

# **Protocollo d'intesa per l'integrazione di un progetto di ricerca mirato alla valutazione degli effetti e dei meccanismi cellulari e molecolari di tossicità indotti dall'esposizione a cromo negli ambienti di lavoro, Perugia, 12 dicembre 2011**

Giovedì 29 Dicembre 2011 19:28

## **PROTOCOLLO D'INTESA PER L'INTEGRAZIONE DI UN PROGETTO DI RICERCA MIRATO ALLA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI E DEI MECCANISMI CELLULARI E MOLECOLARI DI TOSSICITÀ INDOTTI DALL'ESPOSIZIONE A CROMO NEGLI AMBIENTI DI LAVORO.**

### **TRA**

Istituto Nazionale per l'Assicurazione contro gli Infortuni sul Lavoro e le Malattie Professionali, di seguito denominato INAIL, Direzione Regionale per l'Umbria, con sede in Perugia, Via G.B. Pontani 12, qui rappresentato dal Direttore Regionale Dr. Tullio Gualtieri

### **E**

Università degli Studi di Perugia, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Sezione di Medicina del Lavoro, Tossicologia e Malattie Respiratorie Professionali e Ambientali con sede in Perugia via E. dal Pozzo, qui rappresentato dal Direttore Prof. Roberto Quartesan.

Le parti,

### **CONSIDERATO CHE**

\* L'Inail ha tra i suoi compiti istituzionali quelli della ricerca in merito alla sussistenza dei rischi in ambito lavorativo, dell'accertamento e diagnosi delle malattie professionali, nonché della valutazione del danno da esse indotte.

\* Le patologie connesse all'esposizione al cromo rientrano tra le malattie professionali

tabellate - con onere della prova contraria per l'INAIL - e che, pertanto, appare di evidente utilità sviluppare una metodologia nell'accertamento della patologia che consenta di stabilire il nesso di causa di elevata probabilità, in particolare per le lesioni tumorali.

\* L'individuazione precoce degli effetti nocivi causati dall'esposizione a cromo negli ambienti di lavoro consente di mettere in atto misure preventive tali da impedirne o limitarne lo sviluppo.

\* La definizione di nuove metodologie di accertamento dei danni a carico della salute dei lavoratori esposti a cromo, consente anche una più rapida definizione dei casi portati all'attenzione dell'Inail.

\* L'Università degli Studi di Perugia - Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale Sezione di Medicina del Lavoro, ha tra i suoi compiti primari l'attività di ricerca, ed in particolare nel campo delle broncopneumopatie professionali comprese quelle da esposizione a cromo.

\* L'Istituto di Medicina del Lavoro, in considerazione dei risultati conseguiti nel biennio 2010 - 2011, intende proseguire le attività di ricerca del progetto per perfezionare una metodica di valutazione degli effetti e dei meccanismi cellulari e molecolari di tossicità indotti dall'esposizione a cromo negli ambienti di lavoro sulla popolazione esposta.

\* L'Inail è interessato alla prosecuzione dell'attività di progetto in considerazione della circostanza che gli esiti della ricerca finanziata prevedibilmente possano incidere positivamente sull'erogazione delle prestazioni istituzionali e sugli aspetti preventivi nella tutela della sicurezza degli ambienti di lavoro in cui è presente il cromo.

\* Il Dipartimento si riserva di comunicare numero e data del Decreto di approvazione del Direttore.

## **CONVENGONO**

\* Sulla necessità di proseguire per un ulteriore biennio l'attività di ricerca già messa in atto con il precedente protocollo di intesa del 12/11/2009.

\* Di rendere fruibili, non appena possibile, i risultati della ricerca a favore degli assistiti Inail con l'organizzazione di un incontro con i medici dell'Istituto nel quale verranno illustrati i risultati così ottenuti, favorendo un più rapido utilizzo ai fini medico-legali.

