

# **Cancerogenesi orale del cromo esavalente in relazione alla riduzione nell'ambiente gastrico**

## **Relatore**

Prof. Marco Mori

## **Correlatore**

Prof. Silvio De Flora

## **Candidato**

Dott. Sebastiano La Maestra

Anno accademico 2014-2015

# INDICE

|   |         |
|---|---------|
| 1. Introduzione   | pag. 3  |
| 2. Cromo esavalente   | pag. 7  |
| 2.1. Effetti respiratori  | pag. 7  |
| 2.2. Immunotossicità  | pag.12  |
| 2.3. Effetti cardiovascolari                                      | pag.13  |
| 2.4. Effetti ematologici  | pag. 14 |
| 2.5. Effetti epatici  | pag. 16 |
| 2.6. Effetti renali   | pag. 17 |
| 2.7. Effetti gastrointestinali                                    | pag. 21 |
| 3. Meccanismi d'azione  | pag. 25 |
| 4. Cancro   | pag. 36 |
| 5. Ricerche personali   | pag. 39 |
| 6. Materiali e metodi   | pag. 40 |
| 6.1. Raccolta e preparazione dei campioni di succo gastrico umano | pag. 40 |
| 6.2. Misurazione della riduzione del Cr(VI) nel succo gastrico    |         |

|  |         |
|--|---------|
| umano mediante il metodo colorimetrico DPC   | pag. 40 |
| 6.3. Mutagenicità del Cr(IV) nel test di reversione di Ames in<br>presenza di succo gastrico umano | pag. 42 |
| 7. Risultati   | pag. 43 |
| 7.1. Riduzione di Cr(VI) in campioni di succo gastrico umano<br>pre e post-prandiale               | pag. 43 |
| 7.2. Tempo-dipendenza della riduzione del Cr(VI)   | pag. 46 |
| 7.3. pH-dipendenza della riduzione del Cr(VI)  | pag. 47 |
| 7.4. Stabilità termica del succo gastrico  | pag. 48 |
| 8. Discussione   | pag. 48 |
| 9. Bibliografia citata   | pag. 55 |

## 1. Introduzione

Scoperto da Vauquelin nel 1797 in un minerale trovato in Siberia, il Cromo fu isolato solo nel 1854 da Bunsen. Il Cr si trova in natura come minerale, principalmente cromite, disciolto nelle acque o presente nel suolo. E' un elemento molto mobile e può esistere in molti stati di ossidazione (da 0 a + 6). In forma metallica si presenta come un metallo bianco leggermente azzurrognolo, che può essere facilmente lucidato. Fonde a 1875°C ed è molto duro. Non viene corrosivo dalla maggior parte degli agenti chimici; in particolare non si ossida all'aria e conserva la sua lucentezza. Il Cr può dare luogo a tre ossidi: il monossido di Cromo (CrO) e il triossido di Cromo (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), entrambi basici e ai quali corrisponde i sali di Cromo; il triossido di Cromo (CrO<sub>3</sub>) che ha proprietà acide e può dare cromati e bicromati.

La molteplicità d'impiego del Cr comporta irrimediabilmente un notevole impatto ambientale. Le fonti di contaminazione da Cr sono molto numerose essendo utilizzato nell'industria siderurgica, chimica (produzione di pigmenti, pitture, esplosivi, mordenti per tintorie, ceramiche, vetro, prodotti anticorrosivi, antisettici, astringenti, defoglianti), galvanica e conciaria. Tutte queste attività implicano emissioni in atmosfera sotto forma di polveri o aerosol e l'accumulo di residui di lavorazione, solidi o liquidi, caratterizzati da composizione più o meno varia, ma in ogni caso contenenti concentrazioni di Cr potenzialmente nocive. I residui sono disposti in discarica o dispersi nell'ambiente dopo un processo di trattamento più o meno efficace. Ci sono anche casi in cui si provvede allo smaltimento mediante spargimento diretto su terreno. La giustificazione di quest'ultima pratica deriva dall'evidenza che il Cromo è prevalentemente presente come Cr(III). L'eventuale Cr(VI) viene ridotto a Cr(III) mediante numerosi possibili meccanismi ed essendo sufficientemente insolubile non

influisce negativamente sull'ambiente. È però altrettanto evidente che la concentrazione del Cr(VI), essendo questo in equilibrio dinamico con il Cr(III), è tanto maggiore quanto maggiore è quella di quest'ultimo. Inoltre, il Cr(VI) è caratterizzato da un'elevata mobilità ambientale e disperso nelle acque viene assorbito dai vegetali entrando nelle catene alimentari, contaminando i cibi e aumentando il rischio per la salute del consumatore. Il limite imposto dalla normativa italiana (D.L. n°152 dell'11/05/99, allegato 5, Tab.3) per ciò che concerne gli scarichi in corpi idrici superficiali è di 0,2 mg/l di Cr per il Cr(VI) e di 2 mg/l per il Cr totale. La Figura. 1 mostra le caratteristiche di speciazione del Cromo nell'ambiente, ovvero come esso si distribuisce e si sposta nelle sue varie forme attraverso l'ambiente, sia esso l'atmosfera, l'idrosfera o la geosfera (Cieslak-Golonka, 1995).

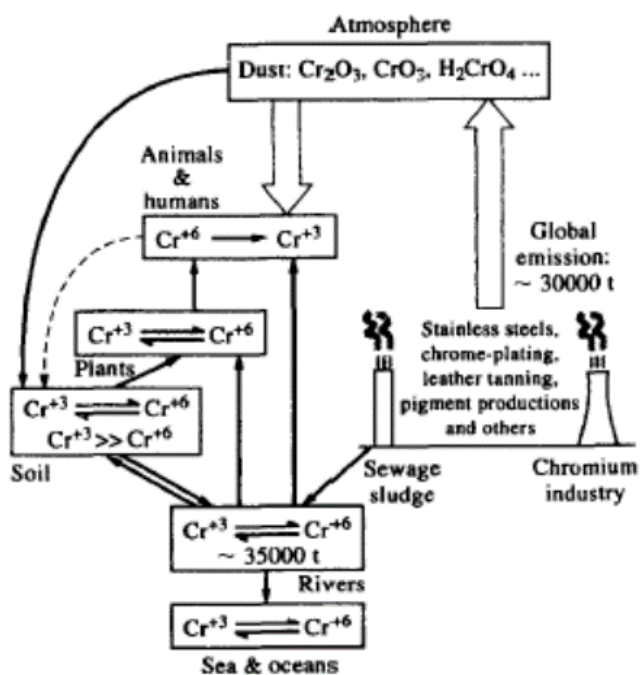


Figura 1. Dispersione del Cromo nell'ambiente

Il Cromo è uno dei metalli più interessanti sotto il profilo alimentare, ambientale e tossicologico. Le due specie prevalenti, Cr(III) e Cr(VI), si comportano in maniera completamente diversa e il loro effetto sugli organismi viventi in funzione del diverso grado d'ossidazione, dà vita al cosiddetto 'paradosso del Cromo'. La forma trivalente è caratterizzata da una bassa mobilità e tossicità; di conseguenza, anche i suoi composti sono scarsamente tossici, poco assorbibili e poco solubili a pH neutro o debolmente alcalino. Il Cr(III) infatti, è considerato un micronutriente essenziale in grado d'influenzare la capacità dell'insulina nel regolare il livello di glucosio e lipidi nel sangue (Potter *et al.*, 2005). Pertanto, se ne consiglia una dose giornaliera di 10 - 40 µg per i bambini fino ai sei mesi e 50 - 200 µg per le altre età (National Research Council, 1989). Diversamente, il Cr(VI) risulta irritante per gli occhi, la pelle e le mucose ed una esposizione cronica può causare danni permanenti. La tossicità si riscontra previa assunzione per via orale, per inalazione, per via dermica e sistemica ed il valore di riferimento limite per evitare gli effetti tossici sull'organismo dopo assunzione orale, secondo l'USEPA (1996), è di  $3^{-5} \times 10^{-3}$  mg/kg p.c./ die.

Cibi ricchi in Cr III includono lievito di birra, tuorli d'uovo, cereali integrali, crusca di cereali, noci, fagioli verdi, broccoli, carne, vino e birra (Wang *et al.*, 2010). La deficienza di cromo è stata riportata in associazione all'insulina resistenza e al diabete (Jeejeebhoy *et al.*, 1997; Vincent, 2010) anche se il meccanismo d'azione del Cr sul metabolismo del glucosio e dei lipidi non è del tutto chiaro. È stato postulato che il Cr incrementi il numero di recettori dell'insulina favorendone il legame con la stessa. Inoltre, il Cr legato alla cromodulina, un complesso oligopeptidico contenente 4 ioni di Cr, amplifica il segnale dei recettori quando entrano in contatto con essi (Wang *et al.*, 2010). Sono stati ipotizzati molti altri meccanismi d'azione del Cr sul metabolismo del

glucosio e dei lipidi (Cefalu *et al.*, 2002; Dong *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Ad esempio, Cr decrementa i livelli di proteina tirosina fosfatasi 1B (PTP1B) (Wang *et al.*, 2006), determinando un incremento della sensibilità all'insulina. Inoltre, se somministrato in sinergia con farmaci antidiabetici può contribuire a migliorare le variabili di glucosio nel diabete. D'altra parte, il valore dell'integrazione di Cr nei diabetici è inconcludente e controversa (Cefalù WT & Hu FB, 2004.). Ulteriori studi clinici controllati, randomizzati e ben definiti, sulle popolazioni a rischio, sarebbero necessari per determinare gli effetti del cromo sui marcatori del diabete (Althuis MD *et al.*, 2002).

Ciò nonostante l'American Diabetes Association afferma che sussistono prove sufficienti per sostenere che il Cromo possa essere usato routinariamente per migliorare il controllo glicemico nei pazienti diabetici (Evert *et al.*, 2013). Gli effetti della supplementazione di Cr sui livelli di lipidi plasmatici negli esseri umani sono anch'essi inconcludenti (Offenbacher *et al.*, 1997). Alcuni studi, hanno dimostrato che l'assunzione giornaliera di Cr(III) a dosi comprese tra i 150 e 1000 µg /die comportato un decremento delle lipoproteine a bassa densità del colesterolo (LDL) e trigliceridi e un aumento della concentrazione di apolipoproteina A nei soggetti con aterosclerosi, ipercolesterolemia o ipertesi che assumono beta-bloccanti (Roebach *et al.*, 1991; Hermann *et al.* 1994). In opposizione a questi risultati vi sono altri studi che denunciano come l'integrazione di Cr(III) non determini effetti favorevoli sul profilo lipidico (Offenbacher *et al.*, 1985; Potter *et al.*, 1985; Uusitupa *et al.*, 1992). D'altra parte, risultati così tanto variabili possono essere dovuti alle difficoltà di quantificare la concentrazione di Cr dei singoli soggetti prima che questi vengano reclutati per i trials.

Come riportato precedentemente, il Cr(III) è un nutriente essenziale e il suo assorbimento per via orale, respiratoria o contatto con la pelle non determina tossicità e non ha proprietà genotossiche o cancerogene. D'altra parte l'esposizione a livelli elevati per inalazione, ingestione o contatto cutaneo può causare alcuni effetti negativi sulla salute ed essendo un metallo pesante può accumularsi nell'organismo. Un'eccessiva e prolungata esposizione, come ad esempio quella professionale, può perciò determinare stati patologici e danni all'organismo. Bisogna inoltre considerare che l'internalizzazione di dosi massive di Cr(III) nella cellula, mediante processi di micropinocitosi selettiva, determinano alterazioni della molecola di DNA causa di mutazioni, aberrazioni cromosomici e danni ossidativi (Wilbur *et al.*, 2012).

## **2. Cromo esavalente**

### **2.1. Effetti respiratori**

Il Cr(VI) è considerato altamente tossico e sulla base di evidenze sperimentali ed epidemiologiche è stato classificato dall'IARC come cancerogeno per l'uomo (Gruppo I).

Molto più solubile, mobile e tossico del Cr(III), esso entra nella cellula attraverso le vie del solfato e del fosfato, prevalentemente come ione cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ), attraverso proteine di trasporto e altre proteine leganti i metalli. Una volta introdotto nell'organismo il Cr viene rapidamente ed efficacemente assorbito, ed essendo molto corrosivo, esercita le notevoli proprietà ossidanti determinando ulcerazioni della pelle o



della mucosa (Matey et al., 2000). Nell'ambiente intracellulare il Cr(VI) innesca una serie di reazioni che generano il rilascio di specie reattive dell'ossigeno con conseguente insulto a mitocondri e lisosomi (De Flora and Wetterhahn, 1989; Pourahmad, et al., 2001). Nel citoplasma, il Cr(VI) viene rapidamente ridotto da diverse molecole antiossidanti quali il tripeptide glutatione (GSH), l'acido ascorbico e la cisteina. Gli studi sulla riduzione del Cr(VI) in estratti di polmone, fegato o rene di ratto hanno dimostrato che l'ascorbato metabolizza circa l'80% di Cr(VI) in questi tessuti bersaglio (Suzuki, 1990).

Quest'ultima reazione è molto rapida, per cui la permanenza del Cr(VI) in sede polmonare è veramente breve e per tale motivo la riduzione via ascorbato rappresenta la prima efficiente linea di difesa contro l'ossidazione. Il livello di ascorbato nel tessuto polmonare di soggetti adulti è stato stimato essere di circa 7 mg/100 g di tessuto (Hornig, 1975). Quando l'ascorbato è depleto nel tessuto polmonare, il Cr(VI) può essere ridotto dal glutatione, via molto più lenta che determina una più lunga permanenza del Cr in sede polmonare (Suzuki & Fukuda, 1990). Ulteriori studi effettuati su macrofagi alveolari di cinque soggetti maschi sani, indicavano che queste cellule sono capaci di ridurre mediamente una dose pari a 4,8 µg di Cr(VI)/10<sup>6</sup> cellule o 14,4 µg di Cr(VI)/ mg proteina (Petrilli et al., 1986). Inoltre il metabolismo del Cr(VI) a Cr(III) da parte dei macrofagi alveolari riduce il potenziale mutageno del Cr quando questo viene saggiato tramite il test di Ames. Ulteriori indagini, esplicano la capacità della frazione post mitocondriale (S12), ottenuta da campioni di tessuto parenchimale polmonare umano, di ridurre il Cr(VI) a Cr(III) (De Flora et al., 1984). In sintesi, l'assorbimento e la riduzione dei composti del Cr(VI) avvengono sia nei macrofagi alveolari polmonari,

costituendo una seconda linea di difesa contro la tossicità, che nella porzione microsomale del parenchima polmonare.

È anche bene sottolineare che durante la reazione di riduzione dei composti del Cr(VI) a Cr(III) si producono sottoprodotti tossici, come Cr(V) e radicali dell'ossigeno, altamente reattivi e capaci di interagire con il DNA (Jennette 1982; Norseth 1986; De Flora and Wetterhahn, 1989).

La tossicocinetica del Cr dipende dallo stato di valenza del metallo stesso e dalla natura dei suoi ligandi. Come più volte affermato, in natura i composti del Cr sono in genere allo stato trivalente, mentre i composti del Cr(VI) vengono prodotti industrialmente mediante processi di ossidazione. Gli effetti locali e sistemici sull'organismo umano sono collegati ad una esposizione acuta o prolungata a concentrazioni di Cr dannose per l'organismo stesso. Nel caso di un'esposizione ripetuta e/o prolungata per motivi professionali, l'effetto cronico del Cr(VI) ad alte dosi può determinare alterazioni del sistema respiratorio (pneumoconiosi, perforazione del setto nasale, riniti croniche, faringiti, bronchiti croniche). L'identificazione del Cr nelle urine, siero e tessuti di soggetti professionalmente esposti a cromo solubile, trivalente e/o esavalente indica che questo può essere assorbito dal polmone (Cavalleri & Minoia 1985; Mancuso 1997; Minoia & Cavalleri 1988). La quantità e la localizzazione del Cr inalato sono influenzati da diversi fattori quali convezione, diffusione e intercettazione delle particelle nelle vie aeree. Questi fattori includono la velocità di flusso dell'aria, che è influenzata dal tasso e il volume corrente respirato; dalle proprietà delle particelle (stato di ossidazione, diametro e solubilità), dalla geometria delle vie aeree e dall'attività dei macrofagi alveolari (ICRP 1994). In generale, la deposizione nella regione toracica

e polmonare del tratto respiratorio incrementa al diminuire del diametro delle particelle, così particelle con diametro  $>10 \mu\text{m}$  si depositano nella regione extratoracica.

In sede respiratoria il Cr è soggetto a tre differenti processi di clearance: 1) trasporto mucociliare nel tratto gastrointestinale operato dal tratto respiratorio ciliato (trachea, bronchi e bronchioli prossimali); 2) fagocitosi operata dai macrofagi polmonari e trasporto cellulare a linfonodi toracici; 3) assorbimento e trasferimento ad altri tessuti attraverso il sangue o la linfa.

In molti casi, i composti del Cr(VI) sono assorbiti più rapidamente dal polmone rispetto al Cr(III), ciò è probabilmente dovuto alla differente capacità di attraversare le membrane biologiche. Infatti, i lavoratori esposti a polvere di Cr(III)-ligninsolfonati a concentrazione pari a 0,005-0,23 mg di Cr(III)/m<sup>3</sup> presentavano nelle urine livelli di Cr rilevabili alla fine del turno lavorativo. Sulla base di un modello cinetico compartimentale, l'emivita biologica del Cr(III) della polvere di ligninsolfonato era di 4-10 ore, emivita dello stesso ordine di grandezza dei composti Cr(VI) (Kiilunen et al., 1983).

