



Gruppo Interregionale Fibre

*Coordinamento Tecnico Interregionale
della Prevenzione nei Luoghi di Lavoro
C.T.I.P.L.L.*

3

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI CITOTOSSICI E TRASFORMANTI INDOTTI DA FIBRE CERAMICHE REFRATTARIE E FIBRE POLICRISTALLINE NEL MODELLO IN VITRO BALB/c 3T3

Autori :

Monica Vaccari, Wolfgang Horn, Paola Silingardi, Annamaria Colacci
*Eccellenza Cancerogenesi Ambientale, Laboratorio Meccanismi di
Cancerogenesi e Anticancerogenesi, ARPA-Emilia Romagna, Sezione
Provinciale di Bologna*

Tiziana Bacci, Orietta Sala, Giovanni Pecchini
*Eccellenza Amianto Polveri e Fibre, ARPA-Emilia Romagna, Sezione
Provinciale di Reggio Emilia*

Stefania Perdichizzi, Maria Grazia Mascolo, Sandro Grilli
*Dipartimento di Patologia Sperimentale, Sezione Cancerologia, Università di
Bologna*

RAZIONALE DELLO STUDIO

I modelli in vitro nella valutazione degli effetti biologici delle fibre naturali e man-made: potenzialità e limiti

I dati di letteratura che contribuiscono alla valutazione delle possibili conseguenze sulla salute umana dell'esposizione professionale a fibre, sia naturali che MMVFs (Man Made Vitreous Fibers), derivano da varie fonti, quali gli studi sperimentali *in vivo* e *in vitro*, gli studi epidemiologici su gruppi di popolazione con esposizione occupazionale a fibre e gli studi di valutazione dei livelli di esposizione, che forniscono misure quali-quantitative e caratteristiche fisiche e chimiche delle fibre sospese.

Uno studio completo volto a definire gli effetti di tossicità acuta, subcronica e cronica (cancerogenicità) ha una durata di 3 anni e un costo molto consistente, richiede strutture appropriate e personale altamente qualificato. I test a lungo termine su animali, tradizionalmente punto di sicuro riferimento per la categorizzazione dei cancerogeni, in assenza di dati epidemiologici o a rafforzamento di questi, hanno tuttavia dimostrato limiti tali da indurre più di una incertezza.

I dati disponibili derivanti da test di inalazione cronica sono stati ottenuti in ratti o hamster, che presentano suscettibilità molto diversa all'induzione del tumore da parte di materiali fibrosi. In particolare, i mesoteliomi polmonari sono molto rari nei ratti e la loro comparsa è un dato sempre biologicamente significativo (Analytical Sciences Incorporated, 1999 in NIOSH, 2006).

Le vie di somministrazione del cancerogeno spesso non riflettono le reali vie di esposizione umana: la somministrazione forzata per instillazione tracheale o l'impianto nella cavità pleurica o nella cavità addominale non avranno mai un riscontro nell'esposizione umana e portano a superare alcuni dei meccanismi di difesa e di clearance che agiscono sulle fibre inalate.

I roditori sono obbligati alla respirazione nasale, motivo per cui la probabilità che fibre con diametro maggiore 1 μm si depositino negli alveoli è bassa (Jones, 1993 in NIOSH, 2006). L'uomo può invece inalare fibre fino a 3,5 μm che si depositano nella regione toracica e degli scambi gassosi del polmone. Queste differenze fisiologiche impediscono nel modello animale la valutazione di fibre con diametro compreso tra 1 e 3,5 μm , che avrebbero rilevanza per l'uomo e, infatti, negli studi di inalazione nell'animale condotti con asbesto la sensibilità del ratto all'induzione di tumori polmonari è chiaramente inferiore a quella umana (NIOSH, 2006)

Nelle linee guida proposte dall'EPA (2005) si dà importanza a una valutazione del rischio cancerogeno basata su una serie di dati, non necessariamente ottenuti in modelli animali, che possano concorrere all'ottenimento di una informazione univoca sul tipo ed estensione del danno indotto dalla sostanza in esame. Condizione necessaria per ricavare uno slope factor di riferimento è l'utilizzo di test che siano in grado di mettere in luce relazioni dose-risposta e i possibili meccanismi d'azione del composto o miscela oggetto dello studio.