A tal fine l'Inail si impegna ad erogare un contributo finanziario incidente sull'esercizio

2011, a favore del Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale Sezione di Medicina del Lavoro, per la realizzazione delle attività di ricerca previste dall'integrazione del progetto (che si allega) nella misura di euro 60.000,00 complessivi, prevedendosi un costo complessivo superiore che resterà, per la differenza, a carico del Dipartimento.

L'Università di Perugia, Dipartimento di Medicina e Clinica Sperimentale, si impegna ad assolvere tutti gli obblighi previsti dall'art. 3 della legge n. 136/2010 per assicurare la tracciabilità dei movimenti finanziari relativi al finanziamento del progetto di ricerca. Si impegna altresì a richiedere e comunicare all'Istituto il numero di Codice Unico di Progetto (CUP).

L'erogazione delle rate di finanziamento avverrà in quattro franche in misura non superiore a trentamila euro per i primi 12 mesi e per il saldo nei successivi 12 mesi.

La rendicontazione semestrale dovrà avvenire al 30 aprile e al 30 ottobre, in regime di autocertificazione e dovrà contenere :

- l'entità delle giornate lavorative/uomo nel semestre che sono state destinate alla ricerca in questione.
- relazione sullo stato di avanzamento del progetto.

L'INAIL si riserva comunque il diritto di effettuare controlli sulla effettiva attività svolta.

I risultati della ricerca saranno di comune patrimonio e potranno essere utilizzati ai fini scientifici sia in comune o in maniera autonoma, previo il rispetto della riservatezza e delle leggi sulla privacy e delle relative norme applicative, per comunicazioni scientifiche; l'Inail inoltre potrà utilizzare questi dati per svolgere la propria attività istituzionale di assistenza, formazione ed informazione alle aziende senza fini di lucro.

L'Università di Perugia, Dipartimento di Medicina e Clinica Sperimentale, organizzerà un corso al quale parteciperanno i medici dell'INAIL, per illustrare agli stessi tutte le problematiche ed i risultati, anche parziali o difformi, che si sono presentate o cui si è

pervenuti durante la ricerca, si da renderli completamente edotti di quanto è emerso e specializzarli in materia.

Integrazione del progetto di ricerca "**Valutazione degli effetti e dei meccanismi cellulari e molecolari di tossicità indotti dall'esposizione a Cromo negli ambienti di lavoro**".

Il cromo (Cr) è un elemento di transizione presente nell'ambiente in tre forme stabili: metallico, trivalente Cr(III) ed esavalente Cr(VI). Mentre la forma trivalente è caratterizzata da una tossicità relativamente bassa ed è considerata un nutriente essenziale, i cromati (Cr VI), composti ampiamente utilizzati in campo industriale, in particolare come componente di acciai speciali e nei trattamenti galvanici di cromatura, ma anche presenti come impurità nei cementi e nella concia delle pelli, hanno dimostrato di avere gravi effetti tossici e cancerogeni sull'uomo (Nurminen M., 2004). Sulla base di prove sperimentali ed epidemiologiche il Cr (VI) è stato classificato dalla IARC come cancerogeno certo per l'uomo (classe I). Oltre al largo utilizzo industriale, la contaminazione ambientale, insieme con l'abitudine al fumo di sigaretta, sono un'ulteriore fonte di esposizione umana a questo metallo. Il sistema respiratorio è il principale target dell'azione tossica e cancerogena del Cr (VI). Il Cr (VI) attraversa la membrana cellulare attraverso trasportatori anionici fosfato/solfato non specifici. All'interno della cellula, il Cr (VI) è rapidamente ridotto a Cr (V) e Cr (IV). Questi intermedi reattivi sono in grado di produrre specie reattive dell'ossigeno (ROS), che provocano DNA strand breaks, cambiamenti di basi, perossidazione lipidica, e attivazione di fattori di trascrizione. È generalmente accettato che la componente fosfolipidica delle membrane è coinvolta in numerosi processi patologici, inclusi quelli dipendenti da stress ossidativo, svolgendo un ruolo importante nella morte cellulare. In uno studio precedente abbiamo dimostrato che l'esposizione al Cr(VI) influenza il metabolismo della fosfatidilserina (PS), fosfolipide coinvolto nella traduzione dei segnali e nell'apoptosi, e provoca esposizione della PS in una linea linfocitaria umana (MOLT-4) (Gambelunghe et al., 2006). Tale esposizione è un ben noto marker dell'apoptosi cellulare.