La sensibilità al Cr(VI) nei lavoratori esposti può determinare lo sviluppo di asma e altre patologie del distretto respiratorio. Cinque soggetti con una storia di dermatite da contatto da Cr(VI) sono stati esposti ad un aerosol contenente 0,035 mg Cr(VI)/ml come potassio bicromato. In seguito a tale somministrazione i soggetti presentavano una riduzione del 20% del volume espiratorio forzato accompagnato da un eritema facciale, prurito nasofaringeo, chiusura nasale, tosse, e dispnea (Olaguibel and Basomba 1989). Meyers nel 1950 riportava che due soggetti inalanti elevate quantità di triossido di cromo presentavano tosse e dispnea, iperemia marcata delle mucose nasali

senza perforazione del setto. Così in individui sensibilizzati, il cromo disperso nell'aria può determinare, oltre ad effetti infiammatori, asma. Inoltre Lieberman (1941), riportava come i lavoratori di un impianto di cromatura, in cui le polveri di scarico contenevano alte concentrazioni di vapori di triossido di cromo, presentavano diversi sintomi quali starnuti, rinorrea, respiro affannoso e sensazione di soffocamento. Inoltre, tutti i soggetti impiegati nella procedura di cromatura riportavano rinorrea, ulcere o perforazioni del setto a 2-3 mesi dall'esposizione.

L'esposizione cronica occupazionale al Cr(VI) può causare un aumento del rischio di morte dovuto a malattie non tumorali. In uno studio di mortalità retrospettivo eseguito su 1288 maschi e 1401 femmine lavoratrici impiegati per almeno 6 mesi in un impianto di cromatura del metallo nel Regno Unito tra il 1946 e il 1975, è stato rilevato un aumento statisticamente significativo della mortalità associata alle malattie del sistema respiratorio (non tumorali) nel genere maschile (osservati/attesi [O/E] = 72/54,8, tasso di mortalità standardizzato [TMS] =131, P <0,05), ma non nel genere femminile. In questo studio i soggetti erano esposti principalmente a triossido di cromo, ma le concentrazioni di esposizione non erano note con precisione. Il contributo del nickel risultava irrilevante, mentre i dati sull'abitudine al fumo di sigaretta non erano disponibili (Sorahan et al., 1987). Allo stesso modo, un alto TMS per malattie respiratorie non oncologiche è stato osservato in 1212 lavoratori statunitensi di genere maschile, impiegati nella cromatura di metalli per almeno 3 mesi e seguiti dal 1937 al 1960 (O/E=19/7,843, TMS =242) (Taylor 1966).

Questi dati hanno evidenziato come il sistema respiratorio e la pelle sono i principali organi bersaglio dei soggetti esposti professionalmente al Cr(VI) o ai suoi derivati. Sulla base degli studi condotti da Lindberg e Hedenstierna (1983) è stato

stabilito che nell'uomo l'esposizione cronica al Cr(VI) ed è pari a  $5 \times 10^{-6}$  mg /m<sup>3</sup> di Cr(VI). La maggior parte degli studi di epidemiologia effettuati su coorti di soggetti professionalmente esposti forniscono consistenti dati attestanti che l'inalazione di Cr(VI) ad alte dosi può causare effetti tossici come irritazione respiratoria, perforazione del setto nasale ma anche effetti cancerogeni. In merito a ciò i dati epidemiologici sono in linea con gli studi effettuati sugli animali i quali dimostrano che il polmone è l'organo bersaglio per il Cr(VI) assunto per via inalatoria. Studi epidemiologici condotti su personale impiegato nel settore della produzione del cromato, dei suoi pigmenti e nella cromatura hanno evidenziato una stretta correlazione tra esposizione e insorgenza di cancro al polmone, mentre studi simili ma effettuati in altri settori come la saldatura dell'acciaio inox, industrie galvanica e la produzione di ferrocromo hanno dato risultati inconcludenti.

## **2.2. Immunotossicità**

L'esposizione lavorativa al Cr e ai suoi derivati nell'uomo, dopo inalazioni o contatti con la cute, determina sensibilizzazione allergica caratterizzata da attacchi d'asma e dermatiti (Leroyer et al., 1998; Hansen et al., 2003). La solubilità e il pH sembrano essere i principali responsabili delle reazioni allergiche indotte dal Cr (Fregert, 1981; Polak, 1983) Inoltre, la scarsa solubilità del Cr(III) lo rende inevitabilmente meno allergenico del Cr(VI) (Spruit & van Neer., 1966).

L'avvenuto contatto con i prodotti del Cr può determinare dermatite irritativa primaria, legata alle proprietà citotossiche dirette del composto, o dermatite allergica innescata dopo contatto da risposta infiammatoria mediata dal sistema immunitario. La

dermatite è una risposta immunitaria cellulo-mediata, che si verifica in un processo bifasico. La prima fase, definita di sensibilizzazione, o afferente, dura circa 5-7 giorni e non è accompagnata da manifestazioni cliniche; in questo periodo le molecole penetrano a livello epidermico ove si legano a proteine carrier, acquisendo le caratteristiche di complessi altamente immunogeni. Successivamente gli antigeni vengono captati e processati dalle cellule di Langherans dell'epidermide e presentati ai linfociti T della zona paracorticale del linfonodo regionale trasformandoli in linfociti T memoria.

La seconda fase, o efferente, si verifica solo in soggetti precedentemente sensibilizzati, ha una latenza di 12-48 ore dall'esposizione all'antigene e si associa a lesioni cutanee; segue le stesse tappe della fase afferente, con la differenza che l'antigene è presentato ai linfociti T memoria migrati nella cute, determinandone l'attivazione con conseguente rilascio di citochine e innesco della flogosi cutanea. Gli individui sensibilizzati manifesteranno una reazione allergica quando il derma sarà esposto a livelli elevati di Cr (Polak, 1983).

### **2.3. Effetti cardiovascolari**

Le informazioni riguardanti gli effetti cardiovascolari dopo inalazione di Cr e dei suoi composti sono limitate. In un'indagine effettuata in uno stabilimento italiano impegnato nella produzione di cromato in cui i livelli di esposizione erano  $\geq 0,01$  mg Cr(VI)/m<sup>3</sup>, furono eseguiti degli elettrocardiogrammi su 22 lavoratori dei 65 che erano impiegati nella produzione di bicromato e triossido di cromato per almeno un anno. Nessuna anomalia è stata osservata nei dipendenti (Sassi, 1956). Una vasta indagine è stata inoltre eseguita negli Stati Uniti per stabilire eventuali associazioni tra la

produzione di cromati, malattie cardiache e pressione arteriosa. Nessun incremento della mortalità per malattie cardiovascolari e ischemie cardiache è stata rilevata nella coorte di 4.227 soggetti presa in esame dal 1968 al 1984 e comparata con i tassi di mortalità incrociati per età e genere (Moulin et al., 1993), in questo studio nessuna misura dei marcatori di esposizione è stata eseguita. È degno di nota, un ulteriore studio eseguito su 230 dipendenti di media età impiegati nella produzione di bicromato di potassio che hanno avuto almeno un episodio di avvelenamento da cromo. Di questi, 96 presentavano effetti respiratori e 134 disordini gastrointestinali, mentre 70 costituivano il gruppo di controllo. Entrambi i gruppi degli esposti, presentavano al momento delle indagini variazioni dell'attività bioelettrica e meccanica del miocardio, questi disequilibri si ripercuotevano con maggior frequenza nei soggetti con disturbi del sistema respiratorio rispetto ai soggetti con disordini gastrointestinali. È bene evidenziare come i cambiamenti dell'attività del miocardio potrebbero essere effetti secondari alle condizioni patologiche polmonari nonché un effetto diretto dell'esposizione a cromo del miocardio o dei vasi sanguigni che lo irrorano (Kleiner et al., 1970).

## **2.4. Effetti ematologici**

La valutazione ematologica dei lavoratori esposti ai composti del cromo ha fornito risultati equivoci. Novantasette dipendenti, esposti durante la lavorazione del cromato a una miscela di cromo insolubile, minerale contenente Cr(III), cromato di sodio solubile e bicromato, sono stati sottoposti a valutazione ematologica che evidenzia leucocitosi nel 14,4% dei lavoratori e leucopenia nel 19,6%. La leucocitosi sembrava essere correlata principalmente alla monocitosi e alla eosinofilia. Inoltre, era stato

riportato un decremento della concentrazione di emoglobina e un leggero incremento del tempo di coagulazione (Mancuso, 1951). In un rilevamento eseguito in un impianto di cromatura in Italia, dove le concentrazioni di esposizione erano  $\geq 0,01$  mg di Cr(VI) / m<sup>3</sup>, le valutazioni ematologiche di tutti i lavoratori coinvolti nella produzione di bicromato e triossido di cromo per almeno un anno risultavano ordinari e inconcludenti (Sassi 1956). Allo stesso modo, nessun effetto sulla conta ematica di globuli rossi, globuli bianchi, livelli di emoglobina o velocità di sedimentazione è stato rilevato in uno studio caso-controllo di 17 saldatori di acciaio inox provenienti da sei settori con tempi occupazionali medi di 20 anni (Littorin et al., 1984).

La relazione tra i livelli sierici e urinari di Cr e di emoglobina nel sangue è stata vagliata in lavoratori esposti a Cr(III) in una conceria a Leon, Messico (Kornhauser et al., 2002). I lavoratori sono stati suddivisi in tre gruppi; non esposti (controlli; n = 11), moderatamente esposti (n = 14) ed altamente esposti (n = 11) in funzione alla mansione svolta. I livelli di cromo riscontrati erano di 0,13; 0,25 e 0,39 mg/l nel sangue e di 1,35; 1,43 e 1,71 mg/l nelle urine, rispettivamente nel gruppo di controllo, dei soggetti esposti in modo moderato e del gruppo altamente esposto. I risultati di questo studio mostrano una differenza statisticamente significativa tra i livelli di cromo ematico nel gruppo di controllo ed i rimanenti gruppi esposti, e tra la quantità di cromo nelle urine del controllo ed il gruppo con un livello di esposizione elevato. Inoltre, una relazione inversa è stata osservata tra cromo urinario ed emoglobina ( $r = -0,530$ ), cromo sierico e ferro nelle urine ( $r = -0,375$ ) e il rapporto tra il Cr ed il Fe nelle urine e nell'emoglobina ( $r = -0,669$ ;  $<0,05$ ). I risultati indicavano un potenziale effetto dovuto all'esposizione di Cr(III) sull'emoglobina. Tuttavia, a causa delle piccole dimensioni del gruppo, non possono essere tratte conclusioni definitive (Korallus et al., 1974).



## 2.5. Effetti epatici

Il Cr(VI) è stato riportato causare effetti severi al fegato in quattro lavoratori esposti al triossido di ferro in un industria di cromatura. Questi soggetti manifestavano degenerazione epatica, necrosi, infiltrazioni linfocitarie e istiocitarie, ed incremento delle cellule di Kupffer. Anomalie nei test per la funzionalità epatica includevano un incremento della ritenzione della BSP (sulfobromoftaleina), delle gamma globuline, ittero, flocculazione alla cefalina-colesterolo e torbidità del timololo (Pascale et al., 1952). In una coorte di 4.227 lavoratori coinvolti nella lavorazione dell'acciaio dal 1968 al 1984, è stato osservato un incremento della mortalità (SMR o TMS = 174) per cirrosi epatica. I tassi ottenuti sono stati paragonati a quelli di mortalità nazionali e correlati per età e genere (Moulin et al., 1993). Sulla base di informazioni così limitate, anche in virtù del fatto che nessuna indicazione dei livelli di esposizione è stata riportata, non è possibile stabilire un'evidente associazione tra la produzione di composti del Cr e epatopatie. Questi dati concordano con i dati ottenuti negli animali dopo inalazione del Cr e di suoi composti con effetti minimi o del tutto negativi sulla funzionalità epatica (Kim et al., 2004).

L'effetto epatico determinato dall'ingestione di Cr è nuovamente riportato sotto forma di case report in soggetti che hanno ingerito il Cr(VI) o i suoi derivati. L'evidente compromissione epatica era dimostrata dalla comparsa di ittero, incremento della bilirubina, incremento della lattato deidrogenasi sierica in un soggetto addetto alla cromatura e che aveva ingerito un fluido contenente 300 g di triossido di cromo/l (Fristedt et al., 1965). Altri casi sono stati segnalati in soggetti che hanno evidenziato un

incremento di enzimi epatici nel plasma come aspartato aminotransferasi e alanina aminotransferasi, 24 ore dopo l'assunzione. Inoltre, l'esame autoptico eseguito in un soggetto relazionava evidenti segni di necrosi epatica (Kaufman et al., 1970).

Gli effetti del Cr sugli animali esposti è stato largamente studiato. Ratti che assumevano 4 e 4,1 mg di Cr(VI) / kg / die, rispettivamente, come sodio bicromato nell'acqua da bere per 5 giorni, presentavano le ALT incrementate del 30%. Dopo 14 settimane di esposizione a 7 mg di Cr(VI) / kg / giorno, l'attività sierica era incrementata del 14% nei ratti maschi e del 30% nelle femmine, mentre la sorbitolo deidrogenasi era incrementata del 77% nei ratti maschi e del 359% in quelli femmine (NTP, 2007). Nessun cambiamento istopatologico è stato riscontrato in entrambi i generi.

## **2.6. Effetti renali**

Studi effettuati in New Jersey su una coorte di 3.408 lavoratori tra il 1937 e il 1971 impegnati in quattro industrie che producevano composti del cromo da cromite minerale, non evidenziavano nessun incremento di malattie genito-urinarie. Il tasso di mortalità osservato tra uomini bianchi e neri fu di 71 (40-117) e 47 (15-111) rispettivamente. La durata dell'esposizione andava da 1 a 20 anni (Rosenman and Stanbury, 1996).

La funzione renale è stata studiata nei lavoratori impegnati nella produzione di cromato, nella cromatura, saldatura di acciaio inox, nella produzione di ferro cromo, di caldaie e produzione di leghe d'acciaio. Lavoratori esposti ai composti del Cr(VI), necessari alla produzione del cromato, presentavano alti livelli di antigene proteico nell'orletto a spazzola e di una proteina legante il retinolo rispetto ai controlli (Mutti et

al., 1985). Uno studio simile è stato eseguito in 43 uomini impiegati nella produzione industriale di cromato e bicromato. I valori di esposizione di triossido di cromo denunciati erano compresi tra 0,05 e 1 mg Cr(VI) m<sup>3</sup> e la durata media di esposizione era di 7 anni. Le urine dei lavoratori esposti che presentavano concentrazioni >15 µg Cr/g di creatinina mostravano livelli incrementati di proteine leganti il retinolo e antigeni tubulari (Franchini and Mutti, 1988). Sulla base dei risultati ottenuti, i ricercatori affermavano che la presenza di proteine a basso peso molecolare, come le proteine leganti il retinolo o di antigeni nelle urine, potevano rappresentare degli indicatori precoci del danno renale.

In una vasta indagine eseguita per determinare lo stato di salute dei dipendenti statunitensi impiegati nella produzione di cromato, si è visto che le loro urine presentavano un alto numero di globuli bianchi e rossi, anche se la significatività statistica in questi lavori non è stata riportata. Un incremento significativo nell'attività della N-acetil-β-D-glucosaminidasi, dei livelli della microalbumina e della β2-microglobulina fu osservata nei lavoratori che sintetizzavano cromato (Wang et al., 2011). Il livello medio di cromo disperso nell'aria era di 27,13 µg Cr/ m<sup>3</sup> ed il tempo medio di esposizione era 12,86 anni. Tuttavia, non è stata fornita alcuna informazione sulla composizione del cromo. Anche se i lavoratori erano tenuti ad indossare maschere, sono state trovate correlazioni significative tra i livelli di cromo nell'aria e i livelli di cromo urinario; la concentrazione di cromo nelle urine era di 17,41 mg /g creatinina. Lo studio ha anche trovato correlazioni significative tra la concentrazione nell'aria, sangue intero, ed i livelli di cromo urinario e biomarcatori di danno renale (urinari N-acetil-β-D-glucosaminidase attività e microalbumina e β2-microglobulina livelli).

Anche se i precedenti studi correlano l'esposizione al Cr inalato con un alterata funzionalità renale, ulteriori ricerche riportano risultati equivoci o addirittura negativi (Verschoor et al., 1988;). A tal proposito studi condotti su ratti esposti a concentrazioni  $\leq 0,4$  mg di Cr(VI) / m<sup>3</sup> per 90 giorni non manifestano alcun tipo di anomalie istopatologiche (Glaser et al., 1990) così come in animali esposti per 2 anni a 15,5 mg di Cr (IV) / m<sup>3</sup> come biossido di cromo ( Lee et al., 1989 ).