Lo studio *in vitro* degli effetti indotti dall'esposizione a materiali fibrosi risponde sia alla necessità di mettere a punto test veloci, economici e più controllati, alternativi ai test sugli animali, sia allo scopo di chiarire la patogenesi e i meccanismi di azione delle fibre a livello cellulare e molecolare. Gli studi di genotossicità e di citotossicità *in vitro* possono essere utilizzati come test di screening preliminare di nuovi materiali e possono contribuire a delucidare i meccanismi molecolari alla base degli effetti biologici delle fibre, costituendo quindi un importante complemento agli studi sugli animali. Inoltre offrono la possibilità di valutare le relazioni dose-risposta e le correlazioni tra la dimensione delle fibre e la loro tossicità con metodi più rapidi ed efficienti rispetto agli studi *in vivo*.

E' ormai assodato che la tossicità delle fibre respirabili dipende da alcuni parametri critici per gli effetti avversi sulla salute, identificati nei test in vivo sui roditori, come la dose, le dimensioni, la durabilità e, in alcuni casi, la reattività di superficie. Per vari tipi di fibre, tra cui le fibre ceramiche refrattarie (FCR), è stata riportata una associazione diretta tra la lunghezza della fibre e la citotossicità in test in vitro (Hesterberg e Barrett, 1984; Hart et al, 1994; Yegles et al, 1995; dati riassunti e citati in NIOSH, 2006). Ulteriori studi in vitro sono ritenuti auspicabili per consentire la definizione di un valore soglia di lunghezza, al di sopra del quale la tossicità aumenta in modo significativo (NIOSH, 2006).

Il potenziale cancerogeno di materiali fibrosi è stato valutato in vitro mediante saggi di mutagenesi e di trasformazione sia in modelli di mammifero che batterici. Asbesti e fibre di vetro hanno dato risultati negativi nel test di Ames in Salmonella come in linee cellulari di mammifero (Jaurand, 1996; Chamberlain e Tarmy, 1997); sembrano invece in grado di indurre trasformazione morfologica in cellule SHE, associata ad alterazioni cromosomiche (Hesterberg e Barrett, 1984). In tale modello sperimentale l'attività trasformante di vari tipi di fibre naturali e sintetiche è stata correlata con la potenza citotossica in vitro e con l'induzione di mesotelioma in vivo (Hesterberg e Barrett, 1984). Test di mutagenicità capaci di evidenziare vaste delezioni o ricombinazioni omologhe hanno dato risultati positivi per asbesto (Both et al, 1994; Lezon-Geyda, 1996). Recentemente l'uso di test che rivelano mutazioni puntiformi in vivo ma non effetti clastogeni ha dimostrato la mutagenicità di crocidolite, amosite e lana di roccia e l'effetto sinergico della co-esposizione al cancerogeno chimico B(a)P (Topinka, 2004; Loli, 2004; Topinka, 2005). In questo modello la lana di vetro MMVF10 non induce mutagenicità (Topinka, 2005). Anche la capacità delle RCF di indurre genotossicità in sistemi in vitro è stata estesamente esaminata. Le FCR, come l'asbesto, inducono la comparsa di radicali liberi, micronuclei, polinuclei, rotture cromosomiche e iperplodia. A differenza delle fibre naturali, le FCR non sono in grado di indurre aberrazioni anafasiche, mentre inducono l'espressione dei proto-oncogeni c-fos e c-jun solo a concentrazioni citotossiche. Nel complesso i dati riportati in letteratura indicano l'esistenza di aspetti comuni nei meccanismi di azione che soggiacciono all'attività citotossica di asbesto e fibre artificiali vetrose, tra cui gli effetti sulla produzione di TNF e ROS e sulla proliferazione e la vitalità cellulare (Ishihara et al, 2001). Gli effetti delle RCF sono di solito meno evidenti di quelli dell'asbesto, anche se sono sempre presenti difficoltà nella comparazione dei dati, dovuti a differenze nelle concentrazioni e nelle caratteristiche delle fibre e negli endpoint valutati.