Il Cr(VI) è in grado di indurre apoptosi in diverse linee cellulari in modo p53-

dipendente e p53-indipendente (Rana S.V., 2008). Dallo studio di Ye J e coll. (199S) è emerso che sia i ROS che la p53 giocano un ruolo estremamente importante nell'apoptosi indotta da Cr (VI). I ROS vengono generati entro pochi minuti dall'inizio del trattamento con Cr (VI), mentre l'induzione della p53 richiede all'incirca 5 ore. Tali risultati dimostrano che la produzione di ROS generati dall'esposizione a Cr(VI), può avviare l'apoptosi prima dell'attivazione della proteina p53. Gli Autori ipotizzano che la p53 possa non essere necessaria per l'avvio dell'apoptosi indotta da Cr (VI), ma possa potenziare l'apoptosi attraverso l'attivazione della trascrizione di geni correlati allo stato redox della cellula. La via p53-indipendente, coinvolge i mitocondri. In questo caso, il Cr(VI) tramite la produzione di ROS induce alterazioni della permeabilità della membrana mitocondriale, rilascio di citocromo c nel citoplasma e attivazione della caspasi-3 (Russo P. et al., 2005).

Tra i meccanismi generali dell'apoptosi è presente anche la perdita dell'asimmetria di membrana. I principali fosfolipidi anionici, quali fosfatidilserina (PS) e il fosfolipide neutro fosfatidiletanolamina (PE), sono normalmente presenti nel foglietto interno del bilayer della membrana plasmatica. L'asimmetria dei fosfolipidi all'interno delle membrane è mediata e regolata da trasportatori di fosfolipidi come l'amminofosfolipide traslocasi (APT) e la fosfolipide scramblasi (PLS). Durante l'apoptosi, i cambiamenti nell'attività di enzimi connessi all'asimmetria fosfolipidica determinano la perdita di questa distribuzione asimmetrica, con conseguente traslocazione di PS sulla superficie cellulare. Mancano invece informazioni sufficienti riguardo alla traslocazione della PE sia durante l'attivazione cellulare sia nelle fasi iniziali dell'apoptosi, probabilmente per la mancanza di sistemi efficienti e specifici per individuare la PE esternalizzata.

Risulta tuttora difficile dimostrare il coinvolgimento dell'ossidazione fosfolipidica nell'omeostasi cellulare e nei processi di trasmissione del segnale a causa della difficoltà nella quantificazione della perossidazione in cellule viventi, in considerazione della notevole efficienza nel fenomeno di rimodellamento/riparazione dei fosfolipidi ossidati. Ad esempio, gli idroperossidi fosfolipidici sono substrati efficienti delle fosfolipasi endogene, in particolare delle fosfolipasi A2 (PLA2), enzimi che catalizzano l'eliminazione degli acidi grassi dalla posizione sn-2 dei fosfolipidi, posizione in cui si trovano preferenzialmente gli acidi grassi polinsaturi. La rimozione di acidi grassi