Gli effetti renali osservati in seguito ad esposizione orale al Cr(VI) riguardano solo la denuncia di alcuni casi: insufficienza renale acuta, caratterizzata da proteinuria, ematuria, seguita da anuria in un operaio addetto alla cromatura che aveva accidentalmente ingerito del fluido della cromatura con una concentrazione di 300 g di triossido di cromo/l e successivamente trattato con terapia emodializzante (Fristedt et. al 1965); decesso di un ragazzo di 22 anni in seguito a necrosi dei tubuli renali quantità sconosciuta di bicromato di sodio (Ellis et al., 1982); decesso di un ragazzo di 17 anni in seguito ad ingestione di 29 mg di Cr(VI)/ Kg (Clochesy, 1984); un altro caso di ingestione fatale di Cr(VI) (4,1 mg/kg) come soluzione di acido cromico al 20% che ha determinato necrosi tubulare acuta e insufficienza renale in un uomo di 44 anni (Saryan and Reedy, 1988). Allo stesso modo, un uomo adulto che assunse una dose letale di acido cromico al 20%, manifestò una rapida diminuzione dell'escrezione urinaria accompagnata da progressione di anuria entro i quattro giorni dall'ingestione; l'ecografia addominale mise in evidenza reni ingranditi con corteccia edematosa (Baresic et al., 2009). Ulteriori studi sono stati eseguiti su animali dopo esposizione orale ai composti del Cr(VI). Effetti renali sono stati evidenziati, con tecniche biochimiche e istochimiche, sui ratti esposti a cromato di potassio. Ratti instillati tramite sonda gastrica con 13,5 mg di Cr(VI)/ Kg / giorno, per venti giorni presentavano accumulo di

fosfolipidi e trigliceridi in diverse regioni del rene rispetto al gruppo di controllo (Kumar and Rana, 1982). Un analogo trattamento eseguito sempre su ratti causava un'inibizione degli enzimi di membrana e lisosomiali renali (fosfatasi alcalina, fosfatasi acida, glucosio-6-fosfatasi e lipasi) (Kumar and Rana, 1984). Cambiamenti istopatologici ai reni, tra cui vacuolizzazione in glomeruli, degenerazione della membrana basale della capsula di Bowman e degenerazione dell'epitelio tubolare, sono stati osservati in ratti Wistar esposti a 1,3 mg di cromo (VI) / kg / die come bicromato di potassio in acqua potabile per 22 settimane (Acharya et al., 2001). Infine, i risultati di studi su ratti e topi condotti da NTP mostrano anch'essi cambiamenti istopatologici nei reni in seguito ad esposizione intermedio o cronica ai composti del Cr(VI) con la dieta o con l'acqua potabile. Le dosi più elevate di Cr(VI) testate per esposizione intermedie o croniche erano di 48 mg di Cr (VI) / kg / die in topi che assumevano con la dieta bicromato di potassio per 9 settimane e 8.7 di Cr (VI) / kg / die, come bicromato di sodio diidrato in acqua potabile (NTP, 1996;1997; 2007; 2008).

## **2.7. Effetti gastrointestinali**

Effetti gastrointestinali sono stati associati con l'esposizione occupazionale a composti del cromo. In un report, che considerava due casi di esposizione acuta a fumi di triossido di cromo, i pazienti lamentavano dolore addominale e retrosternale, ma nessuna ulteriori informazione era stata riportata (Meyers, 1950).

Negli Stati Uniti è stata condotta dal National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) una valutazione del rischio su 11 lavoratori impiegati in un impianto di galvanizzazione, dei quali 5 riportavano dolori allo stomaco, 2 ulcere duodenali, 1 gastrite, crampi allo stomaco ed un soggetto presentava frequenti episodi di indigestioni. I dipendenti esposti ad una concentrazione media di  $0,004 \text{ mg Cr(VI)/m}^3$  furono seguiti per una media di 7,5 anni. I risultati ottenuti non furono comparati con un gruppo di controllo (Lucas and Kramkowski, 1975). Un altro lavoro otorinolaringoiatrico che esaminava 77 dipendenti di otto impianti galvanici in Cecoslovacchia, rivela una concentrazione media sulle vasche di cromatura pari a  $0,414 \text{ mg Cr(VI)/m}^3$ . In questi soggetti si riscontravano 12 casi di tonsilliti croniche, 5 casi di faringiti e 32 casi di atrofia della laringe sinistra (Hanslian et al., 1967). In un altro studio, effettuato su 97 lavoratori esposti a cromite insolubile contenente Cr(III) e Cr(VI) come sodio cromato e bicromato, in seguito ad esame radiologico eseguito a livello gastrointestinale, si evidenziavano in 10 soggetti ulcere, di questi 6 avevano sviluppato una gastrite ipertrofica. Il gruppo di controllo costituito da 41 soggetti con identici condizioni sociali e economiche invece presentavano solo due casi di ulcera gastrointestinale. Durante il lavoro tutti i dipendenti molto probabilmente respiravano attraverso la bocca ingoiando inevitabilmente le polveri di cromato, esponendo direttamente la mucosa gastrointestinale (Mancuso, 1951). In un altro studio eseguito in un impianto italiano impegnato nella produzione di cromato dove le concentrazioni di esposizione erano  $\geq 0,01 \text{ mg di Cr(VI)/ m}^3$ , il 15,4% dei 65 operai coinvolti nella produzione di bicromato e triossido di cromo per almeno un anno presentava ulcere duodenali mentre il 9,2% manifestava episodi di colite. Le ulcere sono state considerate causa dell'esposizione al cromo (Sassi 1956). Irritazione della mucosa gastrica,

determinante ulcera duodenale è stata osservata in 21 dei 90 soggetti esaminati ed impegnati nella produzione di sali di cromo. I sintomi delle patologie gastrointestinali comparivano dopo circa 3-5 anni dal contatto iniziale (Stereckhova et al. 1978). La maggior parte di questi studi riportava gli effetti gastrointestinali, ma in realtà questi risultati di solito non erano sovrapponibili all'incidenza che si riscontrava nel un gruppo di controllo per le stesse patologie. Sebbene la spiegazione più logica in questi soggetti esposti sia l'innescarsi di eventi patologici da contatto al Cr(VI), direttamente sulla mucosa gastrica, in seguito alla deglutizione di particelle inalate attraverso la respirazione effettuata con la bocca, o tramite altre vie quali mano-bocca, non bisogna escludere la possibilità che altri fattori come lo stress o la dieta possano essere considerati fattori determinanti.

Allo scopo di valutare se l'esposizione professionale al Cr(VI) provochi effetti gastrointestinali, uno studio condotto su una coorte di 2101 soggetti impiegati per almeno 90 giorni negli anni 1945-1959 e seguiti fino al 1977 in un impianto di produzione di Cr a Baltimora nel Maryland, ha evidenziato un tasso di incidenza della mortalità inferiore a quello atteso per patologie gastrointestinali (Hayes *et al.*, 1979).

Gli effetti gastrointestinali sugli animali dopo l'esposizione al cromo e ai suoi composti sono limitati. Per le esposizioni con durata intermedia, nessun cambiamento istopatologico del tessuto gastrointestinale è stato osservato in ratti femmine esposte a 30 mg Cr(III)/m<sup>3</sup>, come ossido di cromo o cromo solfato basico per un periodo di tre mesi (Derelanko et al., 1999). L'esame istopatologico dello stomaco dei ratti esposti al sodio bicromato diidrato con concentrazioni  $\leq 0,20$  mg Cr(VI)/m<sup>3</sup> per 28 o 90 giorni non rivela alcuna alterazione (Glaser et al., 1985). In topi esposti a 4,3 mg Cr(VI)/m<sup>3</sup> sotto forma di cromato di calcio per 18 mesi, si sono evidenziate anche se in modo occasionale

piccole ulcerazioni nello stomaco e nella mucosa intestinale, anche se l'incidenza dei topi trattati o dei loro controlli non è stata riportata (Nettesheim et al., 1971).

In caso di assunzione di Cr(VI) per via orale nell'uomo gli effetti segnalati sono diversi. Un ragazzo di 14 anni morto dopo ingestione di Cr(VI) come potassio bicromato alla concentrazione di 7,5 mg / kg ha manifestato forti dolori addominali e vomito ed in seguito morte. L'esame autoptico ha rilevato ulcere gastrointestinali (Kaufman et al., 1970). Diversi case report notificano casi di ingestione accidentale di Cr in adulti o bambini che ne determinarono il decesso (Ellis et al., 1982). Alcuni composti del Cr(VI), come il bicromato di potassio e il triossido di cromo sono caustici e irritanti per mucosa e tessuti e possono causare effetti gastroenterici (dolori addominali, vomito e diarrea) se assunti in piccole quantità con gli alimenti come agenti contaminanti (Partington, 1950).

Come precedentemente accennato, l'ingestione del cromo può avvenire anche per via indiretta, ciò si verifica perché il personale impiegato respira con la bocca anziché con il naso, o ancora perché le particelle inalate vengono trasportate dall'epitelio ciliato polmonare alla cavità orale e quindi deglutite. Infatti, studi epidemiologici riportano effetti gastrici, come formazione di ulcere gastriche e ipertrofia gastrica nel personale coinvolto nella produzione di cromati. Questi effetti in alcuni casi erano accompagnati da dolori epigastrici e retrosternali e ulcere duodenali (Stereckova et al., 1978).

In uno studio trasversale, condotto nel 1965 su 155 abitanti di un villaggio della Repubblica Popolare Cinese, in cui l'acqua del pozzo risultava contaminata da Cr(VI) in seguito ad emissioni inquinanti di una fonderia, si sono osservati nella popolazione casi di ulcera, diarrea, dolori addominali, indigestione e vomito. La più alta



concentrazione di Cr(VI) rilevata durante il campionamento era di 20 mg/l, pari ad una dose giornaliera di 0.57 mg di Cr(VI)/ kg/ die, considerando che un uomo medio pesa 70 kg e assume circa 2 litri di acqua al giorno (Zhang and Li, 1987).

Oltre agli studi effettuati sulla popolazione professionalmente esposta, uno studio epidemiologico retrospettivo di mortalità condotto sulla stessa popolazione esposta nella Repubblica Popolare Cinese ha evidenziato un incremento dell'incidenza del cancro al polmone e allo stomaco. La popolazione è stata seguita per 18 anni a partire dal 1970. I tassi di mortalità aggiustati della popolazione esposta variavano da 71,89 a 92,66 su 100.000 persone a fronte dei 65,04 nella popolazione generale del distretto. Se scorriamo questi dati per la causa di decesso quale tumore al polmone, si ottiene un tasso di mortalità pari a 3,17-21,39 per 100.000 rispetto al 11,21 per 100.000 nella popolazione generale. Diversamente per il tumore allo stomaco il tasso di mortalità era nettamente più alto (27,67 - 55,17 per 100.000) rispetto alla popolazione generale (dati non riportati). Inoltre lo stesso studio riportava percentuali più elevate di cancro nei pressi del sito della discarica (Zhang and Li, 1987).

Ulteriori test effettuati, per due anni, dalla National Toxicology Program hanno evidenziato come l'ingestione attraverso l'acqua di Cr(VI) sotto forma di sodio bicromato diidrato inducesse tumori intestinali in topi B6C3F1 a concentrazioni di 20mg /l e cancro della cavità orale in ratti F344/N a concentrazioni  $\geq 60$ mg/l (NTP, 2008; Stout et al., 2009). È bene comunque evidenziare che le concentrazioni di Cr(VI) somministrato nei roditori erano circa 20.000 volte superiori rispetto alle concentrazioni medie Cr (VI) (~ 0.001 mg / l) rilevate nella fornitura di acqua potabile degli Stati Uniti (McNeil et al., 2012;. US EPA, 2014).

### 3. Meccanismi d'azione

Circa i meccanismi d'azione, numerosi studi sono stati eseguiti per stabilire le cause della tossicità cellulare e genotossicità del Cr. I prodotti di riduzione metabolica del Cr(VI) quali gli stadi intermedi, le specie radicali liberi e il Cr(III) sono ritenuti i principali attori del danno subito dalle macromolecole biologiche da cui ne derivano gli effetti genotossici (Chen and Shi 2002; Costa and Klein 2006a; Levina and Lay 2005; Zhitkovich, 2005). I prodotti di riduzione metabolica del Cr(VI) (radicali liberi e Cr(V) e (IV)) e Cr(III) sono ritenuti essere i principali responsabili degli effetti genotossici che portano alla cancerogenicità sia in studi condotti negli umani che negli animali. I tipi di danni strutturali cromo-indotti comprendono rotture dei filamenti di DNA (Bryant et al., 2006; Messer et al., 2006 ), legami crociati DNA-proteina ( O'Brien et al., 2005; Quievryn et al., 2001 ), DNA-DNA, legami crociati DNA-DNA( Xu et al., 1996 ), addotti cromo-DNA, e aberrazioni cromosomiche ( Blankenship et al 1997; Wise et al., 1993 ) . Risultati ottenuti da altri studi suggeriscono che la genotossicità del Cr è dovuta alla formazione di addotti ternari Cr-DNA, che determinano errori della riparazione, rottura delle forcelle di replicazione, alterazioni nella comunicazione cellulare, difetti delle vie di comunicazioni citoscheletriche ( Ha et al., 2004 ) e nell'assemblaggio del centromero con conseguente instabilità cromosomica ( Holmes et al., 2006 ). Diversi studi in vitro (Tabella 1) e in vivo (Tabella 2) sono stati eseguiti per determinare la genotossicità del Cr(VI).

Tabella1. Genotossicità del Cr(VI) *in vivo* (tradotto da Wilbur *et al.*, 2012).

| <b>Specie</b>                   | <b>End point</b>  | <b>Risultati</b> | <b>Citazione</b>                          | <b>Valenza</b> | <b>Composti o attività lavorativa</b> |
|---------------------------------|---|------------------|---|----------------|---------------------------------------|
| <i>D. melanogaster</i>          | Mutazione di geni   | +                | Olvera <i>et al.</i> , 1993               | (VI)           | Triossido di cromo                    |
| <i>D. melanogaster</i>          | Mutazione di geni   | +                | Kaya <i>et al.</i> , 2002                 | (VI)           | Bicromato di potassio                 |
| Linfociti umani                 | Aberrazioni cromosomiche                                    | -                | Hamamy <i>et al.</i> , 1987               | (III)          | Cromo Solfato                         |
| Linfociti umani                 | Aberrazioni cromosomiche                                    | -                | Husgafvel-Pursiainen <i>et al.</i> , 1982 | (VI)           | Fumi della saldatura acciaio          |
| Linfociti umani                 | Rottura filamenti DNA, idrossilazione della deossiguanosina | -                | Gao <i>et al.</i> , 1994                  | (VI)           | Produzione di bicromato               |
| Linfociti umani periferici      | Aberrazioni cromosomiche                                    | -                | Halasova <i>et al.</i> , 2008             | (VI)           | Fumi della saldatura                  |
| Linfociti umani periferici      | Micronuclei   | +                | Benova <i>et al.</i> , 2002               | (VI)           | Cromatura                             |
| Mucosa buccale umana            | Micronuclei   | +                | Benova <i>et al.</i> , 2002               | (VI)           | Cromatura                             |
| Linfociti umani periferici      | Aberrazioni cromosomiche, Scambi tra cromatidi fratelli     | -                | Benova <i>et al.</i> , 2002               | (VI)           | Cromatura                             |
| Mucosa buccale umana            | Aberrazioni cromosomiche, Scambi tra cromatidi fratelli     | -                | Benova <i>et al.</i> , 2002               | (VI)           | Cromatura                             |
| Cellule del sangue intero umano | Scambi tra cromatidi fratelli                               | +                | Wu <i>et al.</i> , 2001                   | (VI)           | Cromatura                             |
| Linfociti umani periferici      | Micronuclei, Crosslink DNA-proteine                         | +                | Medeiros <i>et al.</i> , 2003a            | (III)          | Conciatori                            |

| <b>Specie</b>   | <b>End point</b>   | <b>Risultati</b> | <b>Citazione</b>                    | <b>Valenza</b> | <b>Composti o attività lavorativa</b> |
|---|--|------------------|-------------------------------------|----------------|---------------------------------------|
| Linfociti umani periferici  | Aberrazioni cromosomiche, micronuclei                                | +                | Balachandar <i>et al.</i> , 2010    | (VI)           | Conciatori                            |
| Linfociti umani periferici  | Crosslink DNA-proteine   | +                | Medeiros <i>et al.</i> , 2003a      | (VI)           | Saldatori                             |
| Linfociti umani periferici  | Danno al DNA   | +                | Zhang <i>et al.</i> , 2011          | (VI)           | Cromatura                             |
| Polmone di ratto (somministrazione intratracheale)  | Alterazioni al DNA   | +                | Izzotti <i>et al.</i> , 1998        | (VI)           | Bicromato di sodio                    |
| Fegato di ratto (somministrazione intratracheale)   | Alterazioni al DNA   | -                | Izzotti <i>et al.</i> , 1998        | (VI)           | Bicromato di sodio                    |
| Fegato di ratto (assunzione orale)  | Crosslink DNA-proteine   | +                | Coogan <i>et al.</i> , 1991a        | (VI)           | Cromato di potassio                   |
| Fegato di ratto (inoculo intraperitoneale)  | Crosslink DNA, Crosslink DNA-proteine, Rotture del filamento del DNA | -                | Cupo and Wetterhahn 1985            | (III)          | Ossido di cromo                       |
| Cellule del midollo osseo di ratto F344/N   | Micronuclei  | -                | NTP 2008                            | (III)          | Cromo picolinato                      |
| Eritrociti di topo (B <sub>6</sub> C <sub>3</sub> F <sub>1</sub> , BALB/c) (assunzione orale) | Micronuclei  | -                | NTP 2007                            | (VI)           | Bicromato di sodio diidrato           |
| Topi B <sub>6</sub> C <sub>3</sub> F <sub>1</sub> (assunzione orale)                          | Micronuclei  | -                | NTP 2008                            | (III)          | Cromo picolinato                      |
| Eritrociti di topo (B <sub>6</sub> C <sub>3</sub> F <sub>1</sub> ) (assunzione orale)         | Micronuclei  | -                | NTP 2008                            | (III)          | Cromo picolinato                      |
| Topo (esposizione transplacentare)  | Delezioni del DNA  | +                | Kirpnick-Sobol <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di potassio                 |

