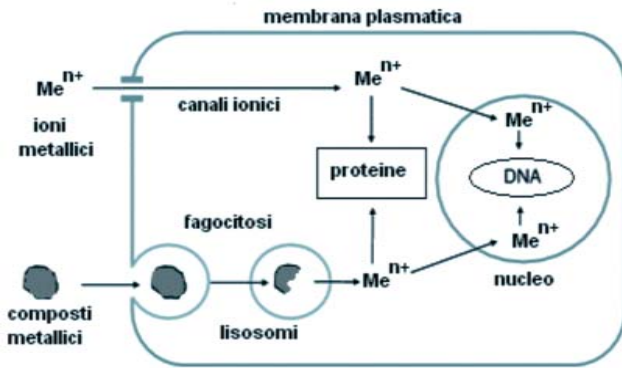
## Discussioni e conclusioni

La cancerogenicità degli elementi metallici è regolata dalle proprietà fisico-chimiche dell'elemento che può trovarsi come ione libero o come complesso a diversa solubilità.

I principali parametri da considerare sono lo stato di ossidazione, la carica elettrica, il numero di coordinazione, la conformazione sterica e il tipo di legame. Per quanto riguarda i composti scarsamente solubili entrano in gioco fattori come le dimensioni delle particelle e la loro struttura cristallina.

In generale la tossicità degli elementi metallici, delle loro specie e composti dipende in gran parte dalla loro biodisponibilità (figura 1), ossia dai meccanismi che regolano la diffusione attraverso le membrane cellulari, la distribuzione intracellulare e il legame a macromolecole cellulari.

Gli elementi metallici entrano nelle cellule o attraverso specifici canali cellulari adiuvati da carrier o per fenomeni di fagocitosi. Le specie anioniche ad esempio del cromo o del vanadio penetrano facilmente nelle cellule attraverso canali ionici delle membrane. Molti elementi metallici nella forma di cationi bivalenti possono passare at-



**Figura 1. Biodisponibilità degli elementi metallici: Uptake cellulare, distribuzione intracellulare e possibili siti dei legami (50, modificato)**

traverso la membrana plasmatica sfruttando trasportatori cationici, mentre la membrana è impermeabile ad altri, come gli ioni trivalenti del cromo.

Specie moderatamente o poco solubili possono attraversare la membrana per fagocitosi, meccanismo che porta ad un notevole accumulo citoplasmatico a seguito della graduale dissoluzione nei lisosomi.

Una volta all'interno della cellula la forma ionica condiziona il legame con macromolecole cellulari, proteine e la penetrazione nel nucleo.

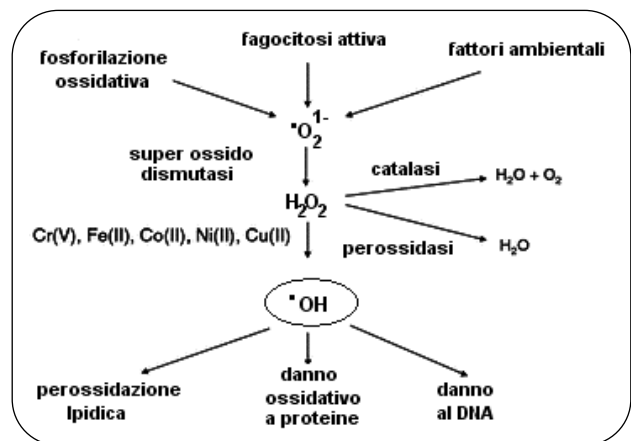
È difficile individuare un meccanismo unico o generale per comprendere i possibili meccanismi di azione una volta raggiunti i target sub cellulari o cellulari degli elementi metallici. Tuttavia è possibile tentare un loro raggruppamento in tre grandi aree lo stress ossidativo; la modulazione dei meccanismi di riparazione del DNA; le variazioni nelle trasduzioni dei segnali cellulari (figura 2).

Ad esse va aggiunta l'area della co-cancerogenesi che richiede la presenza di altri composti cancerogeni organici e non.