polinsaturi ossidati, quindi danneggiati fa parte del processo di detossificazione. La glutatione perossidasi, un enzima che trasforma gli acili-idroperossidi in idrossi-acidi meno tossici, interviene dopo che la PLA2 ha rimosso gli acidi grassi danneggiati dai fosfolipidi (McLean LR. et al., 1993). Inoltre la PLA2, ha un'elevata affinità e attività nei confronti di fosfolipidi contenenti acidi grassi ossidati rispetto ai non-ossidati, suggerendo un ruolo dell'enzima sia nell'individuare che nel rimuovere gli acidi grassi danneggiati. La PS stessa potrebbe essere un target delle sPLA2s. Queste fosfolipasi spesso idrolizzano le membrane delle cellule apoptotiche in modo più efficiente rispetto a quelle di cellule vitali. L'esposizione di PS, substrato del gruppo II della sottofamiglia della sPLA2s, può facilitare l'interazione di questi enzimi con la superficie delle cellule apoptotiche. Microvescicole rilasciate da cellule apoptotiche rappresentano un target migliore per l'attività della sPLA2s. È inoltre interessante notare che i lisofosfolipidi (LPC e LPS) prodotti dalla PLA2 agiscono come fattori chemiotattici, secreti da cellule apoptotiche, in un modo caspasi-dipendente (Lauber K. et al., 2003). Recentemente si sta' delineando il ruolo dei lipid rafts, domini di membrana specializzati, arricchiti in colesterolo, nella trasduzione del segnale cellulare e nell'esternalizzazione della PS. Ishii e coli. (2005) hanno dimostrato che i lipid rafts sono strutturalmente modificati nel corso dell'apoptosi. In particolare, viene modificato il contenuto in PS e PE ma non quello in colesterolo. Inoltre, sebbene l'esternalizzazione della PS nelle cellule apoptotiche avviene in una porzione di membrana plasmatica dove i lipid rafts sono assenti, l'integrità dei lipid rafts sembra necessaria per mantenere esternalizzata la PS in cellule Jurkat durante l'apoptosi.

PKC delta, un membro della famiglia delle PKC, sembra svolgere un ruolo importante nell'esposizione della PS stimolando direttamente l'attività della PLS 1. È stato descritto che la PKC delta può fosforilare anche un altro membro della famiglia delle scramblasi, la PSL3 che risiede nei mitocondri (Liu J. et al., 2003). Un altro aspetto da prendere in considerazione è la modulazione del metabolismo della PS durante l'apoptosi.

L'aumento di sintesi di PS, osservato in alcune linee cellulari sottoposte a vari stimoli apoptotici, potrebbe essere un evento che contribuisce all'esposizione della PS. Pelassy e coli. (2000) hanno riportato che la quantità di PS esposta sulla superficie delle cellule apoptotiche è almeno in parte regolata dall'attività degli enzimi che la sintetizzano, essendo l'esposizione della PS aumentata o diminuita, rispettivamente, dalla

stimolazione o dall'inibizione della sintesi della PS. L'incremento della PS di nuova sintesi potrebbe verificarsi in particolari domini di membrana. Una delle isoforme dell'enzima che sintetizza la PS risiede nelle "Triton-insoluble floating fractions" e quindi potrebbe modulare la sintesi di PS in zone ristrette della membrana (Buratta S. et al., 2007). Sono necessari ulteriori studi che valutino le variazioni nel metabolismo della PS nelle cellule apoptotiche non solo in relazione all'esposizione di tale fosfolipide, ma anche per la capacità della PS di modulare l'attività delle proteine coinvolte nella trasduzione del segnale. Recentemente è stato dimostrato che l'aumento del contenuto in acido docosaesaenoico nella PS è in grado di proteggere le cellule dalla morte per apoptosi facilitando la traslocazione e la fosforilazione di serina-treonina protein-chinasi (Akt) nella membrana, e che l'aumento del contenuto di PS correla con una maggiore traslocazione della chinasi Raf-1 nella membrana (Kim HY. Et al., 2000).

### **Obiettivi della ricerca**

Lo studio si propone di ampliare le conoscenze che sono alla base della regolazione dell'apoptosi indotta da Cr(VI).

Sebbene alcuni fenomeni che sono alla base di tale processo siano stati caratterizzati, si è ancora lontani dalla comprensione della loro regolazione e integrazione.