| <b>Specie</b>  | <b>End point</b> | <b>Risultati</b> | <b>Citazione</b>              | <b>Valenza</b> | <b>Composti o attività lavorativa</b>  |
|--|------------------|------------------|-------------------------------|----------------|--|
| Cellule del midollo osseo di topi BDF1   | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di potassio                  |
| Cellule del sangue periferico di topo (BDF1) (assunzione con l'acqua potabile) | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di potassio                  |
| Cellule del midollo osseo di topo (BDF1) (assunzione con l'acqua potabile)     | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di sodio biidrato            |
| Cellule del sangue periferico di topo (BDF1) (assunzione con l'acqua potabile) | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di sodio biidrato            |
| Cellule del sangue periferico di topo (BDF1) (assunzione con l'acqua potabile) | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (III)          | Cromo solfato di potassio dodecaidrato |
| Cellule del midollo osseo di topo (BDF1) (assunzione con l'acqua potabile)     | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (III)          | Cromo solfato di potassio dodecaidrato |
| Cellule del midollo osseo di topo (BDF1) (gavaggio)                            | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di potassio                  |
| Cellule del midollo osseo di topo (BDF1) (somministrazione intraperitoneale)   | Micronuclei      | +                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di potassio                  |
| Midollo osseo di topi (ingestione con acqua)                                   | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di sodio diidrato            |

| <b>Specie</b>   | <b>End point</b> | <b>Risultati</b> | <b>Citazione</b>              | <b>Valenza</b> | <b>Composti o attività lavorativa</b> |
|---|------------------|------------------|-------------------------------|----------------|---------------------------------------|
| Midollo osseo di topi (ingestione con acqua)  | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di potassio                 |
| Midollo osseo di topi (inoculo intraperitoneale)  | Micronuclei      | +                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di sodio diidrato           |
| Midollo osseo di topi (inoculo intraperitoneale)  | Micronuclei      | +                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di potassio                 |
| Epatociti fetali di topo  | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di sodio biidrato           |
| Epatociti fetali di topo  | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di sodio biidrato           |
| Sangue periferico fetale di topo (esposizione transplacentare con l'acqua potabile)     | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di potassio                 |
| Sangue periferico fetale di topo (esposizione transplacentare con l'acqua potabile)     | Micronuclei      | –                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di potassio                 |
| Epatociti fetali di topo (Esposizione transplacentare inoculo intraperitoneale)         | Micronuclei      | +                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di sodio diidrato           |
| Epatociti fetali di topo (inoculo transplacentare)                                      | Micronuclei      | +                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di potassio                 |
| Sangue periferico fetale di topo (Esposizione transplacentare inoculo intraperitoneale) | Micronuclei      | +                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di sodio diidrato           |

| <b>Specie</b>  | <b>End point</b>         | <b>Risultati</b> | <b>Citazione</b>              | <b>Valenza</b> | <b>Composti o attività lavorativa</b> |
|--|--------------------------|------------------|-------------------------------|----------------|---------------------------------------|
| Sangue periferico fetale di topo (Esposizione transplacentare da inoculo intraperitoneale) | Micronuclei              | +                | De Flora <i>et al.</i> , 2006 | (VI)           | Bicromato di potassio                 |
| Eritrociti di topo (inoculo intraperitoneale)  | Micronuclei              | -                | Shindo <i>et al.</i> , 1989   | (VI)           | Cromato di potassio                   |
| Linfociti periferici di topo   | Danno al DNA             | +                | Wang <i>et al.</i> , 2006     | (VI)           | Cromato di potassio                   |
| Cellule del midollo osseo di topo (esposizione orale)                                      | Micronuclei              | -                | Mirsalis <i>et al.</i> , 1996 | (VI)           | Cromato di potassio                   |
| Cellule del midollo osseo di topo (gavaggio)   | Aberrazioni cromosomiche | +                | Sarkar <i>et al.</i> , 1993   | (VI)           | Triossido di cromo                    |
| Epatociti di topo (esposizione intraperitoneale)   | Mutazione cellulare      | +                | Itoh and Shimada 1997, 1998   | (VI)           | Bicromato di potassio                 |
| Topo (inoculo intraperitoneale)  | Letalità dominante       | +                | Paschin <i>et al.</i> 1982    | (VI)           | Bicromato di potassio                 |

Tabella 2. Genotossicità del Cr(VI) *in vitro* (tradotto da Wilbur *et al.*, 2012).

| Specie (metodo)   | End point                    | Risultati       |                   | Bibliografia  | Composti                                    |
|---|------------------------------|-----------------|-------------------|---|---|
|   |                              | Con attivazione | Senza attivazione |   |   |
| <b>Target subcellulare:</b>   |                              |                 |                   |   |   |
| Batteriofago a doppio filamento M13mp2 DNA trasferito in <i>E. coli</i> | Mutazioni “in avanti”        | /               | +                 | Snow and Xu 1989  | Cromato di potassio                         |
| DNA plasmidico Puc19  | Mutazione genica             | /               | +                 | Kortenkamp et al. 1996  | Cromato di potassio                         |
| Papilloma virus   | Mutazione genica             | /               | +                 | Kowalski <i>et al.</i> , 1996   | Cromato di potassio                         |
| DNA plasmidico PSV2   | Arresto della DNA polimerasi | +               | -                 | Bridgewater <i>et al.</i> , 1994b, 1998                               | Bicromato di sodio                          |
| <b>Organismi Procarioti:</b>  |                              |                 |                   |   |   |
| <i>Bacillus subtilis</i>  | Ricombinazione               | /               | +                 | Kanematsu <i>et al.</i> , 1980; Nakamuro <i>et al.</i> , 1975         | Cromato di potassio, Bicromato di potassio  |
| <i>E. coli</i> PQ37, PQ35   | Induzione della risposta SOS | -               | +                 | Olivier and Marzin 1987   | Cromato di potassio, Bicromato di potassio  |
| <i>E. coli</i> AB1157, GC2375, UA4202, PQ30                             | Induzione della risposta SOS | /               | +                 | Llagostera <i>et al.</i> , 1986                                       | Bicromato di potassio, Triossido di cromo   |
| <i>E. coli</i> Wp2, Hs30R, B/rWP2                                       | Mutazioni inverse            | /               | +                 | Kanematsu <i>et al.</i> , 1980; Nakamuro <i>et al.</i> , 1978; Venitt | Bicromato di potassio, Cromato di potassio, |



| Specie (metodo)                           | End point             | Risultati       |                   | Bibliografia                    | Composti                               |
|---|-----------------------|-----------------|-------------------|---------------------------------|--|
|   |                       | Con attivazione | Senza attivazione |                                 |  |
|   |                       |                 |                   | and Levy 1974                   | Cromato di sodio                       |
| <i>E.coli</i> , WP2/pKM101, WP2uvrA/pKM10 | Mutazioni inverse     | /               | +                 | Watanabe <i>et al.</i> , 1998a  | Triossido di cromo, Bicromato di sodio |
| <i>E.coli</i> , WP2 uvrA/pKM101           | Mutazioni inverse     | +               | +                 | NTP 2007                        | Bicromato di sodio diidrato            |
| <i>Salmonella typhimurium</i> TA100, TA98 | Mutazioni inverse     | +               | +                 | NTP 2007                        | Bicromato di sodio diidrato            |
| <i>S. typhimurium</i> TA100               | Sostituzioni di basi  | /               | +                 | DeFlora 1978                    | Bicromato di sodio                     |
| <i>S. typhimurium</i> TA100               | Sostituzioni di basi  | /               | +                 | Bennicelli <i>et al.</i> , 1983 | Bicromato di sodio                     |
| <i>S. typhimurium</i> TA102               | Sostituzioni di basi  | /               | +                 | Bennicelli <i>et al.</i> , 1983 | Bicromato di sodio                     |
| <i>S. typhimurium</i> TA92                | Sostituzioni di basi  | /               | +                 | Bennicelli <i>et al.</i> , 1983 | Bicromato di sodio                     |
| <i>S. typhimurium</i> TA1535              | Sostituzioni di basi  | /               | -                 | Bennicelli <i>et al.</i> , 1983 | Bicromato di sodio                     |
| <i>S. typhimurium</i> TA97                | Mutazioni frame shift | /               | +                 | Bennicelli <i>et al.</i> , 1983 | Bicromato di sodio                     |
| <i>S. typhimurium</i> TA1537, TA1538      | Mutazioni frame shift | /               | -                 | Bennicelli <i>et al.</i> , 1983 | Bicromato di sodio                     |
| <i>S. typhimurium</i> TA1978              | Mutazioni frame shift | /               | ±                 | Bennicelli <i>et al.</i> , 1983 | Bicromato di sodio                     |
| <i>S. typhimurium</i> TA100, TA102        | Sostituzioni di basi  | +               | +                 | Tagliari <i>et al.</i> , 2004   | Bicromato di potassio                  |

| Specie (metodo)                                  | End point            | Risultati       |                   | Bibliografia                   | Composti   |
|--|----------------------|-----------------|-------------------|--------------------------------|--|
|  |                      | Con attivazione | Senza attivazione |                                |  |
| <i>S. typhimurium</i> TA100                      | Sostituzioni di basi | -               | -                 | DeFlora 1981                   | Bicromato di sodio,<br>Cromato di potassio,<br>Cromato di calcio,<br>Cromato di ammonio,<br>Triossido di cromo |
| <i>S. typhimurium</i> TA1535                     | Sostituzioni di basi | /               | +                 | DeFlora 1981                   | Bicromato di sodio,<br>Cromato di potassio,<br>Cromato di calcio,<br>Cromato di ammonio,<br>Triossido di cromo |
| <i>S. typhimurium</i> TA100, TA1535 TA98, TA1537 | Sostituzioni di basi | /               | +                 | Haworth <i>et al.</i> , 1983   | Cromato di calcio  |
| <i>S. typhimurium</i> TA 1535 pSK1002            | Mutazioni            | +               | +                 | Yamamoto <i>et al.</i> , 2002  | Bicromato di potassio  |
| <i>S. typhimurium</i> TA102, TA2638              | Mutazioni inverse    | /               | +                 | Watanabe <i>et al.</i> , 1998a | Triossido di cromo,<br>Bicromato di sodio  |
| <b>ORGANISMI EUCARIOTI:</b>                      |                      |                 |                   |                                |  |
| <b>LIEVITI:</b>                                  |                      |                 |                   |                                |  |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                  | Mutazioni inverse    | /               | +                 | Singh 1983                     | Bicromato di potassio  |

| Specie (metodo)                                 | End point  | Risultati       |                   | Bibliografia                        | Composti              |
|---|--|-----------------|-------------------|-------------------------------------|-----------------------|
|   |  | Con attivazione | Senza attivazione |                                     |                       |
| <i>S. cerevisiae</i> D7                         | Cross-over mitotico  | /               | +                 | Fukunaga <i>et al.</i> , 1982       | Triossido di cromo    |
| <i>S. cerevisiae</i>                            | Delezioni del DNA  | /               | +                 | Kirpnick-Sobol <i>et al.</i> , 2006 | Bicromato di potassio |
| <i>Schizosacharomyces pombe</i>                 | Conversione mitotica   | /               | +                 | Bonatti <i>et al.</i> , 1976        | Bicromato di potassio |
| <b>Uova embrionate:</b>                         |  |                 |                   |                                     |                       |
| Embrioni di pollo                               | Danno al DNA, Crosslink, Rotture del filamento, Crosslink DNA-proteine | /               | +                 | Tsapakos <i>et al.</i> , 1983a      | Cromato di sodio      |
| <b>Cellule di eucarioti:</b>                    |  |                 |                   |                                     |                       |
| Fibroblasti polmonari embrionali umani (IMR-90) | Crosslink DNA-proteine, Frammentazione del DNA                         | /               | +                 | Fornance <i>et al.</i> , 1981       | Cromato di potassio   |
| Cellule epiteliali bronchiali umani             | Frammentazione del DNA   | /               | +                 | Fornance <i>et al.</i> , 1981       | Cromato di potassio   |
| Linfociti umani                                 | Rotture del singolo filamento di DNA                                   | /               | +                 | Depault <i>et al.</i> , 2006        | Cromato di potassio   |
| Fibroblasti dermici umani (GM03440 cells)       | Rotture del doppio filamento di DNA                                    | /               | +                 | Ha <i>et al.</i> , 2003, 2004       | Cromato di sodio      |
| Fibroblasti bronchiali umani (cellule WTHBF-6)  | Aberrazioni cromosomiche   | /               | +                 | Holmes <i>et al.</i> , 2006         | Cromato di sodio      |
| Cellule epiteliali bronchiali (BEP2D cells)     | Aberrazioni cromosomiche   | /               | +                 | Wise <i>et al.</i> , 2006b          | Cromato di sodio      |
| Fibroblasti bronchiali primari umani            | Aberrazioni cromosomiche   | /               | +                 | Li Chen <i>et al.</i> , 2009        | Cromato di sodio      |

| Specie (metodo)                       | End point                           | Risultati       |                   | Bibliografia                     | Composti              |
|---------------------------------------|-------------------------------------|-----------------|-------------------|----------------------------------|-----------------------|
|                                       |                                     | Con attivazione | Senza attivazione |                                  |                       |
| Cellule primarie della pelle umana    | Aberrazioni cromosomiche            | /               | +                 | Li Chen <i>et al.</i> , 2012     | Cromato di sodio      |
| Cellule ovariche criceto Cinese       | Aberrazioni cromosomiche,           | /               | +                 | Blankenship <i>et al.</i> , 1997 | Cromato di sodio      |
| Cellule fetali primarie di topi       | Aberrazioni cromosomiche            | /               | +                 | Raffetto <i>et al.</i> , 1977    | Bicromato di potassio |
| Mucosa gastrica umana                 | Danno al DNA                        | /               | +                 | Trzeciak <i>et al.</i> , 2000    | Bicromato di potassio |
| Fibroblasti umani                     | Rotture del doppio filamento di DNA | /               | +                 | Ha <i>et al.</i> , 2004          | Cromato di sodio      |
| Fibroblasti bronchiali primari umani  | Aberrazioni cromosomiche            | /               | +                 | Wise <i>et al.</i> , 2002, 2004  | Cromato di sodio      |
| Cellule epiteliali di fegato di ratto | Trasformazioni                      | /               | +                 | Briggs and Briggs 1988           | Cromato di potassio   |

In conclusione, la maggior parte dei lavori riassunti nelle tabelle indica che il Cr(VI) determinava una risposta genotossica nei test eseguiti. Da questi risultati è possibile evincere come il potere genotossico sia direttamente correlato alla solubilità del composto testato nonché alla propria biodisponibilità. Così, i dati ottenuti negli esposti professionalmente sono ulteriormente confermati dai risultati in vivo e in vitro, anche se in alcuni casi viziati da esposizioni ad altre sostanze ad azione genotossica. In conclusione, l'insieme delle evidenze avvalora l'ipotesi che il Cr(VI) induca la rottura dei doppi filamenti di DNA, aberrazioni cromosomiche e scambio di cromatidi fratelli legami DNA-proteina.

## 4. Cancro

Il Cr(III) e il Cr(0) (metallico) sono stati classificati in Gruppo 3 dell'IARC (1990), in quanto non c'è evidenza di cancerogenicità. Invece l'esposizione professionale ai composti del Cr(VI), in alcune attività industriali che comportavano esposizioni ad alte dosi, è stato associato ad un aumentato rischio di tumori dell'apparato respiratorio, soprattutto broncogeni e nasali, e pertanto il Cr(VI) è in gruppo 1 (IARC, 1990). I dati di mortalità disponibili ad oggi derivano da studi di mortalità retrospettivi che consideravano dipendenti delle industrie dedite alla produzione di cromato, pigmenti di cromato, cromatura, saldatura dell'acciaio inox, produzione di leghe ferro-cromo e concia delle pelli (IARC 1990).

Sebbene diversi studi siano stati eseguiti su soggetti professionalmente esposti, questi presentavano un'elevata variabilità del disegno tanto da renderli statisticamente disomogenei. Infatti, studi che fornivano stime dell'esposizione al Cr(VI) per i singoli membri delle coorti reclutate, oltre a presentare una forte valenza statistica, hanno consentito di valutare il rischio di sviluppo del cancro e di correlarlo alla dose di esposizione. Diversamente, le indagini che determinano il rischio valutando l'esposizione al Cr(VI) correlato alle metriche, quali ad esempio la lunghezza del rapporto di lavoro, rendono l'analisi meno avvalorante includendo altri fattori confondenti.