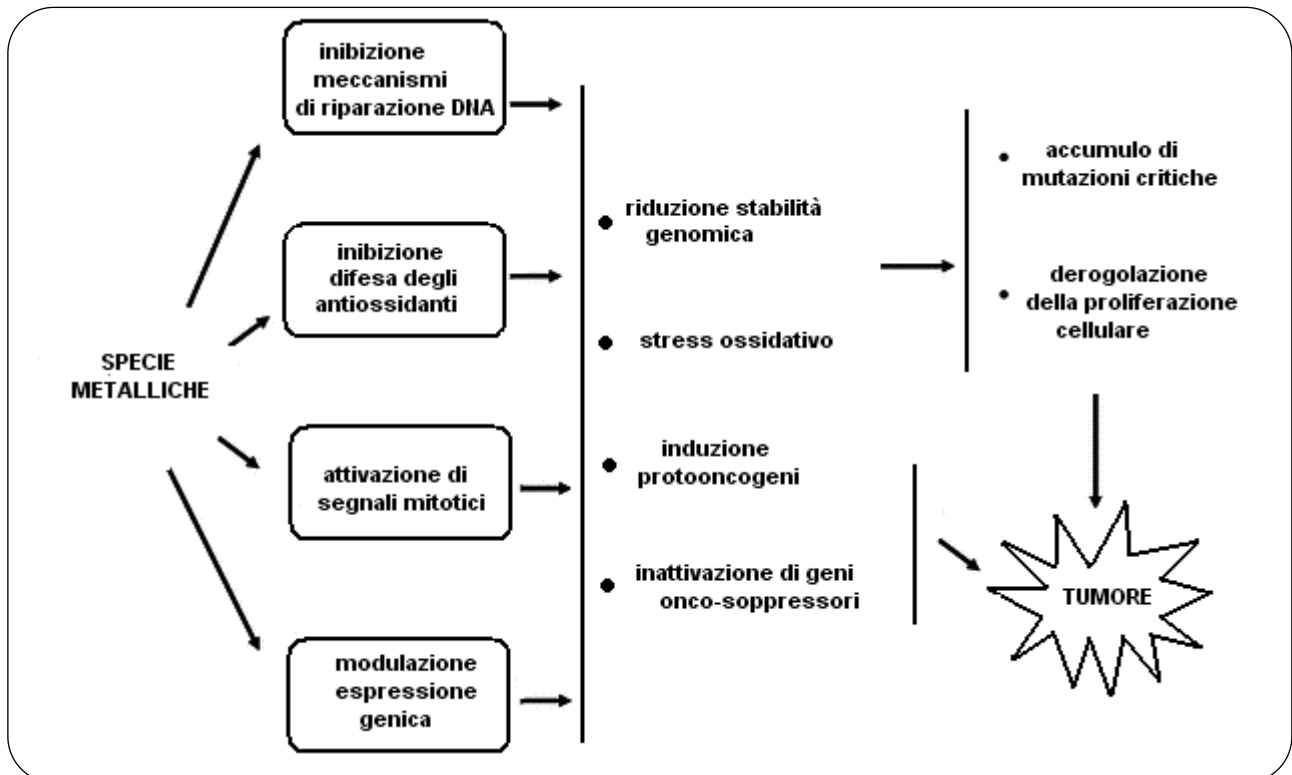
L'induzione di stress ossidativo è forse l'ipotesi di meccanismo d'azione più condivisa e che può spiegare alcuni effetti mutageni e cancerogeni degli elementi metallici.

Gli ioni di elementi metallici come antimonio, arsenico, cromo, cobalto, nichel e vanadio sono in grado di formare ROS in cellule di mammifero *in vivo* ed *in vitro* solitamente attraverso reazioni Fenton e Haber-Weiss simili, mediante formazione di radicali idrossilici da perossido di idrogeno, radicali questi noti per causare danni ossidativi a lipidi, proteine e DNA (Figura. 3).

Il cadmio, invece, sembra seguire una strada diversa generando ROS attraverso l'inibizione di enzimi antiossidanti come le catalasi, la superossido-dismutasi, la glutazione reduttasi e perossidasi.



**Figura 3. Ioni metallici e stress ossidativo (50, modificato)**



**Figura 2. Principali meccanismi della cancerogenicità degli elementi metallici (50, modificato)**

La maggiore obiezione all'ipotesi dello stress ossidativo è la discrepanza fra le concentrazioni alte e spesso citotossiche di metalli necessarie per indurre ROS e l'aumento di danno cellulare in grado di indurre tumori a volte anche a basse dosi dell'elemento metallico.

Come ripetutamente ricordato gli elementi metallici sono considerati deboli mutageni su cellule di mammifero, spesso inattivi in studi su batteri.

Si dovrebbe quindi pensare che essi agiscano con meccanismi indiretti a volte come co-mutageni o co-cancerogeni di altri agenti chimici o fisici.

Alcuni elementi metallici o loro specie inibiscono già a basse concentrazioni le riparazioni dei danni al DNA indotti da xenobiotici o da fattori endogeni (51). L'inibizione dei meccanismi di riparazione e il persistere del danno al DNA porta ad una instabilità genomica più pericolosa in condizioni di accelerata proliferazione delle cellule e/o apoptosi.