Le fibre esercitano sia effetti diretti sulla proliferazione e sulla vitalità cellulari, che coinvolgono danni al DNA e al fuso mitotico, che effetti indiretti. Questi ultimi comportano l'interazione delle fibre con cellule, come i macrofagi, che possono essere attivate a produrre mediatori dell'infiammazione (citochine, ROS, prostaglandine e leucotrieni), i quali, una volta rilasciati, possono influenzare direttamente le cellule target o attrarre localmente altre cellule che a loro volta agiscono sulle cellule target. Sia gli effetti diretti che indiretti delle fibre possono avere come conseguenza effetti genotossici sulle cellule bersaglio. Anche se in linea di principio le fibre potrebbero agire in tutte le tappe della cancerogenesi multifasica, i test di genotossicità in vitro riescono a evidenziare soltanto gli effetti genotossici implicati nelle prime fasi della iniziazione tumorale. Effetti legati alla biopersistenza (fagocitosi frustrata) e attività genotossiche secondarie prodotte da ROS e RNS e citochine non sono rilevati dai saggi comunemente impiegati. Quindi risultati negativi indicano assenza di effetti genotossici iniziatori, ma non escludono effetti sulle fasi più tardive della cancerogenesi (WHO, 2006).

In ultima analisi, i dati derivanti dagli studi in vitro hanno fornito utili indicazioni per comparare la tossicità e la genotossicità relative di fibre artificiali e asbesto e evidenziare meccanismi comuni alla base degli effetti riportati. La comparazione risulta spesso difficile, a causa di differenze di dose, dimensione, preparazione e composizione del materiale, o della mancanza di informazioni fondamentali, come la lunghezza delle fibre esaminate. La maggior parte delle ricerche sui meccanismi alla base della patogenesi delle fibre artificiali vetrose è stata svolta in linee di roditore o in cellule umane non direttamente correlate all'organo target e risulta quindi di limitato rilievo per la valutazione del rischio per la salute umana. E' da sottolineare, inoltre, che nell'esposizione in vivo le fibre vengono modificate sia fisicamente che chimicamente dal microambiente polmonare, le cui condizioni sono difficili da mimare negli short term test. I test in vitro, quindi, non valutano l'influenza della dissoluzione delle fibre e della loro variazione di composizione nel tempo e, a causa della loro rapidità di svolgimento, non prendono in considerazione nemmeno la durabilità della fibra, ossia il tempo necessario a frammentarla meccanicamente o a dissolverla nei fluidi biologici.

I modelli in vitro per lo studio della trasformazione cellulare

I modelli in vitro di tossicologia possono essere di valido aiuto per una stima più puntuale del rischio cancerogeno correlato all'esposizione ad un agente.

Circa quaranta anni fa fu dimostrata per la prima volta la possibilità di indurre trasformazione neoplastica in cellule in coltura mediante trattamento con composti chimici. Il primo modello utilizzato a questo scopo prevedeva l'impiego di fibroblasti embrionali di hamster (SHE), cellule normali, diploidi, in cui l'esposizione al cancerogeno determina la formazione di colonie morfologicamente trasformate composte da cellule che mostrano crescita disordinata, incremento nella basofilia, aumento del rapporto nucleo/citoplasma. Altri modelli cellulari possono essere utilizzati per studiare la cancerogenesi multifasica in vitro. Negli ultimi anni un notevole impegno è stato profuso nello sviluppare modelli di trasformazione cellulare in colture epiteliali (cute, fegato, trachea e mammella) che meglio rappresentano le caratteristiche della maggior parte dei tumori. In tutti questi modelli il trattamento con il cancerogeno induce immortalizzazione e altri tipi di danni che però possono essere visibili solo se vengono forzate le condizioni di crescita cellulare.