Correlazioni dose-risposta inerenti lo sviluppo dei tumori sono state osservate tra gli addetti alla produzione dei cromati, ma non per le altre categorie di lavoratori. In questi soggetti, è stato osservato un incremento del rischio di tumori del tratto

respiratorio correlato alla maggiore esposizioni al Cr(VI). Studi effettuati sugli addetti alla cromatura, che oltre ad essere esposti al Cr(VI) e ad altre sostanze chimiche cancerogene, tra cui nickel, hanno mostrato un significativo aumento rischio dell'insorgenza del cancro in dipendenza alla durata del rapporto di lavoro. Tuttavia, le stime del rischio non possono essere attribuite specificatamente all'esposizione al Cr(VI).

Ulteriori studi condotti in saldatori di acciaio ed esposti al Cr(VI), in addetti alla produzione di leghe ferrocromo e quindi principalmente esposti a Cr(0) e Cr(III) e a piccole quantità di Cr(VI), non riportano un incremento dell'incidenza di tumori, così come gli studi effettuati in conciatori di pelle, esposti al Cr(III). Una selezione di studi di esposizione professionale al Cr è presentato in Tabella 3.

Tabella 3. Rischio di mortalità per cancro lavoratori esposti al cromo (tradotto da Wilbur *et al.*, 2012).

| <b>Sede cancro</b>                            | <b>Rischio relativo (95% CI)</b> |  |                                  |
|---|----------------------------------|--|----------------------------------|
| <b>Produzione cromato</b>                     |                                  |  |                                  |
| <b>Polmoni</b>                                | RR 1,80<br>(1,49-2,14)           | 2.357 maschi. Tasso di mortalità per cancro al polmone 2,44 (1,54-3,83) con una esposizione cumulativa di 45 anni ad 1 mg / m <sup>3</sup> anno  | Gibb <i>et al.</i> ,<br>2000b    |
| <b>Polmoni</b>                                | TMS 268<br>(200-352)             | TMS riferito agli Stati Uniti; TMS 241 (180-317); rischio di mortalità per cancro al polmone correlati all'esposizione cumulativi al Cr  | Luippold <i>et al.</i> ,<br>2003 |
| <b>Produzione pigmenti cromati</b>            |                                  |  |                                  |
| <b>Polmoni</b>                                | TMS 190<br>(111-295)             | Lavoratori impegnati > 30 anni; livelli di Cr monitorati > 0,5 e > 2 mg / m <sup>3</sup> per mansioni con elevata esposizione  | Hayes <i>et al.</i> , 1989       |
| <b>Cromatura</b>                              |                                  |  |                                  |
| <b>Polmoni</b>                                | TMS 172<br>(112-277)             | Addetti alla cromatura per periodi > 1 anno; TMS per tempi > 5 anni, 320 (128-658)   | Sorahan <i>et al.</i> ,<br>1998  |
| <b>Polmoni</b>                                | TMS 1,59<br>(1,01-2,38)          | Dipendenti esposti dal 1970  | Hara <i>et al.</i> , 2010        |
| <b>Linfomi</b>                                | TMS 3,80<br>(1,39-8,20)          | Dipendenti esposti dal 1970  | Hara <i>et al.</i> , 2010        |
| <b>Produzione di acciaio inox e saldatura</b> |                                  |  |                                  |
| <b>Polmoni</b>                                | TMS 2,49<br>(0,80-5,81)          | Non significativo se confrontato con i tassi nazionali; aumento significativo se confrontato con un gruppo di controllo interno stratificato per età; concentrazione media di Cr(VI) pari a 0,11 mg / m <sup>3</sup> | Sjogren <i>et al.</i> , 1987     |
| <b>Polmoni</b>                                | TMS 2,29<br>(1,14-4,09)          | TMS per i dipendenti della fonderia di acciaio inox; TMS > 30 anni pari a 3.24 (95% CI = 1,19-7,05)  | Moulin <i>et al.</i> ,<br>1993   |

CI = intervallo di confidenza; RR = rischio relativo; SMR = tasso di mortalità standardizzato

## **5. Ricerche personali**

Scopo del presente studio è stato quello di valutare, per la prima volta, la riduzione del Cr(VI) in campioni di succo gastrico prelevati da soggetti sani ed in assenza di trattamenti medici, in condizioni di digiuno o dopo un pasto. Inoltre, in questo studio sono stati valutati la dipendenza dal pH e dal tempo di contatto con il succo gastrico nella riduzione del Cr(VI). Il saggio colorimetrico DFC ed il test di Ames sono stati utilizzati rispettivamente per la valutazione della riduzione del Cr(VI) e per l'attenuazione della mutagenicità. I risultati così ottenuti evidenziano la capacità del succo gastrico di ridurre il Cr(VI) e di inibire la sua attività biologica con differenze significative tra il digiuno e il periodo postprandiale.



## **6. Materiali e metodi**

### **6.1. Raccolta e preparazione dei campioni di succo gastrico umano**

I campioni di succo gastrico pre e postprandiali sono stati raccolti da soggetti volontari sani, di età compresa tra i 26 e i 34 anni (età media: 29,7 anni). Il protocollo di studio è stato approvato dal Comitato Etico dall'Università di Genova ed eseguito secondo la Dichiarazione di Helsinki. Tutti i partecipanti allo studio hanno firmato un modulo di consenso informato. Il prelievo del succo gastrico, è stato effettuato inserendo un sondino naso-gastrico del diametro di 4 mm e lunghezza di 1210 mm (Bicakcilar nasogastrico cateter Levin). I campioni preprandiali sono stati raccolti al mattino dopo il digiuno notturno, mentre i campioni post prandiali sono stati raccolti 1,5 ore dopo il pranzo. L'apporto calorico medio del pasto era di 700 kcal, ed era composto da: 70 g di pasta (238 kcal), 100 g di arrosto (100-110 kcal), 100 g di pomodori (17 kcal), marmellata (190 kcal), e i condimenti. I campioni di succo gastrico prelevati, sono stati centrifugati a 1000 x g per 10 min in modo da rimuovere le particelle di cibo grossolane residue dal precedente pasto, ed il soprannatante è stato prelevato. Previo stoccaggio in aliquote di 1 ml a -20 °C, in tutti i campioni è stato misurato il pH. In totale, in questo studio sono stati testati 16 campioni di succo gastrico (pre e postprandiale) prelevati da 8 soggetti (6 maschi e 2 femmine).

### **6.2. Misurazione della riduzione del Cr(VI) nel succo gastrico umano mediante il metodo colorimetrico DFC**

Diversi esperimenti preliminari sono stati condotti per determinare il rapporto tra la concentrazione ottimale di Cr(VI) ed i volumi di campione di succo gastrico da

miscelare al fine di ottenere una curva dose-risposta della riduzione del Cr(VI). Allo stesso modo sono state determinate le quantità ottimali di succo gastrico da saggiare con la dose più alta di sodio bicromato biidrato (SBC) (Sigma, Saint Louis, MO, USA). Questi esperimenti ci hanno permesso di determinare che la concentrazione ottimale di Cr(VI) da testare è di 6 µg di SBC da solubilizzare in 100 µl di acqua deionizzata.

Una soluzione contenente 6 µg di SBC in 100 µl di acqua deionizzata è stata aggiunta a: 1) 50 µl di succo gastrico; 2) 25 µl di succo gastrico più 25 µl di acqua deionizzata; 3) 12,5 µl di succo gastrico più 37,5 µl di acqua deionizzata; o 4) 50 µl di acqua deionizzata. Il volume totale di miscela di reazione del succo gastrico era di 150 µl. Le miscele così ottenute sono state incubate ad una temperatura di 37°C per 60 minuti.

Inoltre, per valutare la tempo-dipendenza sulla riduzione del Cr(VI), sono stati testati vari tempi, da 0 a 60 minuti, di contatto della miscela di reazione in cui il succo gastrico era ottenuto da un pool di campioni postprandiale (pH 2,0). È bene specificare che il tempo 0 è virtuale, in quanto corrisponde al momento in cui è stato aggiunto SBC al reagente difenilcarbazide (DFC) precaricato con succo gastrico. Per valutare l'effetto del riscaldamento, della crioconservazione o dello stoccaggio a temperatura ambiente sulla riduzione del Cr(VI) altri saggi sono stati condotti sui campioni di succo gastrico che sono stati riscaldati a 56°C per 30 min, 70°C per 20 min, conservati a - 20°C per 10 giorni o stoccati a temperatura ambiente. Inoltre, sono stati fatti dei pool di campioni di succo gastrico postprandiali (pH 2,5) contenenti diverse quantità (0; 12,5; 25; e 50 µl come descritto sopra) al fine di studiare la dipendenza dal pH nella riduzione del Cr (VI). In particolare, per testare la dipendenza della riduzione del Cr (VI) in funzione del pH nel succo gastrico, 6 µg di SBD sciolti in acqua deionizzata acidificata a pH 2 o in

tampone citrato / fosfato di Mcilvaine, in modo da ottenere valori di pH con un range che va da 2 a 8, sono stati aggiunti ai pool di campioni a 37°C per 60 min.

Per analizzare la riduzione del Cr(VI) con il metodo colorimetrico con *s*-difencilcarbazide (DFC), dopo il tempo di reazione tutti i campioni sono stati trasferiti in un bagno di ghiaccio. Il contenuto di ciascun campione contenente la miscela di reazione è stata suddivisa in 2 cuvette. Le cuvette sono state riempite con 2,5 ml di reagente DFC (Sigma, Saint Louis, MO, USA), composto da 40 mg di DFC in 100 ml di una soluzione costituita da acido solforico al 8%, etanolo al 19% e acqua al 73%. Un'altra serie di cuvette, usate come bianco, sono state riempite con 2,5 ml della stessa miscela di acido solforico-etanolo, ma senza DFC. Dopo 15 min a temperatura ambiente, è stata valutata mediante uno spettrofotometro Nano-drop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) la densità ottica (OD) ad una lunghezza d'onda di 540 nm del complesso Cr (VI)-DFC. Infine, i relativi valori di OD del bianco sono stati sottratti ai corrispettivi campioni.

### **6.3. Mutagenicità del Cr(IV) nel test di reversione di Ames in presenza di succo gastrico umano**

Il test di Ames è stato condotto usando il ceppo TA104 di *S. typhimurium*, caratterizzato da una mutazione *hisG428* (Marnett *et al.*, 1985). Tutti i test sono stati condotti in assenza del sistema metabolico esogeno (S9 mix) che contiene la frazione microsomiale in cui ritroviamo i vari citocromi CYP 450 in quanto questi agiscono come inibitore di mutagenicità del Cr(VI) (De Flora, 1978; Petrilli and De Flora, 1978; NTP, 2008). La preparazione dei campioni di succhi gastrici viene fatta mescolando 6 µg di

SBC in 100 µl di acqua deionizzata a cui vengono aggiunte quantità variabili di succhi gastrici e di acqua deionizzata. Dopo 60 min di incubazione a 37°C, tutti i campioni sono stati testati in accordo con il test di Ames (Maron and Ames, 1983), usando tre replicati per miscela. Piastre senza cromo sono state testate per valutare il numero di revertenti spontanei. Il Cr(VI) viene addizionato ad una soluzione senza succo gastrico che viene incluso come controllo positivo nel test di reversione di Ames.

I risultati di entrambi gli approcci sperimentali (DFC e Ames) sono stati usati per creare una retta di regressione per ogni campione testato e per quantificare la capacità di riduzione del Cr(VI). I risultati del test di Ames vengono espressi come numero dei revertenti di *S. typhimurium his<sup>-</sup>*, al posto dei valori di OD per effettuare i calcoli.

## **7. Risultati**

### **7.1. Riduzione di Cr(VI) in campioni di succo gastrico umano pre e postprandiale**

Dopo le varie prove di standardizzazione eseguite su succo gastrico al fine di generare dati comparativi, abbiamo testato tutti i 16 campioni in un singolo esperimento utilizzando il metodo colorimetrico parallelamente al test di mutagenicità. I risultati di queste analisi sono riportati in Tabella 4, insieme ai relativi valori di pH dei singoli campioni esaminati, che oscillavano in un range fra 1,6 e 2,5 per campioni preprandiali e fra 1,9 e 3,5 per i campioni postprandiali. Con entrambi gli approcci sperimentali, è stata calcolata la retta di regressione e quindi derivata la capacità di riduzione del Cr(VI) o la perdita di mutagenicità di ciascun campione dopo 60 min di contatto con quantità variabili di succo gastrico a 37°C. Ad esempio, la prima equazione della retta di regressione per il campione N. 1 in Tabella 4 è  $y = -0.0003x + 0,114$ , dove y è la dose

di SBC (in  $\mu\text{g}$ ) e  $x$  è la quantità di succo gastrico (in  $\mu\text{l}$ ). Per ridurre tutte i  $6 \mu\text{g}$  di SBC presente nella miscela, l'equazione sarà  $0 = -0.0003x + 0,114$ , e quindi  $x = 380 \mu\text{l}$ . Ciò significa che abbiamo bisogno di  $380 \mu\text{l}$  di succo gastrico per ridurre  $6 \mu\text{g}$  di SBC. Quindi, facendo una proporzione, possiamo affermare che  $1 \text{ ml}$  di succo gastrico ridurranno  $15,8 \mu\text{g}$  di SBC. Poiché il Cr rappresenta il  $34,9\%$  della molecola di SBC (diidrato), il risultato finale è che  $1 \text{ ml}$  di succo gastrico ridurrà  $5,5 \mu\text{g}$  di Cr(VI), come mostrato nella Tabella 4. Calcoli simili sono state effettuate utilizzando il test di mutagenicità, salvo che, invece di usare valori di OD, abbiamo usato il numero di revertanti di *S. typhimurium his<sup>-</sup>*. Un esame della Tabella 4 evidenzia che, indipendentemente dall'approccio sperimentale, i campioni postprandiali erano sempre più efficienti dei corrispondenti campioni preprandiali nel ridurre il Cr(VI) e nell'inibirne la mutagenicità. La capacità media ( $\pm$  ES) di riduzione del Cr(VI) dei campioni preprandiali, valutato mediante test colorimetrico, era di  $10,2 \pm 2,39 \mu\text{g Cr(VI)} / \text{ml}$  succo gastrico e quella di campioni post-prandiali era  $20,4 \pm 2.61 \mu\text{g Cr(VI)}$ , differenza statisticamente significativa ( $P < 0,01$ ). Saggiando i campioni con il test di Ames, la diminuzione di mutagenicità prodotta dai succhi gastrici preprandiali corrisponde a una perdita di  $13,3 \pm 1,91 \mu\text{g Cr(VI)}$ , e quella prodotta da campioni post-prandiali corrisponde a  $25,6 \pm 2,89 \mu\text{g Cr(VI)}$ . Anche in questo caso la differenza tra le tue condizioni era statisticamente significativa ( $P < 0,01$ ). Anche se i dati di mutagenesi sembrano dare livelli di riduzione del Cr(VI) leggermente superiori rispetto ai dati colorimetrici, non vi era alcuna differenza statisticamente significativa tra i due gruppi di dati confrontando entrambi campioni preprandiali e postprandiali o tutti i campioni combinati. I risultati ottenuti testando 16 campioni di succo gastrico mediante test

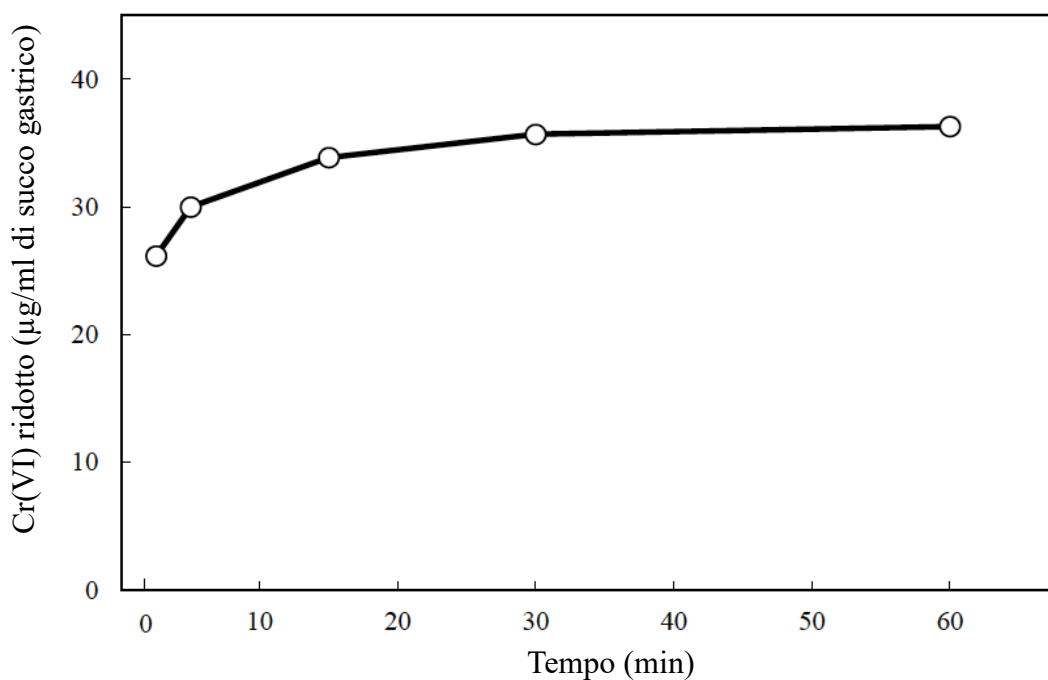
colorimetrico e quelli ottenuti utilizzando il test di mutagenicità erano significativamente correlati ( $r = 0,675$ ;  $P < 0,01$ ).

| Campione | Cod, identificativo | Raccolta del Campione | pH  | Cr(VI) ridotto ( $\mu\text{g/mL}$ ) |                        |
|----------|---------------------|-----------------------|-----|-------------------------------------|------------------------|
|          |                     |                       |     | Metodo colorimetrico                | Saggio di Mutagenicità |
| N. 1     | ASS                 | Preprandiale          | 1,6 | 5,5                                 | 7,8                    |
| N. 2     | ASS                 | Postprandiale         | 1,9 | 26,6                                | 38,9                   |
| N. 3     | GEM                 | Preprandiale          | 1,9 | 5,6                                 | 10,8                   |
| N. 4     | GEM                 | Postprandiale         | 3,5 | 10,9                                | 18,8                   |
| N. 7     | SAM                 | Preprandiale          | 1,9 | 20,2                                | 22,0                   |
| N. 8     | SAM                 | Postprandiale         | 1,9 | 29,7                                | 31,6                   |
| N. 11    | MAR                 | Preprandiale          | 1,6 | 9,7                                 | 11,3                   |
| N. 12    | MAR                 | Postprandiale         | 2,2 | 21,6                                | 20,2                   |
| N. 13    | BOD                 | Preprandiale          | 1,6 | 4,6                                 | 13,4                   |
| N. 14    | BOD                 | Postprandiale         | 2,2 | 26,6                                | 20,3                   |
| N. 15    | BRU                 | Preprandiale          | 2,5 | 2,3                                 | 6,0                    |
| N. 16    | BRU                 | Postprandiale         | 3,0 | 9,3                                 | 35,0                   |
| N. 17    | DEL                 | Preprandiale          | 1,6 | 17,6                                | 18,1                   |
| N. 18    | DEL                 | Postprandiale         | 3,5 | 18,6                                | 20,8                   |
| N. 19    | MAZ                 | Preprandiale          | 1,6 | 17,1                                | 16,7                   |
| N. 20    | MAZ                 | Postprandiale         | 2,0 | 19,7                                | 19,3                   |

Tabella 4. Quantità di Cr(VI) ridotto per ml di campione di succo gastrico pre e postprandiale, valutati mediante test colorimetrico (DFC) e saggio di mutagenicità (*S. typhimurium*, ceppo TA104, in assenza di S9).