Gli elementi metallici cancerogeni possono modificare la crescita delle cellule in seguito a diversi meccanismi distinti che riguardano sia l'espressione di fattori di crescita che l'inattivazione dei meccanismi di controllo.

Alcuni ioni metallici sono in grado di attivare segnali mitogenici e indurre l'espressione di proto-oncogeni cellulari. Inoltre, i meccanismi epigenetici, come ipometilazione del DNA o l'acetilazione degli istoni, possono a loro volta contribuire a modificare i modelli di espressione genica.

Per quanto riguarda le interferenze sul controllo della crescita cellulare, alcuni elementi metallici cancerogeni sono in grado di inattivare la proteina soppressore tumorale p53 e/o inibire l'espressione genica di onco-soppressori come Fhit, p16, p53.

Infine, ioni metallici possono alterare la proliferazione cellulare attraverso l'inibizione dei processi di apoptosi in seguito all'azione citotossica del metallo.

La raccolta delle informazioni inerenti ai meccanismi di azione attraverso cui gli elementi metallici considerati cancerogeni esplicano tale effetto oltre a contribuire alla diffusione della conoscenza sull'argomento può dare preziose indicazioni di tipo pratico.

Come noto la valutazione del rischio e i relativi provvedimenti preventivi e di sorveglianza in presenza di agenti cancerogeno incontrano della oggettive difficoltà, per l'inquadramento generale delle quali e per le indicazioni operative delle quali si rimanda alla revisione 2006 delle linee guida SIMLII sulla sorveglianza degli esposti a cancerogeni in ambito occupazionale (52).

In questa sede e per concludere vogliamo sottolineare il ruolo rilevante che nell'articolazione delle misure da adottare in generale per gli elementi metallici ed in particolare per quelli variamente classificati come cancerogeni ha il monitoraggio biologico.

Esso è ormai ampiamente accessibile a livelli di qualità analitica ed interpretativa del tutto adeguate per tutti gli elementi metallici cancerogeni, per alcuni è anche possibile procedere ad altrettante adeguate procedure di speciazione.

Decisivo in questo contesto è il confronto dei risultati del monitoraggio biologico con i valori di riferimento in quanto si può avere la dimostrazione di una esposizione

diversa da quella della popolazione generale, con la cui incidenza dei tumori si valuta quella nei gruppi di esposti per deciderne eccessi significativi. Non si dovrebbero più accettare su riviste scientifiche contributi che trattano di esposizioni ed effetti di elementi metallici (cancerogeni) in cui non siano riportati adeguate informazioni sul monitoraggio biologico degli esposti.

Una valutazione dell'esposizione accurata, possibilmente con indicatori biologici, appare ancora più tassativa quando si tratti di valutare eventuali co-esposizioni ad altri cancerogeni organici.