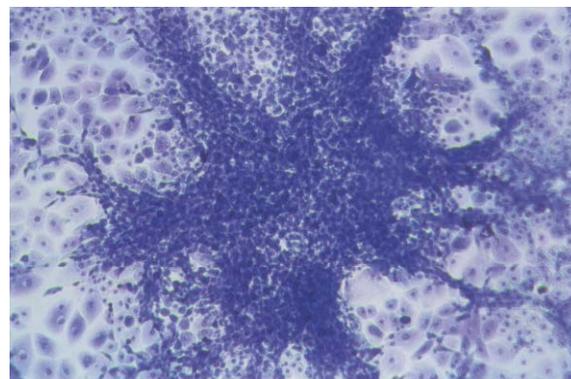
Molto più utili appaiono, dunque, i modelli in cui la trasformazione si rende visibile mediante una manifestazione fenotipica facilmente identificabile. Questa prerogativa è appannaggio dei modelli che impiegano fibroblasti di prostata di topo (cellule C3H10T1/2) o fibroblasti embrionali di topo (cellule BALB/c 3T3). In entrambi i casi la trasformazione cellulare si manifesta con la comparsa di tipici foci formati da cellule con una morfologia alterata (forma allungata e fusiforme, intensa basofilia, crescita disordinata) che si infiltrano nel monostrato di cellule non trasformate. Entrambi i modelli sono stati impiegati per studiare l'attività cancerogena di un elevato numero di composti chimici e i risultati ottenuti mostrano una buona sensibilità e specificità e una concordanza con i dati dei test a lungo termine nell'animale superiore all'85%. Le cellule C3H10T1/2 e le cellule BALB/c 3T3 sono, però, cellule già immortalizzate e aneuploidi. Esse, dunque, hanno già compiuto alcune tappe del processo di trasformazione.

Tutti i modelli, comunque, confermano che anche il processo di trasformazione cellulare in vitro è un processo multifasico comparabile con il processo tumorale in vivo, che la proliferazione dopo l'esposizione al cancerogeno è determinante per ottenere una manifestazione fenotipica dell'avvenuta trasformazione, che una esposizione efficace dipende dal ciclo cellulare e che gli effetti genotossici, inclusa la mutagenesi, possono essere misurati direttamente sulle cellule trattate e correlati alla trasformazione (Kakunaga, 1985; Combes, 1996). La possibilità di ottenere curve dose-risposta, a concentrazioni anche molto basse, crea i presupposti per una integrazione dell'informazione mediante modelli matematici e di simulazione per l'estrapolazione dei dati ottenuti per la determinazione del rischio per l'uomo.

Il modello BALB/c 3T3 per lo studio dell'attività citotossica e trasformante

Il test di trasformazione cellulare BALB/c 3T3 rappresenta un duttile strumento per studiare la potenzialità cancerogena di composti chimici, singoli o in miscele complesse, e per definire il ruolo che essi svolgono nel processo multifasico della cancerogenesi (Colacci et al, 1990, 1995 e 1996). Le cellule BALB/c 3T3 sono fibroblasti embrionali di topo adattati alla crescita in vitro (immortalizzati). L'immortalizzazione costituisce un evento precoce nel processo di trasformazione cellulare. Le cellule BALB/c 3T3, tuttavia, conservano alcune proprietà delle cellule normali, crescono adese al substrato, formando un monostrato continuo e regolare, e non mostrano le caratteristiche proprie delle cellule trasformate, quali la tumorigenicità o la capacità di formare colonie in agar soffice. Il trattamento con un agente cancerogeno determina l'insorgenza di cloni di cellule trasformate (foci), il cui fenotipo è francamente maligno (Figura 1). La frequenza di trasformazione è, in genere, una funzione della dose di trattamento e segue un andamento tipico di un evento raro (distribuzione di Poisson), in linea con la possibilità di insorgenza di un tumore in vivo.