Abbiamo precedentemente dimostrato che il trattamento di cellule linfocitarie umane (MOLT-4) con 200 p.M Cr VI causava una diminuzione della sintesi di PS che precedeva nel tempo l'esposizione di PS (valutata mediante test per l'annessina V) e l'apoptosi (valutata tramite citofluorimetria con saggi di vitalità/mortalità in presenza di Ioduro di propidio). Quest'ultima era infatti trascurabile entro le 4 ore di trattamento ed evidente (45%) dopo 6 h di trattamento. Tempi lunghi di incubazione con Cr VI (12 ore) determinavano la necrosi cellulare.

Il trattamento con 9  $\mu$ M Cr VI modificava leggermente i parametri sopra riportati (a 6 e 12 ore di incubazione). L'esposizione per 6 e 12 ore con 200  $\mu$ M di Cr VI, riduceva la capacità delle cellule di decarbossilare la PS neosintetizzata, valutata dal rapporto tra la radioattività nella PE e quella nella PS, non modificata invece da trattamenti per tempi o concentrazioni inferiori (9  $\mu$ M).

Nello studio che ci proponiamo di fare verranno utilizzate cellule epiteliali bronchiali

(BEAS-2B) e cellule di carcinoma polmonare (A549). Da dati riportati in letteratura il Cr(VI) esercita i suoi effetti citotossici in ambedue le linee cellulari ma il grado di citotossicità è differente, come mostrato dall'analisi dei biomarkers dello stress ossidativo (Caglieri A., 2008). Tale differenza è stata posta in relazione sia a un differente profilo genetico per quanto riguarda i meccanismi che riducono i Cr(VI) a Cr(III) che alla loro diversa permeabilità al Cr(VI) attraverso i canali anionici (Caglieri A., 2008).

**Gli obiettivi principali che la ricerca si propone di raggiungere sono:**

- a) valutare quali fattori apoptotici partecipano alla morte programmata indotta dal Cr(VI) rivolgendo particolare attenzione a quelli coinvolti nella via mitocondriale;
  - b) definire il meccanismo mediante il quale la fosfatidilserina (PS) viene esposta sulla superficie delle cellule apoptotiche. Le indagini saranno strutturate in modo da verificare:
    - se la PS viene ossidata prima di essere esposta sulla porzione esterna della membrana plasmatica di cellule indotte all'apoptosi con Cr(VI)
    - quali specie molecolari dei fosfolipidi risultano essere ossidate (mediante HPLC/MS) individuando i fosfolipidi più suscettibili alla perossidazione;
    - se i "detergent-resistant membranes" siano coinvolti nell'esposizione della PS sul lato esterno della membrana
    - se il trattamento con il Cr(VI) modifichi il metabolismo della PS. Particolare attenzione sarà rivolta allo studio degli enzimi preposti alla sua sintesi.
  - c) ruolo delle fosfolipasi A2 (PLA2) nell'apoptosi indotta da Cr(VI).
- Saranno inoltre condotti esperimenti per valutare se la presenza di antiossidanti durante l'esposizione delle cellule al Cr(VI) possa ridurre gli effetti citotossici del metallo. Un'aumentata conoscenza di tutti questi aspetti, e di altri che ne deriveranno, aprirà una nuova prospettiva per lo sviluppo di strategie molecolari preventive da applicare nei confronti delle patologie indotte dal Cr(VI). La conoscenza dei meccanismi cellulari coinvolti nell'apoptosi indotta da Cr(VI) potrebbe contribuire a capire come le cellule danneggiate sfuggano all'apoptosi andando incontro a trasformazione neoplastica o possano indurre fenomeni infiammatori. Ad esempio, se il Cr(VI) dovesse indurre aumentati livelli di ROS in cellule A549 e BEAS-2B, come già osservato in altri modelli cellulari, sarà opportuno valutare quale tra gli antiossidanti usati è in grado di



ridurre più efficacemente gli eventi cellulari (rilascio di fattori pro-apoptotici dal mitocondrio, ossidazione ed esternalizzazione della PS, attivazione di PLA2....) scatenati dallo stress ossidativo. La riduzione di tali eventi potrebbe essere associata allo sviluppo della resistenza all'apoptosi.