---

## Bibliografia

- 1) Apostoli P, Catalani S. Carcinogenicity of Metallic Elements: general considerations about their identification and monitoring and about their main mechanisms of action. Part 1: general aspects. *G Ital Med Lav Ergon* 2008; 30: 186-191.
- 2) Gebel T, Christensen S, Dunkelberg H. Comparative and environmental genotoxicity of antimony and arsenic. *Anticancer Res* 1997; 17: 2603-7.
- 3) Tirmenstein MA, Plews PI, Walker CV, Woolery MD, Wey HE, Toraason MA. Antimony-induced oxidative stress and toxicity in cultured cardiac myocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; 130: 41-7.
- 4) Lecureur V, Lagadic-Gossman D, Fardel O. Potassium antimonyl tartrate induces reactive oxygen species-related apoptosis in human myeloid leukemic HL60 cells. *Int J Oncol* 2002; 20: 1071-1076.
- 5) De Boeck M, Kirsch-Volders M, Lison D. Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutat Res* 2003; 533: 135-52.
- 6) Gebel T. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. *Chemic biol interact* 1997; 107: 131-144.
- 7) Schaumlöffel N, Gebel T. Heterogenicity of the DNA damage provoked by antimony and arsenic. *Mutag* 1998; 13: 281-286.
- 8) Gebel T. Suppression of arsenic-induced chromosome mutagenicity by antimony. *Mutat Res* 1998; 412: 213-8.
- 9) Tylenda CA, Fowler BA. Antimony. In *Handbook on the toxicology of metals*, third Edition. Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, Fowler BA, Chou CHS, Jones RL, Chen CJ. Burlington USA. Elsevier. 2007; 353-362.
- 10) IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. *Inorganic and Organic Lead Compounds*. Volume 87; 2006.
- 11) Zelikoff J, Li JH, Hartwig A, Wang XW, Costa M, Rossman TG. Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis* 1988; 9: 1727-1732.
- 12) Roy N, Rossman T. Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutat Res* 1992; 298: 97-103.
- 13) Shirai T, Ohshima M, Masuda A, Tamano S, Ito N. Promotion of 2-(ethylnitrosamino)ethanol-induced renal carcinogenesis in rats by nephrotoxic compounds: positive responses with folic acid, basic lead acetate, and N-(3,5-dichlorophenyl)succinimide but not with 2,3-dibromo-1-propanol phosphate. *J Natl Cancer Inst* 1984; 72: 477-82.
- 14) Silbergeld EK. Facilitative mechanisms of lead as a carcinogen. *Mutat Res* 2003; 533: 121-133.
- 15) Kobayashi N, Okamoto T. Effects of lead oxide on the induction of lung tumors in Syrian hamsters. *J Natl Cancer Inst* 1974; 52: 1605-10.
- 16) Zelikoff JT, Parsons E, Schlesinger RB. Inhalation of particulate lead oxide disrupts pulmonary macrophage-mediated functions important for host defense and tumor surveillance in the lung. *Environ Res* 1993; 62: 207-22.
- 17) Shinozuka H, Ohmura T, Katyal SL, Zedda AI, Ledda-Columbano GM, Columbano A. Possible roles of nonparenchymal cells in hepatocyte proliferation induced by lead nitrate and by tumor necrosis factor alpha. *Hepatology* 1996; 23: 1572-7.
- 18) Apostoli P, Huard LC, Chaumontet C, Martel P, Alessio L, Mazzoleni G. Effects of Four Inorganic Lead Compounds on the Proliferation and Junctional Coupling of Cultured REL Liver Cells. *Am J Ind Med* 2000; 38: 340-348.