## 7.2. Tempo-dipendenza della riduzione del Cr(VI)

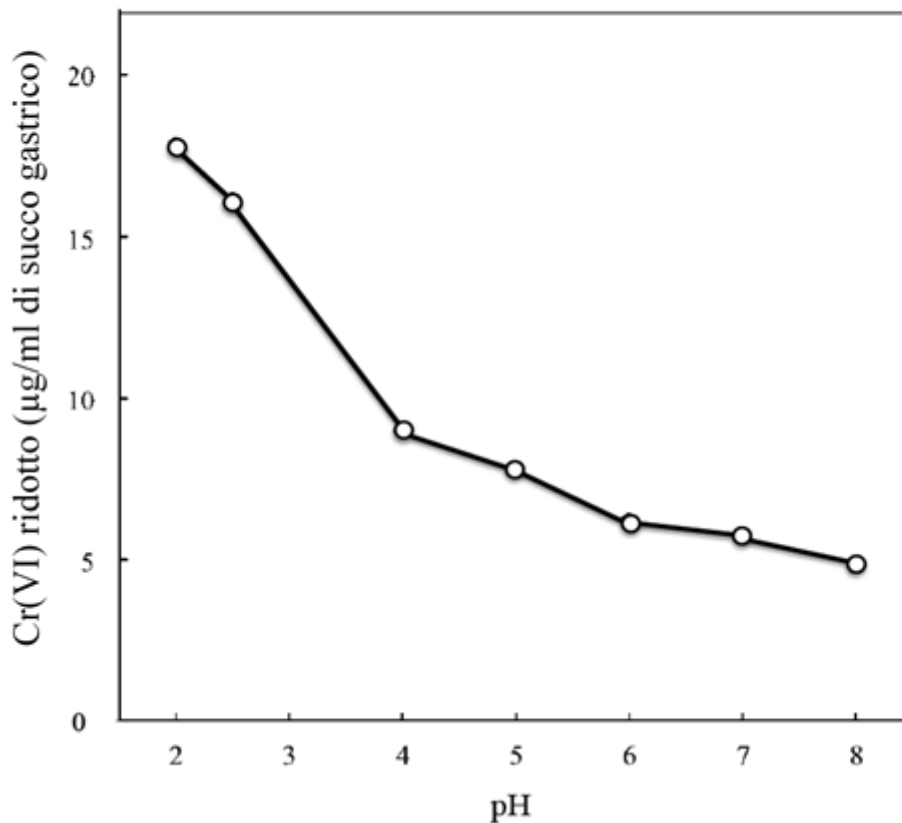
La Figura 2 mostra i risultati colorimetrici, ottenuti tramite DFC, della variazione dei tempi di reazione del succo gastrico ottenuto da un pool dei campioni post-prandiale. La riduzione del Cr(VI) è avvenuta rapidamente entro 1 min e si completava quasi totalmente dopo 30 min. Nello specifico, se consideriamo in modo arbitrario che dopo 60 minuti di contatto del succo gastrico con il Cr la riduzione del Cr(VI) raggiunga il 100%, dopo 30 min la riduzione interessa il 98,3% della dose iniziale, così dopo 15 min il 93,3%, dopo 5 min il 78,4%, dopo 1 min il 72,1% e al tempo 0 il 31,8%. Questa cinetica ci indica come la maggior parte della riduzione di Cr(VI) avvenga entro il primo minuto ed è quasi completata dopo 30 min.



**Figure 2.** Tempo-dipendenza della riduzione del Cr(VI) in seguito a incubazione a 37°C con succo gastrico (pH 2,0) per tempi compresi tra 0 e 60 min e valutati con metodo colorimetrico DFC.

### 7.3. pH-dipendenza della riduzione del Cr(VI)

La Figura 3 mostra i risultati della variazione di pH nel succo gastrico. È evidente che la capacità della riduzione del Cr(VI) nel succo gastrico diventa meno efficiente con l'incrementare del pH. Il decremento acuto della riduzione del Cr(VI) inizia a  $\text{pH} \geq 4$ , e l'efficienza di riduzione appare decrementata di 3,6 volte quando la capacità è comparata a quella a pH 2 ( $18 \mu\text{g Cr(VI)/ml}$  succo gastrico) con quella a pH 8 ( $5 \mu\text{g Cr(VI)/ml}$  succo gastrico).



**Figura 3.** pH-dipendenza della riduzione del Cr(VI) dopo preincubazione per 60 min con un pool di succo gastrico a pH 2,5.



#### **7.4. Stabilità termica del succo gastrico**

La riduzione del Cr(VI) non è stata compromessa dal riscaldamento del succo gastrico, sia se effettuata a 56°C per 30 min o 70°C per 20 min. Inoltre, 2 esperimenti separati mostrano evidenza che la riduzione del Cr(VI) non è stata influenzata quando i campioni furono conservati per 10 giorni a 20°C al buio. Allo stesso modo, la riduzione del Cr(VI) non è stata influenzata da cicli di scongelamento e scongelamento anche per 3 o 4 volte (dati non mostrati).

### **8. Discussione**

Il presente studio ha valutato, per la prima volta in letteratura, la riduzione del Cr(VI) in campioni di succo gastrico pre e postprandiale prelevati da soggetti sani. Nel complesso, i risultati ottenuti confermano che (a) il succo gastrico umano è molto efficace nel ridurre il Cr (VI) e nell'inibirne l'attività mutagena; (b) anche rimuovendo detriti di cibo, l'attività di riduzione del Cr (VI) è notevolmente aumentata durante i periodi postprandiali; (c) la riduzione del Cr (VI) è molto rapida, molto più veloce rispetto al tempo di permanenza dei cibi e delle bevande nello stomaco; (d) la riduzione del Cr (VI) è pH-dipendente ed è dovuta ai componenti termostabili di questo fluido biologico, (e) l'azione di questi componenti riducenti è favorita dal pH basso e diventa meno pronunciata con l'aumentare del pH.

In particolare, i dati risultanti dalle determinazioni dose-risposta usando il metodo colorimetrico DFC hanno indicato che le capacità riducenti dei campioni preprandiali erano di  $10,2 \pm 2,39 \mu\text{g Cr(VI)} / \text{ml}$  di succo gastrico e quella dei campioni postprandiali era di  $20,44 \pm 2,61 \mu\text{g Cr(VI)} / \text{ml}$  di succo gastrico. Usando il test di

Ames come bioindicatore della riduzione del Cr(VI), la perdita di mutagenicità prodotta da campioni preprandiali corrisponde a  $13,3 \pm 1,91 \mu\text{g Cr(VI)}$ , e quella prodotta da campioni postprandiali corrisponde a  $25,6 \pm 2,89 \mu\text{g Cr(VI)/ml}$  di succo gastrico. Questi dati sono paragonabili a quelli riportati in studi precedenti svolti nel nostro laboratorio. Infatti, nel 1982, è stato riportato che campioni di succo gastrico di 4 soggetti a digiuno non trattati riducevano  $9,2 \pm 0,4 \mu\text{g Cr(VI)/ml}$  (Petrilli e De Flora, 1982). Nel 1987, la valutazione circadiana della riduzione del Cr(VI) di campioni di succhi gastrici prelevati da pazienti ospedalizzati, affetti principalmente da ulcere, ha mostrato che l'attività riducente dei campioni dei soggetti a digiuno era  $8,3 \pm 4,7 \mu\text{g Cr(VI)/ml}$ , e durante le 4 h dopo ogni pasto riduzione media del Cr(VI) era  $31,4 \pm 6,7 \mu\text{g Cr (VI)/ml}$ .

Pertanto, i risultati ottenuti utilizzando due metodi analitici paralleli e un sistema biologico erano molto simili. Questi risultati sono in disaccordo con l'ipotesi sollevata da Zhitkovich (2005), che l'uso del metodo DFC per valutare la riduzione del Cr(VI) da parte del succo gastrico può sovrastimare la reazione a causa della formazione di artefatti. In particolare, molti esperimenti separati che hanno utilizzato diversi approcci metodologici hanno costantemente dimostrato che il succo gastrico di individui a digiuno è in grado di ridurre circa  $10 \mu\text{g Cr(VI)/ml}$ . Poiché in un individuo a digiuno la secrezione gastrica quotidiana è 1000-1500 ml, si può calcolare che la riduzione basale nello stomaco umano sia di 10-15 mg Cr(VI) / giorno. La capacità di riduzione del succo gastrico, raccolto dagli stessi soggetti sani, raddoppiava dopo 1,5 ore da un pasto leggero. Questo dato non può essere confrontato con i valori registrati nei pazienti con ulcera in uno studio precedente (De Flora et al., 1987) perché la riduzione del Cr(VI) veniva monitorata a più intervalli di tempo, e il picco di riduzione variava da individuo a individuo durante il periodo di 3-4-h dopo ogni pasto. In ogni caso, tenendo conto che

circa 800 ml di succo gastrico sono secreti nelle 4 ore successive ad ogni pasto, i dati ottenuti in soggetti sani suggeriscono che circa 16 mg di Cr (VI) vengono ridotti in ambiente gastrico dopo ogni pasto. È evidente che la riduzione del Cr(VI) in Cr(III) nello stomaco, e in altri compartimenti del corpo, rappresenta il meccanismo limitante la tossicità, la genotossicità e la cancerogenicità *in vivo* (De Flora, 2000). Facendo riferimento allo studio di De Flora *et al.* (1987), il gruppo di lavoro dell'IARC ha “interpretato queste evidenze come fattori limitanti l'attività tossica del Cr(VI) *in vivo*” (IARC, 1990). Quando la U.S. EPA ha fissato i nuovi standard che definivano la potabilità dell'acqua, ha riconosciuto che “la normale fisiologia del organismo provvede alla detossificazione del Cr(VI) introdotto per via orale” (U.S. EPA, 1991). L'Agency for Toxic Substances and Disease Register ha affermato che “questi meccanismi limitano la biodisponibilità e attenuano il potenziale effetto del Cr(VI) *in vivo*” (ATSDR, 1993). Infine, l'associazione Europea della Sicurezza Alimentare (EFSA) ha riportato che “il determinante dell'effetto genotossico del Cr(VI) *in vivo* è la ridotta capacità del tratto gastrointestinale che può limitare significativamente o prevenire completamente l'assorbimento del Cr(VI) nel sangue e/o nella distribuzione nei tessuti target se somministrati per via orale” (EFSA, 2014).

Sulla base di questi meccanismi, è molto improbabile che l'assunzione del Cr(VI) con l'acqua potabile ponga le basi per un eventuale rischio cancerogeno per l'uomo, anche se le concentrazioni di Cr(VI) fossero largamente eccedenti i valori trovati nelle forniture di acqua potabile (McNeil *et al.*, 2012; U.S. EPA, 2014). Inoltre, una revisione sistematica della letteratura ed una metanalisi sull'incidenza del cancro nella cavità orale, esofago, stomaco, intestino tenue, colon e del retto in seguito all'ingestione di Cr(VI), in lavoratori del settore esposti dal 1950 al 2009, ha dimostrato

come l'esposizione occupazionale non rappresenti un maggior rischio di sviluppo di tumori gastrointestinali nella popolazione esaminata rispetto a quella generale (Gatto *et al.*, 2010). Contrariamente, un'altra metanalisi eseguita su soggetti professionalmente esposti ha concluso nel seguente modo: "Nel complesso, questi risultati suggeriscono che il Cr(VI) è un agente cancerogeno per lo stomaco negli esseri umani, che è coerente con i risultati del tumore riportati in studi su roditori" (Welling *et al.*, 2015).

L'affermazione che il Cr(VI) sia un agente cancerogeno per lo stomaco nei roditori è sorprendente non è documentato da nessuno altro studio tanto da non essere stato menzionato nella stesura della monografia pubblicata dalla IARC nel 1990. D'altra parte, lo studio eseguito dalla NTP, atto a valutare se l'ingestione di Cr (VI) con l'acqua potabile potesse indurre tumori nei roditori a livello gastrico, non ha evidenziato alcun effetto cancerogeno, anche a dosi elevate, sia nel prestomaco che nello stomaco ghiandolare di topi e di ratti (Stout *et al.*, 2009). La conclusione riportata nello studio NTP è stata che “ l'esposizione al Cr (VI) ha portato ad un'aumentata incidenza di rare neoplasie dell'epitelio squamoso che riveste la cavità orale (mucosa orale e della lingua) nei ratti, e dell'epitelio che delimita il piccolo intestino di entrambi i generi” (Stout *et al.*, 2009). In particolare, un incremento statisticamente significativo di tumori del piccolo intestino si sono osservati alle più alte dosi di bicromato SBC diidrato testato nei topi maschi (257.4 mg/l) e alle due più alte dosi testate nei topi femmine (172 e 516 mg/l). Questi risultati sono in accordo con le conclusioni di uno studio precedente di genotossicità il quale ha attestato che il danno al DNA era assente non solo nel prestomaco o nello stomaco ghiandolare, ma anche nel duodeno di topi che assumevano SBC nell'acqua potabile, alle dosi di 5 e 20 mg Cr(VI)/l (De Flora *et al.*, 2008).

È anche dimostrato che vi sono notevoli differenze interspecie nella suscettibilità al Cr(VI) orale. Infatti, dosi elevate di Cr(VI) somministrato in ratti, anche a dosi elevate, non ha determinato l'insorgenza di neoplasie a livello enterico, avvalorando la tesi che questo elemento non è un cancerogeno (Stout *et al.*, 2009). Nonostante il succo gastrico dei roditori abbia una certa capacità riducente nei riguardi del Cr(VI) (Donaldson and Barreras, 1966; Proctor *et al.*, 2012; Kirman *et al.*, 2013), la riduzione nello stomaco dei roditori risulta meno efficiente che negli esseri umani a causa delle differenze nella struttura anatomo-istologica e della normale fisiologia dello stomaco di questa specie. Innanzitutto, il pH dell'ambiente gastrico è meno acido nei roditori che negli esseri umani, infatti negli esseri umani raggiunge valori prossimi a 1-2, mentre nei roditori è di 3-5, come dimostrato da Granger (1985). Pertanto, proprio per questo motivo, la riduzione del Cr(VI) dovrebbe essere meno efficiente nei roditori che negli esseri umani. Tuttavia, le principali differenze risiedono nella struttura anatomo-istologica dello stomaco e nel differente processo fisiologico di digestione e trasformazione delle sostanze tossiche ingerite. Infatti, negli esseri umani l'intero organo è secretorio e presenta numerose pieghe prominenti (pliche), mentre nei roditori lo stomaco presenta due regioni distinte (prestomaco e stomaco ghiandolare) separate da una netta linea di demarcazione (*Margo plicatus*). Essendo il prestomaco privo di muscolatura striata e in virtù della marcata pressione intratoracica ed addominale, i roditori come il topo non possiedono il riflesso emetico. L'epitelio stratificato in questo tratto dello stomaco assume una struttura squamosa altamente cheratinizzata costituita da 2-3 strati e privo di ghiandole e *mucosea muscolaris*, che lo rendono in particolar modo vulnerabile a sostanze irritanti, come alte dosi di Cr(VI). Viceversa, lo stomaco ghiandolare, anteposto al duodeno, ha un epitelio secernente e pliche che sono evidenti quando lo stomaco è

vuoto (DeSesso and Jacobson, 2001). Il succo gastrico umano, il cui costituente principale è l'acido cloridrico, viene secreto dalle ghiandole ossintiche e piloriche dello stomaco. In soggetti a digiuno, prove sperimentali hanno dimostrato che il tempo necessario al dimezzamento del volume dello stomaco riempito con soluzioni saline è di 12 min, mentre il tempo di transito di un pasto nello stomaco è di circa 4 h (Granger *et al.*, 1985). Nei roditori, il prestomaco, che costituisce il 60% della superficie dello stomaco, funziona come una riserva di cibo, che viene trasferito allo stomaco ghiandolare in caso di necessità metaboliche. La quantità di chimo trasportato nel duodeno è indipendente dal riempimento dello stomaco e corrisponde al fabbisogno energetico reale del roditore. Poiché i topi hanno un regime alimentare continuo (de Zwart *et al.*, 1999), non vi sono picchi postprandiali di secrezione del succo gastrico che invece, negli esseri umani sono responsabili della maggior della riduzione Cr(VI).