### **Descrizione dei modelli sperimentali e delle metodiche che saranno utilizzati:**

Cellule di carcinoma polmonare (A549) e cellule epiteliali bronchiali (BEAS-2B) saranno esposte al Cr(VI) a concentrazioni simili a quelle misurate e riportate da alcuni Autori in soggetti non esposti e in lavoratori professionalmente esposti. Al termine dei trattamenti verranno valutati: determinazione della vitalità cellulare mediante saggio MTT; livelli di apoptosi mediante doppia colorazione con annessina V e ioduro di propidio e valutazione citofluorimetrica; valutazione della sintesi di PS e del destino metabolico della PS neosintetizzata; espressione degli enzimi responsabili della sintesi di PS (PS sintasi) mediante Western Blotting; dosaggio di attività fosfolipasiche A2 mediante tecniche citofluorimetriche; espressione delle varie isoforme PLA2 mediante Western Blotting.

### **Bibliografia**

- Buratta S., et al. (2007). Synthesis of phosphatidylserine by base exchange in Triton-insoluble floating fractions from rat cerebellum. *J Neurochem*; 103 (3): 942-51.
- Caglieri A., et al. (2008). Exposure to low levels of hexavalent chromium: target doses and comparative effects on two human pulmonary cell lines. *Acta Biomed*; 79:104-115.
- Gambelunghe A., et al. (2006). Metabolismo della fosfatidilserina nei apoptosi indotta da Cromo esavalente in cellule infocitarie umane. *G Sta! Med Lav Erg*; 28: 3, suppl.
- Ishii H., et al. (2005). Distinct localization of lipid rafts and externalized phosphatidylserine at the surface of apoptotic cells. *J Biochem Biophys Res Commun*; 327(1):94-9.
- Kim H.Y., et al. (2000). Biochemical and Biological Functions of Docosahexaenoic Acid in the Nervous System: Modulation by Ethanol. *J Biol Chem*; 275(45):35215-23.
- Lauber K., et al. Apoptotic Cells induce Migration of Phagocytes via Caspase-3-Mediated Release of a Lipid Attraction Signal. *Cell*; 113 (13): 717-730.
- Liu J., et al. (2003). Phospholipid scramblase 3 controls mitochondrial structure, function, and apoptotic response. *Mol Cancer Res*; 1(12):892-902.
- McLean L.R., et al. (1993). Role of lipid structure in the activation of phospholipase A2 by peroxidized phospholipids. *Lipids*; 28 (6): 505-509.

Nurminen M. (2004). On the carcinogenicity risk assessment of chromium compounds. *Am J Ind Med*;45(3):308-9.

Pelassy C, et al. (2000). Inhibition of phosphatidylserine synthesis during Jurkat T cell activation. The phosphatase inhibitor, sodium ortho-vanadate bypasses the CD3/T cell receptor-induced second messenger signaling pathway. *Biochem Pharmacol*; 59(7):855-63.

Russo P., et al. (2005). Molecular mechanisms of hexavalent chromium-induced apoptosis in human bronchoalveolar cells. *Am J Resptr Ceil Mol Biol*; 33(6):589-600.

Ye J, et al. (1999). Role of reactive oxygen species and p53 in chromium(VI)-induced apoptosis. *J Biol Chem*; 3; 274 (49):34974-80.

**Durata del progetto: 2 anni.**

I risultati della ricerca saranno oggetto di un incontro con i medici dell'Istituto durante il quale verranno illustrati i dati ottenuti così da permetterne un più rapido utilizzo anche a fini medico-legali.

**Costo Complessivo del Progetto**

Il costo complessivo del progetto è di € 60.000,00.

---

*Fonte: INAIL*