- 19) Loch-Carusio R, Corcos IA, Trosko JE. Inhibition of metabolic coupling by metals. *J Toxicol Environ Health* 1991; 32: 33-48
- 20) Legare ME, Castiglioni AJ Jr, Rowles TK, Calvin JA, Snyder-Armstead C, Morphological alterations of neurons and astrocytes in guinea pigs exposed to low levels of inorganic lead. *Neurotoxicology* 1993; 14: 77-80.
- 21) Tiffany-Castiglioni E, Lindahl LS. Complementarity and usefulness of in vitro approaches in lead toxicology: commentary on forum position paper. *Neurotoxicology* 1999; 20: 713-8.
- 22) Forni A. Chromosomal effect of lead. A critical review. *Rev Environ Health* 1980; 3: 113-129.
- 23) Groot de Restrepo H., Sicard D., Torres MM., DNA Damage and Repair in Cells of Lead Exposed People. *Am J Ind Med* 2000; 38: 330-334.
- 24) Smirnov I, Shafer RH, Lead is unusually effective in sequence-specific folding of DNA, *J Mol Biol* 2000; 296: 1-5.
- 25) Brown RS. Pb(II)-catalysed cleavage of the sugar-phosphate backbone of yeast tRNAPhe-implications for lead toxicity and self-splicing RNA, *Nature* 1983; 303: 543-546.
- 26) Wedrychowski A, Schmidt WM, Hnilica LS. The in vivo cross-linking of proteins and DNA by heavy metals. *J Biol Chem* 1986; 261: 3370-3376.
- 27) Vaglenov A, Creus A, Laltchev S, Pavlova V, Marcos R. Occupational exposure to lead and induction of genetic damage. *Environ Health Perspect* 2001; 109: 295-298.
- 28) Minozzo R, Deimling LI, Gigante LP, Santos-Mello R. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead. *Mutat Res* 2004; 565: 53-60.
- 29) Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E, Wyszynska K, Natarajan AT, Nilsson R. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mutat Res* 2003; 9: 540: 19-28.
- 30) Calabrese EJ, Baldwin LA. Lead-induced cell proliferation and organ-specific tumorigenicity, *Drug Metab Rev* 1992; 24: 409-416.
- 31) Choie DD, Richter GW. Lead poisoning: rapid formation of intranuclear inclusions, *Science* 1972; 177: 1194-1195.
- 32) Hartwig A, Schlegel R, Beyersmann D. Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells, *Mutat. Res* 1990; . 241: 75-82.
- 33) Hartwig A. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* 1995; 8: 3-11.
- 34) Roy NK, Rossman TG. Mutagenesis and comutagenesis by lead compounds. *Mutat Res* 1992; 298: 97-103.
- 35) Zelikoff JT. Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis* 1998; 9: 1727-1732.
- 36) Ariza M, Bijur GM, Williams MV. Lead and mercury mutagenesis: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, superoxide dismutase, and xanthine oxidase, *Environ. Mol. Mutagen* 1998; 31: 352-361.
- 37) Yang JL. Singlet oxygen is the major species participating in the induction of DNA strand breakage and 8-hydroxydeoxyguanosine adduct by lead acetate. *Environ Mol Mutagen* 1999; 33: 194-201.
- 38) Daggett DA. Effects of lead on rat kidney and liver: GST expression and oxidative stress, *Toxicology* 1998; 128: 191-206.
- 39) Bergdahl IA. Lead binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes, *Pharmacol Toxicol* 1997; 81: 153-158.
- 40) Silbergeld EK, Waalkes M, Rice JM. Lead as a carcinogen: experimental evidence and mechanisms of action. *Am J Ind Med* 2000; 38: 316-323.
- 41) Steenland K, Boffetta P. Lead and cancer in humans: where are we now? *Am J Ind Med* 2000; 38: 295-299.
- 42) Hengstler JG, Bolm-Audorff U, Faldum A, Janssen K, Reifenrath M, Götte W, Jung D, Mayer-Popken O, Fuchs J, Gebhard S, Bienfait HG, Schlink K, Dietrich C, Faust D, Epe B, Oesch F. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis* 2003; 24: 63-73.
- 43) Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide; IARC 2006. Volume 86.
- 44) Wang L, Medan D, Mercer R, Shi X, Huang C, Castranova V, Ding M, Rojanasakul Y. Role of neutrophil apoptosis in vanadium-induced pulmonary inflammation in mice. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 21: 343-350.
- 45) Wang L, Medan D, Mercer R, Overmiller D, Leonard SS, Castranova V, Shi X, Ding M, Huang C, Rojanasakul Y. Vanadium-induced apoptosis and pulmonary inflammation in mice: role of reactive oxygen species. *J Cell Physiol* 2003; 195: 99.
- 46) Chin LS, Murray SF, Harter DH, Doherty PF, Singh SK. Sodium vanadate inhibits apoptosis in malignant glioma cells: a role for Akt/PKB. *J Biomed Sci* 1999; 6: 213-218.
- 47) Huang C, Zhang Z, Ding M, Li J, Ye J, Leonard SS, Shen HM, Butterworth L, Lu Y, Costa M, Rojanasakul Y, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. Vanadate induces p53 transactivation through hydrogen peroxide and causes apoptosis. *J Biol Chem* 2000; 275: 32516-32522.
- 48) Lawrence A, Scheving JR, Zhang T, Zhang L. Regulation of intestinal tyrosine phosphorylation and programmed cell death by peroxovanadate. *Am J Cell Physiol* 1999; 277: 572-579.
- 49) Gerling N, Culmsee C, Klumpp S, Krieglstein J. The tyrosine phosphatase inhibitor orthovanadate mimics NGF-induced neuroprotective signaling in rat hippocampal neurons. *Neurochem Int* 2004; 44: 505-520.
- 50) Beyersmann D, Hartwig A. Carcinogenic metal compounds: recent insight into molecular and cellular mechanisms. *Arch Toxicol* 2008; 82: 493-512.
- 51) Hartwig A. Kanzerogene Metallverbindungen. Aktuelle Aspekte zu Wirkungsmechanismen und Risikobewertung. *Oesterreichisches Forum Arbeitsmedizin* 2007; 01: 5-10
- 52) Pira E (coordinatore), Detragiache E, Disalzi G, Mutti A, Ghigo D, Iavicoli S, Apostoli P. Linee guida per la sorveglianza sanitaria degli esposti ad agenti cancerogeni e mutageni in ambiente di lavoro. In: Apostoli P, Imbriani M, Soleo L, Abbritti G, Ambrosi L (Eds). Linee guida per la formazione continua e l'accreditamento del medico del lavoro - Volume 2 - Prima revisione. *G It Med Lav Erg* 2007; Allegato al Vol. XXIX n. 3.

**Richiesta estratti:** *Apostoli Pietro - Dipartimento di Medicina Sperimentale e Applicata, Sezione di Igiene Industriale, Università di Brescia, Piazzale Spedali Civili 1, 25123 Brescia, Italy - Tel. +39 030 399 5666, Fax +39 030 399 6046, E-mail: apostoli@med.unibs.it*