In ogni caso, la capacità detossificante dell'ambiente gastrico non è infinita. La constatazione che tumori intestinali sono stati rilevati nell'intestino tenue di topi trattati con SBC nell'acqua potabile (Stout *et al.*, 2009) suggerisce che, a dosi massive, la capacità riducente del tratto gastroenterico dei topi poteva essere superata. A causa di queste differenze interspecie, i risultati dello studio NTP sembrano riflettere un'inferiore efficacia dello stomaco di topo nel ridurre il Cr(VI) e per questo motivo non possono essere trasferiti all'uomo. Per inciso, i tumori che colpiscono l'intestino tenue sono estremamente rari negli esseri umani. Si noti inoltre che le lunghezze relative del piccolo intestino nei roditori differiscono da quello umano per il fatto che il digiuno costituisce quasi l'intero intestino tenue (DeSesso and Jacobson, 2001). Inoltre, come riportato da De Flora *et al.*, (1987) la variazione circadiana del pH gastrico così come l'assunzione di antagonisti dell'istamina H<sub>2</sub> (famotidina), incrementano i valori di pH nonché

l'attività anti-secretoria, influenzando l'attività antimutagena svolta dal succo gastrico. Questo aspetto risulta di notevole importanza in quanto i soggetti che fanno uso di terapie antiacido che inibiscono l'attività della pompa protonica, così come l'infezione da *Helicobacter pylori*, gastrite autoimmune, anemia perniziosa e mucopolisidosi tipo IV, potrebbero determinare una ridotta capacità di detossicazione del Cr(VI).

In conclusione, i risultati di questo studio dimostrano che, come precedentemente documentato nei pazienti con ulcera, la capacità nel ridurre il Cr(VI) aumenta notevolmente dopo i pasti in individui sani. Tale meccanismo pH-dipendente è molto efficace nell'uomo e fornisce una formidabile barriera limitante la tossicità, la genotossicità e la cancerogenicità indotta dal Cr(VI) assunto per via orale. I dati generati in questo studio possono contribuire a valutare i potenziali rischi per la salute indotti dall'assunzione del Cr(VI) con l'acqua potabile a concentrazioni ambientali rilevanti. Inoltre questi dati pongono le basi per lo sviluppo di modelli farmacocinetici per studiare il destino del Cr(VI) nello stomaco umano.

## 9. Bibliografia citata

Abraham AS, Brooks BA, Eylath U. The effects of chromium supplementation on serum glucose and lipids in patients with and without non-insulin-dependent diabetes. *Metabolism*, 1992; 41:768–771.

Acharya S, Mehta K, Krishnan S, Rao CV. A subtoxic interactive toxicity study of ethanol and chromium in male Wistar rats. *Alcohol*. 2001; 23(2):99-108.

Albarracin CA, Fuqua BC, Evans JL, Goldfine ID. Chromium picolinate and biotin combination improves glucose metabolism in treated, uncontrolled overweight to obese patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, 2008; 24:41–51.

Althuis MD, Jordan NE, Ludington EA, Wittes JT. Glucose and insulin responses to dietary chromium supplements: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 2002 Jul; 76:148-55.

Anderson RA, Cheng N, Bryden NA, Polansky MM, Cheng N, Chi J, Feng J. Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes*, 1997; 46:1786–1791.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for chromium. U.S. Department of Commerce, Springfield, VA; 1993.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological Profile for Chromium. US Department of Health and Human Services. 2012 Public Health Services, Atlanta, GA.

Bahijiri SM, Mira SA, Mufti AM, Ajabnoor MA. The effects of inorganic chromium and brewer's yeast supplementation on glucose tolerance, serum lipids and drug dosage in individuals with type 2 diabetes. *Saudi Med J*, 2000; 21:831–837.

Balachandar V, Arun M, Mohana Devi S, Velmurugan P, Manikantan P, Karthick Balk EM, Tatsioni A, Lichtenstein AH, Lau J, Pittas AG. Effect of chromium supplementation on glucose metabolism and lipids: a systematic review of randomized controlled trials. *Diabetes Care*, 2007; 30:2154–2163.

Benova D, Hadjidekova V, Hristova R, Nikolova T, Boulanova M, Georgieva I, Grigorova M, Popov T, Panev T, Georgieva R, Natarajan AT, Darroudi F, Nilsson R. Cytogenetic effects of hexavalent chromium in Bulgarian chromium platers. *Mutat Res*. 2002; 514:29-38.



- Blankenship LJ, Carlisle DL, Wise JP, Orenstein JM, Dye LE 3rd, Patierno SR. Induction of apoptotic cell death by particulate lead chromate: differential effects of vitamins C and E on genotoxicity and survival. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997; 146:270-280
- Bryant HE, Ying S, Helleday T. Homologous recombination is involved in repair of chromium-induced DNA damage in mammalian cells. *Mutat Res.* 2006; 599
- Cavalleri A, Minoia C. [Serum and erythrocyte chromium distribution and urinary elimination in persons occupationally exposed to chromium (VI) and chromium (III)]. *G Ital Med Lav.* 1985; 7:35-8.
- Cefalu WT, Hu FB. Role of chromium in human health and in diabetes. *Diabetes Care.* 2004; 27:2741-51.
- Cefalu WT, Rood J, Pinsonat P, Qin J, Sereda O, Levitan L, Anderson RA, Zhang XH, Martin JM, Martin CK, Wang ZQ, Newcomer B. Characterization of the metabolic and physiologic response to chromium supplementation in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*, 2010; 59:755–762.
- Cefalu WT, Wang ZQ, Zhang XH, Baldor LC, Russell JC. Oral chromium picolinate improves carbohydrate and lipid metabolism and enhances skeletal muscle Glut-4 translocation in obese, hyperinsulinemic (JCR-LA corpulent) rats. *J Nutr.* 2002; 132:1107-14.
- Chen F, Shi X. Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002; 42:105–121
- Chen G, Liu P, Pattar GR, Tackett L, Bhonagiri P, Strawbridge AB, Elmendorf JS. Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhances insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism. *Mol Endocrinol.* 2006; 20:857-70.
- Cieslak-Golonka M. Toxic and Mutagenic Effects of Chromium(VI). *Polyhedron.* 1995, 15:3667 – 3689
- Clochesy JM. Chromium ingestion: A case report. *J Emerg Nurs.* 1984; 10:281–282
- Coogan T, Motz J, Snyder C, et al. Differential DNA-protein crosslinking in lymphocytes and liver following chronic drinking water exposure of rats to potassium chromate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991; 109:60–72.

Costa M, Klein C. Response to comments by Post and Stern on article "Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans". *Crit Rev Toxicol.* 2006; 36:779.

Cupo DY, Wetterhahn KE. Binding of chromium to chromatin and DNA from liver and kidney of rats treated with sodium dichromate and chromium (III) chloride *in vivo*. *Cancer Res.* 1985; 45:1146–1151.

De Flora S. Metabolic deactivation of mutagens in the Salmonella/microsome test. *Nature.* 1978; 271: 455-6.

De Flora S, Bennicelli C, Znacchi P, Camoirano A, Petruzzelli S, Giuntini C. Metabolic activation and deactivation of mutagens by preparations of human lung parenchyma and bronchial tree. *Mutat Res.* 1984;139:9-14.

De Flora, S., Badolati, G.S., Serra, D., Picciotto, A., Magnolia, M.R., Savarino, V. Circadian reduction of chromium in the gastric environment. *Mutat. Res.* 1987; 192, 169-174.

De Flora S. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21, 533-541.

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, 60-67.

de Zwart, L.L., Rompelberg, C.J.M., Spis, A.J.A.M., Welink, J., van Engelen, J.G.M. Anatomical and physiological differences between various species used in studies on the pharmacokinetics and toxicology of xenobiotics. The National Institute of Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands: 1999; RIVM Report 623860010

DeSesso, J.M., Jacobson, C.F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food Chem. Toxicol.* 2001; 39, 209-228.

Derelanko MJ, Rinehart WE, Hilaski RJ, Thompson RB, Löser E. Thirteen-week subchronic rat inhalation toxicity study with a recovery phase of trivalent chromium compounds, chronic oxide, and basic chromium sulfate. *Toxicol Sci.* 1999; 52:278–288.

Donaldson, R.M., Jr., Barreras, R.F.,. Intestinal absorption of trace quantities of chromium. *J. Lab. Clin. Med.* 1966; 68, 484-493.

Dong F, Kandadi MR, Ren J, Sreejayan N. Chromium (D-phenylalanine)<sub>3</sub> supplementation alters glucose disposal, insulin signaling, and glucose transporter-4 membrane translocation in insulin-resistant mice. *J Nutr.* 2008; 138:1846-51.

EFSA CONTAM (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain). Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of chromium in food and drinking water. *EFSA J.* 2014; 12, 1-261.

Evans GW. The effect of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans. *Int J Biosoc Med Res*, 1989; 11:163–180.

Evert AB, Boucher JL, Cypress M, Dunbar SA, Franz MJ, Mayer-Davis EJ, Neumiller JJ, Nwankwo R, Verdi CL, Urbanski P, Yancy WS Jr; American Diabetes Association. Nutrition therapy recommendations for the management of adults with diabetes. *Diabetes Care.* 2013; 36:3821-42.

Franchini I, Mutti A. Selected toxicological aspects of chromium(VI) compounds. *Sci Total Environ.* 1988; 71:379–387

Fregert, S. (1981) Chromium valencies and cement dermatitis. *Br J Dermatol* 1981;105:7-9.

Fristedt B, Lindqvist B, Schuetz A, Ovrum P. Survival in a case of acute oral chromic acid poisoning with acute renal failure treated by haemodialysis. *Acta Med Scand.* 1965; 177:153–159.

Gao M, Levy LS, Faux SP, Aw TC, Braithwaite RA, Brown SS. Use of molecular epidemiological techniques in a pilot study on workers exposed to chromium. *Occup Environ Med.* 1994;v51:663-8.

Gatto, N.M., Kelsh, M.A., Mai, D.H., Suh, M., Proctor, D.M. Occupational exposure to hexavalent chromium and cancers of the gastrointestinal tract: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol.* 2010; 34, 388-399.

Ghosh D, Bhattacharya B, Mukherjee B, Manna B, Sinha M, Chowdhury J, Chowdhury S. Role of chromium supplementation in Indians with type 2 diabetes mellitus. *J Nutr Biochem*, 2002; 13:690–697.

Glaser U, Hochrainer D, Klöppel H, Kuhnen H. Low level chromium(VI) inhalation effects on alveolar macrophages and immune functions in Wistar rats. *Arch Toxicol.* 1985; 57:250–256.

- Glaser U, Hochrainer D, Steinhoff D. Investigation of irritating properties of inhaled CrVI with possible influence on its carcinogenic action. *Environ Hyg.* 1990; 2:235–245.
- Granger, D.N., Barrowman, J.A., Kvyetis, P.R.,. *Clinical Gastrointestinal Physiology.* WB Saunders, Philadelphia, PA. 1985.
- Grant AP, McMullen JK. The effect of brewer's yeast containing glucose tolerance factor on the response to treatment in Type 2 diabetics. A short controlled study. *Ulster Med J*, 1982; 51:110–114.
- Ha L, Ceryak S, Patierno SR. Generation of S phase-dependent DNA double-strand breaks by Cr(VI) exposure: Involvement of ATM in Cr(VI) induction of gammaH2AX. *Carcinogenesis.* 2004; 25:2265–2274.
- Halasova E, Matakova T, Musak L, Polakova V, Vodicka P. Chromosomal damage and polymorphisms of DNA repair genes XRCC1 and XRCC3 in workers exposed to chromium. *Neuro Endocrinol Lett.* 2008; 29 658-62.
- Hamamy HA, Al-Hakkak ZS, Hussain AF. Chromosome aberrations in workers in a tannery in Iraq. *Mutat Res.* 1987; 189:395–398.
- Hansen MB, Johansen JD, Menne T. Chromium allergy: Significance of both Cr(III) and Cr(VI) Contact Dermatitis. 2003; 49:206–212.
- Hanslian L, Navratil J, Jurak J, et al. Damage to the upper respiratory tract by a chromic acid aerosol *Pracovni Lekarstvi.* 1967; 19:294–298.
- Hayes RB, Lilienfeld AM, Snell LM. Mortality in chromium chemical production workers: A prospective study. *Int J Epidemiol.* 1979; 8:365–374.
- Hermann J, Arquitt A. Effect of chromium supplementation on plasma lipids, apolipoproteins, and glucose in elderly subjects. *Nutr Res* 1994; 14: 671-4
- Holmes AL, Wise SS, Sandwick SJ, Wise JP Sr. The clastogenic effects of chronic exposure to particulate and soluble Cr(VI) in human lung cells. *Mutat Res.* 2006; 610:8-13. Epub 2006 Jul 25.
- Hornig D. Distribution of ascorbic acid, metabolites and analogues in man and animals. *Ann N Y Acad Sci.* 1975; 30:258:103-18.

Husgafvel-Pursiainen K, Kalliomaki PL, Sorsa M. A chromosome study among stainless steel workers. *J Occup Med.* 1982; 24:762–766.

IARC. Chromium, nickel and welding. Lyons, France: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization; 1990. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. pp. 49–256.

ICRP. Human respiratory tract model for radiological protection. Pergamon Press, Oxford: International Commission on Radiological Protection; 1994. ICRP publication 66.

Izzotti A, Bagnasco M, Camoirano A, Orlando M, De Flora S. DNA fragmentation, DNA-protein crosslinks, postlabeled nucleotidic modifications, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the lung but not in the liver of rats receiving intratracheal instillations of chromium(VI). Chemoprevention by oral N-acetylcysteine. *Mutat Res.* 1998; 400:233-44.

Jain SK, Kahlon G, Morehead L, Dhawan R, Lieblong B, Stapleton T, Caldito G, Hoeldtke R, Levine SN, Bass PF Effect of chromium dinicocysteinate supplementation on circulating levels of insulin, TNF- $\alpha$ , oxidative stress, and insulin resistance in type 2 diabetic subjects: Randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Mol Nutr Food Res*, 2012; 56:1333–1341.

Jeejeebhoy KN, Chu RC, Marliss EB, Greenberg GR, Bruce-Robertson A. Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr.* 1977; 30(4):531-8.

Kaufman DB, DiNicola W, McIntosh R. Acute potassium dichromate poisoning: Treated by peritoneal dialysis. *Am J Dis Child.* 1970; 119:374–376.

Kaya B, Creus A, Velázquez A, Yanikoğlu A, Marcos R. Genotoxicity is modulated by ascorbic acid. Studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutat Res.* 2002; 520:93-101.

Kiilunen M, Kivisto H, Ala-Laurila P, et al. Exceptional pharmacokinetics of trivalent chromium during occupational exposure to chromium lignosulfonate dust. *Scand J Work Environ Health.* 1983; 9:265–271.

Kim HY, Lee SB, Jang BS. Subchronic inhalation toxicity of soluble hexavalent chromium trioxide in rats. *Arch Toxicol.* 2004; 78:363–368

Kirman, C.R, Aylward, L.L., Suh M., Harris, M.A., Thompson, C.M., Haws, L.C., Proctor, D.M., Lin, S.S., Parker, W., Hays, S.M. Physiologically based pharmacokinetic model for humans orally exposed to chromium. *Chem.-Biol. Interact.* 2013; 204 (1),13-27.

Kirman C.R., Proctor D.M., Suh, M., Hays, S.M., Gürleyük, H., Gerads, R., De Flora, S., Parker, W., Haws, L.C., Harris, M.A., 2016. Reduction of hexavalent chromium in fasted and fed human stomach fluid. II. Ex vivo gastric reduction modeling. Submitted for publication (2016).

Kleefstra N, Houweling ST, Jansman FG, Groenier KH, Gans RO, Meyboom-de Jong B, Bakker SJ, Bilo HJ. Chromium treatment has no effect in patients with poorly controlled, insulin-treated type 2 diabetes in an obese Western population: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Care*, 2006; 29:521–525.

Kleiner AM, Stolbun BM, Likhacheva EI, Beliaeva LN. Certain indices of the functional status of the myocardium and hemodynamics in chronic occupational poisoning by chromium compounds. *Gig Tr Prof Zabol.* 1970; 14:7-10.

Korallus U, Ehrlicher H, Wustefeld E, et al. Trivalent chromium compounds - results of a study in occupational medicine. *Arb Soz Prev.* 1974; 9:51–54.

Kornhauser C, Wróbel K, Wróbel K, Malacara JM, Nava LE, Gómez L, González R. Possible adverse effect of chromium in occupational exposure of tannery workers. *Ind Health.* 2002; 40:207-13.

Król E, Krejpcio Z, Byks H, Bogdański P, Pupek-Musialik D. Effects of chromium brewer's yeast supplementation on body mass, blood carbohydrates, and lipids and minerals in type 2 diabetic patients. *Biol Trace Elem Res*, 2011; 143:726–737.

Kumar A, Rana SVS. Enzymological effects of hexavalent chromium in the rat kidney. *Int J Tissue React.* 1984; 6:135–139.

Kumar A, Rana SVS. Lipid accumulation in chromium-poisoned rats. *Int J Tissue React.* 1982; 4:291–295.

Kumar A, Sasikala K, Venkatesan C. Evaluation of the genetic alterations in direct and indirect exposures of hexavalent chromium [Cr(VI)] in leather tanning industry workers North Arcot District, South India. *Int Arch Occup Environ Health.* 2010; 83:791–801

- Lai MH. Antioxidant effects and insulin resistance improvement of chromium combined with vitamin C and E supplementation for type 2 diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr*, 2008; 43:191–198.
- Lee NA, Reasner CA. Beneficial effect of chromium supplementation on serum triglyceride levels in NIDDM. *Diabetes Care*, 1994; 17:1449–1452.
- Leroyer C, Dewitte JD, Bassanets A, Boutoux M, Daniel C, Clavier J. Occupational asthma due to chromium. *Respiration*. 1998; 65:403–405.
- Levina A, Lay PA. Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium. *Coord Chem Rev*. 2005; 249:281–298
- Lieberman H. Chrome ulcerations of the nose and throat. *New Engl J Med*. 1941; 225:132–133.
- Lindberg E, Hedenstierna G. Chrome plating: Symptoms, findings in the upper airways, and effects on lung function. *Arch Environ Health*. 1983; 38:367–374.
- Littorin M, Welinder H, Hultberg B. Kidney function in stainless steel welders. *Int Arch Occup Environ Health*. 1984; 53:279–282.
- Liu Z, Du X, Zhen S. Renal impairment caused by chronic occupational chromate exposure. *Int Arch Occup Environ Health*. 2011; 84:393–401.
- Lucas JB, Kramkowski RS. Health hazard evaluation determination report number 74-87-221. Cincinnati, OH: U.S. Department of Health, Education, and Welfare, Center for Disease Control, National Institute for Occupational Safety and Health; 1975
- Mancuso TF. Chromium as an industrial carcinogen: Part II. Chromium in human tissues. *Am J Ind Med*. 1997; 31:140-7.
- Mancuso TF. Occupational cancer and other health hazards in a chromate plant: A medical appraisal: II. Clinical and toxicologic aspects. *Ind Med Surg*. 1951; 20:393–407.
- Martin J, Wang ZQ, Zhang XH, Wachtel D, Volaufova J, Matthews DE, Cefalu WT. Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 2006; 29:1826–1832.

Matey P, Allison KP, Sheehan TM, Gowar JP. Chromic acid burns: early aggressive excision is the best method to prevent systemic toxicity. *J Burn Care Rehabil.* 2000; 21:241-5.

McNeil, L.S., McLean, J.E., Parks, J.L., Edwards, M.A. Hexavalent chromium review, part 2: Chemistry, occurrence, and treatment. *J. Am. Waterworks Assoc.* 2012; 104, E395-E405.

Medeiros MG, Rodrigues AS, Batoréu MC, Laires A, Rueff J, Zhitkovich A. Elevated levels of DNA-protein crosslinks and micronuclei in peripheral lymphocytes of tannery workers exposed to trivalent chromium. *Mutagenesis.* 2003;18:19-24.

Messer J, Reynolds M, Stoddard L, Zhitkovich A. Causes of DNA single-strand breaks during reduction of chromate by glutathione *in vitro* and in cells. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40:1981–1992.

Meyers JB. Acute pulmonary complications following inhalation of chromic acid mist. *Ann Ind Hyg Occup Med.* 1950; 2:742–747.

Minoia C, Cavalleri A. Chromium in urine, serum and red blood cells in the biological monitoring of workers exposed to different chromium valency states. *Sci Total Environ.* 1988; 71:323–327.

Moulin JJ, Wild P, Mantout B, Fournier-Betz M, Mur JM, Smagghe G. Mortality from lung cancer and cardiovascular diseases among stainless-steel producing workers. *Cancer Causes Control.* 1993; 4:75-81.

Mutti A, Lucertini S, Valcavi P, Neri TM, Fornari M, Alinovi R, Franchini I. Urinary excretion of brush-border antigen revealed by monoclonal antibody: early indicator of toxic nephropathy. *Lancet.* 1985; 2:914-917.

National Research Council, Food and Nutrition Board. Recommended Dietary Allowances, 10th Edition. National Academy Press, Washington, DC, 1989.

Nettesheim P, Hanna MG Jr, Doherty DG, Newell RF, Hellman A. Effect of calcium chromate dust, influenza virus, and 100 R whole-body x radiation on lung tumor incidence in mice. *J Natl Cancer Inst.* 1971; 47:1129-44.

Norseth T. The carcinogenicity of chromium and its salts. *Br J Ind Med.* 1986; 43:649-51.



NTP. Washington, DC: National Toxicology Program; 2008a. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of sodium dichromate dihydrate (CAS No. 7789-12-0) in F344/N rats and B6C3F1 mice (drinking water studies) NTP TR 546. [http://ntp.niehs.nih.gov/files/546\\_web\\_FINAL.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/files/546_web_FINAL.pdf). August 13, 2008.

NTP. Washington, DC: National Toxicology Program; 2008b. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of chromium picolinate monohydrate (CAS No. 27882-76-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (feed studies) Scheduled peer review date: 2008; 27-28,.

NTP TR 556. [http://ntp.niehs.nih.gov/files/TR556board\\_webRev.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/files/TR556board_webRev.pdf). May 21, 2008.

NTP. Toxicity Report Series Number 72. Washington, DC: National Toxicology Program; 2007.

NTP technical report on the toxicity studies of sodium dichromate dihydrate (CAS No. 7789-12-0) administered in drinking water to male and female F344/N rats and B6C3F1 mice and male BALB/c and *am3*-C57BL/6 mice. [http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/ST\\_rpts/TOX72.pdf](http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/ST_rpts/TOX72.pdf). October 7, 2008.

O'Brien TJ, Brooks BR, Patierno SR. Nucleotide excision repair functions in the removal of chromium-induced DNA damage in mammalian cells. *Mol Cell Biochem.* 2005; 279:85–95.

Offenbacher EG, Rinko CJ, Pi-Sunyer FX. The effects of inorganic chromium and brewer's yeast on glucose tolerance, plasma lipids, and plasma chromium in elderly subjects. *Am J Clin Nutr.* 1985; 42:454-61.

Olvera O, Zimmering S, Arceo C, Cruces M. The protective effects of chlorophyllin in treatment with chromium(VI) oxide in somatic cells of *Drosophila*. *Mutat Res.* 1993; 301:201-4.

Partington CN. Acute poisoning with potassium bichromate. *Br Med J.* 1950; 2:1097–1098.

Pascale LR, Waldstein SS, Engbring G, Dubin A, Szanto PB. Chromium Intoxication, With Special Reference To Hepatic Injury. *J Am Med Assoc.* 1952; 149:1385-9

Patal PC, Cardino MT, Jimeno CA. A meta-analysis on the effect of chromium picolinate on glucose and lipid profiles among patients with type 2 diabetes mellitus. *Philipp J Intern Med,* 2010; 48:32–37.

Pei D, Hsieh CH, Hung YJ, Li JC, Lee CH, Kuo SW. The influence of chromium chloride-containing milk to glycemic control of patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Metabolism*, 2006; 55:923–927.

Petrilli, F.L., De Flora, S.,. Metabolic deactivation of hexavalent chromium mutagenicity. *Mutat. Res.* 1978; 54, 139-147.

Petrilli, F.L., De Flora, S. Interpretations on chromium mutagenicity and carcinogenicity. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1982; 109, 453-464.

Petrilli FL, Rossi GA, Camoirano A, Romano M, Serra D, Bennicelli C, De Flora A, De Flora S. Metabolic reduction of chromium by alveolar macrophages and its relationships to cigarette smoke. *J Clin Invest.* 1986; 77:1917-24.

Polak, L. Immunology of chromium. In: Chromium: metabolism and toxicity. Burrows, D, ed. Boca Raton, FL: CRC Press. 1983. 51-135.

Porte Jr. D, Sherwin RS, Baron A (editors). Ellengerg & Rifkin's Diabetes Mellitus, 6th Edition. McGraw-Hill, New York, 2003.

Potter JF, Levin P, Anderson RA, Freiberg JM, Andres R, Elahi D. Glucose metabolism in glucose-intolerant older people during chromium supplementation. *Metabolism.* 1985; 34:199-204.

Pourahmad J, O'Brien PJ. Biological reactive intermediates that mediate chromium (VI) toxicity. *Adv Exp Med Biol.* 2001; 500:203-7.

Proctor, D.M., Suh, M., Aylward, L.L., Kirman, C.R., Harris, M.A., Thompson, C.M., Gürleyük, H., Gerads, R., Haws, L.C., Hays, S.M.,. Hexavalent chromium reduction kinetics in rodent stomach contents. *Chemosphere* 2012; 89, 487-493.

Qiao W, Peng Z, Wang Z, Wei J, Zhou A. Chromium improves glucose uptake and metabolism through upregulating the mRNA levels of IR, GLUT4, GS, and UCP3 in skeletal muscle cells. *Biol Trace Elem Res.* 2009; 131:133-42.

Quievryn G, Goulart M, Messer J, Zhitkovich A. Reduction of Cr (VI) by cysteine: significance in Lincociti umani and formation of DNA damage in reactions with variable reduction rates. *Mol Cell Biochem.* 2001; 222:107-18

Rabinovitz H, Friedensohn A, Leibovitz A, Gabay G, Rocas C, Habet B. Effect of chromium supplementation on blood glucose and lipid levels in type 2 diabetes mellitus elderly patients. *Int J Vitam Nutr Res*,2004; 74:178–182.

Rabinowitz MB, Gonick HC, Levin SR, Davidson MB. Effects of chromium and yeast supplements on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic men. *Diabetes Care*, 1983; 6:319–327.

Racek J, Trefil L, Rajdl D, Mudrová V, Hunter D, Senft V. Influence of chromium-enriched yeast on blood glucose and insulin variables, blood lipids, and markers of oxidative stress in subjects with type 2 diabetes mellitus. *Biol Trace Elem Res*, 2006; 109:215–230.

Roeback JR Jr, Hla KM, Chambless LE, Fletcher RH. Effects of chromium supplementation on serum high-density lipoprotein cholesterol levels in men taking beta-blockers. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med*. 1991; 15;115:917-24.

Rosenman KD, Stanbury M. Risk of lung cancer among former chromium smelter workers. *Am J Ind Med*. 1996; 29:491–500.

Saryan LA, Reedy M. Chromium determinations in a case of chromic acid ingestion. *J Anal Toxicol*. 1988; 12:162–164

Sassi C. Occupational pathology in a chromate plant. *Med Lav*. 1956; 47:314–327.

Sharma S, Agrawal RP, Choudhary M, Jain S, Goyal S, Agarwal V. Beneficial effect of chromium supplementation on glucose, HbA1C and lipid variables in individuals with newly onset type-2 diabetes. *J Trace Elem Med Biol*, 2011; 25:149–153.

Sherman L, Glennon JA, Brech WJ, Klomberg GH, Gordon ES. Failure of trivalent chromium to improve hyperglycemia in diabetes mellitus. *Metabolism*, 1968; 17:439–442.

Singer GM, Geohas J. The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: a placebo-controlled, double-blinded, randomized trial. *Diabetes Technol Ther*, 2006; 8:636–643.

Sorahan T, Burges DCL, Waterhouse JAH. A mortality study of nickel/chromium platers. *Br J Ind Med*. 1987; 44:250–258.

Spruit, D, van Neer, FCJ. Penetration rate of Cr(III) and Cr(VI). *Dermatological*. 1966; 132:179-182

Sterekhova NP, Zeleneva NI, Solomina SN, et al. [Gastric pathology in the workers of chromium salts industries.] *Gig Trud Prof Zabol*. 1978; 3:19–23

Stout, M.D., Herbert, R.A., Kissling, G.E., Collins, B.J., Travlos, G.S., Witt, K.L., Melnick, R.L., Abdo, K.M., Malarkey, D.E., Hooth, M.J. Hexavalent chromium is carcinogenic to F344/N rats and B6C3F1 mice after chronic oral exposure. *Environ. Health Perspect.* 2009; 117, 716-722.

Suzuki Y, Fukuda K. Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid and glutathione with special reference to the rat lung. *Arch Toxicol.* 1990; 64:169-76.

Taylor FH. The relationship of mortality and duration of employment as reflected by a cohort of chromate workers. *Am J Public Health.* 1966; 56:218–229.

Thomas VL, Gropper SS. Effect of chromium nicotinic acid supplementation on selected cardiovascular disease risk factors. *Biol Trace Elem Res*, 1996; 55:297–305.

U.S. EPA (Environmental Protection Agency). National Primary Drinking Water Regulations: Final Rule. *Federal Register*, 1991; 3536-3537.

USEPA.. Liquid Assets: A Summertime Perspective on the Importance of Clean Water to the Nation's Economy. U.S. Environmental Protection Agency. 1996; 800-R-96-002. Washington, DC.

Uusitupa MI, Kumpulainen JT, Voutilainen E, Hersio K, Sarlund H, Pyörälä KP, Koivistoinen PE, Lehto JT. Effect of inorganic chromium supplementation on glucose tolerance, insulin response, and serum lipids in noninsulin-dependent diabetics. *Am J Clin Nutr*, 1983; 38:404–410.

Uusitupa MI, Kumpulainen JT, Voutilainen E, Hersio K, Sarlund H, Pyörälä KP, Koivistoinen PE, Lehto JT. Chromium treatment has no effect in patients with type 2 diabetes in a Western population: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Care*, 2007; 30:1092–1096.

Uusitupa MI, Mykkänen L, Siitonen O, Laakso M, Sarlund H, Kolehmainen P, Räsänen T, Kumpulainen J, Pyörälä K. Chromium supplementation in impaired glucose tolerance of elderly: effects on blood glucose, plasma insulin, C-peptide and lipid levels. *Br J Nutr.* 1992; 68:209-16.

Verschoor MA, Bragt PC, Herber RF, Zielhuis RL, Zwennis WC. Renal function of Vincent JB. Chromium: celebrating 50 years as an essential element? *Dalton Trans.* 2010; 28;39:3787-94.

Vrtovec M, Vrtovec B, Briski A, Kocijancic A, Anderson RA, Radovancevic B. Chromium supplementation shortens QTc interval duration in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am Heart J*. 2005; 149:632–636.

Wang T, Jia G, Zhang J, Ma Y, Feng W, Liu L, Zhang N, Yan L, Wang X, Zhang X, Wang ZQ, Cefalu WT. Current concepts about chromium supplementation in type 2 diabetes and insulin resistance. *Curr Diab Rep*. 2010; 10:145-51.

Wang ZQ, Zhang XH, Russell JC, Hulver M, Cefalu WT. Chromium picolinate enhances skeletal muscle cellular insulin signaling in vivo in obese, insulin-resistant JCR:LA-cp rats. *J Nutr*. 2006;136:415-20.

Welling R., Beaumont, J.J., Petersen, S.J., Alexeeff G.V., Steinmaus, C., Chromium VI and stomach cancer: a meta-analysis of the current epidemiological evidence. *Occup. Environ. Med*. 2015; 72, 151-159.

Wilbur S, Abadin H, Fay M, Yu D, Tencza B, Ingerman L, Klotzbach J, James S. Toxicological Profile for Chromium. Atlanta (GA): Agency for Toxic Substances and Disease Registry (US); 2012 Sep.

Wise JP, Orenstein JM, Patierno SR. Inhibition of lead chromate clastogenesis by ascorbate: Relationship to particle dissolution and uptake. *Carcinogenesis*. 1993; 14:429–434.

Wu FY, Wu WY, Kuo HW, Liu CS, Wang RY, Lai JS. Effect of genotoxic exposure to chromium among electroplating workers in Taiwan. *Sci Total Environ*. 2001; 279:21-8.

Xu J, Bublely GJ, Detrick B, Blankenship LJ, Patierno SR. Chromium(VI) treatment of normal human lung cells results in guanine-specific DNA polymerase arrest, DNA-DNA cross-links and S-phase blockade of cell cycle. *Carcinogenesis*. 1996; 17:1511-1517

Zhang JD, Li XL. [Chromium pollution of soil and water in Jinzhou]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 1987; 21:262-4.

Zhang XH, Zhang X, Wang XC, Jin LF, Yang ZP, Jiang CX, Chen Q, Ren XB, Cao JZ, Wang Q, Zhu YM. Chronic occupational exposure to hexavalent chromium causes DNA damage in electroplating workers. *BMC Public Health*. 2011; 11:224.

Zhitkovich A. Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium(VI) *Chem Res Toxicol*. 2005; 18:3–11.