Figura 1 – Immagine al microscopio ottico di un focus trasformato con evidente carattere infiltrante nei confronti del monostrato di cellule BALB/c 3T3. Ingrandimento - 40x



Prerequisito fondamentale a qualsiasi tipo di approccio di tipo funzionale o molecolare è rappresentato dalla valutazione del profilo tossicologico sia per la predizione dell'attività tossica dell'agente, sia per la selezione dell'intervallo di dosi da utilizzare nell'ambito degli studi successivi. Il test di trasformazione cellulare è perciò preceduto da un test di citotossicità che consente di individuare le dosi che consentono la sopravvivenza almeno del 20% delle cellule trattate. Al test standard di trasformazione è possibile poi affiancare test aggiuntivi (iniziazione/promozione; test di apoptosi; comunicazioni intercellulari mediate da gap-junctions) che sono in grado di definire i meccanismi d'azione del composto o miscela analizzati.

Il potenziale cancerogeno delle diverse forme dell'asbesto e delle fibre artificiali sostitutive può essere saggiato mediante test di trasformazione cellulare in vitro condotto sulla linea BALB/c 3T3. Esistono dati di letteratura che dimostrano l'induzione di trasformazione in questa linea cellulare da parte di fibre naturali. Crisotilo sembra comportarsi sia come un iniziante che come un cancerogeno completo nel modello di trasformazione in BALB/c 3T3 (Lu et al, 1988), mentre crocidolite induce trasformazione nel range 0.1-10 µg/cmq (Lin et al, 2000). Non sono noti lavori che abbiano valutato nel modello BALB/c 3T3 gli effetti citotossici e trasformanti di FCR, che sono in grado però di indurre trasformazione morfologica in cellule SHE (Elias et al, 2002).

Le fibre policristalline (FPC), di recente introduzione, si differenziano dalle fibre artificiali vetrose per la microstruttura. Si dividono in due categorie principali, le FPC oxide, costituite principalmente da ossido di alluminio (Al_2O_3), mullite ($3Al_2O_3 \cdot 2SiO_2$) e ZrO_2 , e le FPC non-oxide. L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) le ha classificate insieme alle FCR nella categoria 2B "Possibili cancerogeni per l'uomo" (IARC, 2002), mentre non sono incluse nella Direttiva UE 97/69/EC. A differenza dell'asbesto e delle MMVFs, questa categoria di fibre non è stata sottoposta a valutazione sistematica per la cancerogenicità, usando test di inalazione a lungo termine nei roditori, lasciando un vuoto legislativo concernente ai dati di esposizione umana. Nonostante l'utilizzo sempre più diffuso delle FPC, spesso proposte come alternativa alle FCR, non sono stati finora pubblicati dati in vitro relativi a effetti citotossici e trasformanti indotti da questa tipologia di fibre.

Materiali e metodi

Campioni esaminati

E' stato eseguito uno studio comparativo che mette a confronto gli effetti citotossici e trasformanti di una fibra policristallina (PC) e di una fibra ceramica refrattaria (FCR), caratterizzate in base ai dati forniti dalle relative Schede di Sicurezza (SdS). Come controllo positivo è stata utilizzata una fibra naturale (crocidolite standard NIESH; caratterizzata dal punto di vista dimensionale nel Report of Investigation 8452 del Bureau of Mines).

Preparazione e caratterizzazione dimensionale dei campioni

E' stato utilizzato il metodo di comminuzione per compressione relativo alla determinazione del diametro ponderato sulla lunghezza, $D_{LG} - 2 ES$, previsto dal Draft 4, rev. 2 del metodo ECB, 2004. Una piccola quantità di fibre (50 - 100 mg), dopo rimozione del materiale organico in stufa a 450°C, è stata sottoposta ad una pressione di 2 tonnellate/cm² (pari a 10MPa) per un minuto.

Il materiale ottenuto è stato mescolato con una spatola e compresso di nuovo a 10 MPa sempre per un minuto. Dal materiale pressato è stata preparata una sospensione acquosa con concentrazione pari a circa 0.5mg/cc, sonicata per 5 minuti e, successivamente, filtrata in tre aliquote (da 3, 6, 10 ml come previsto dal Draft 4, rev. 2 del metodo ECB) per mezzo di una pipetta (2-5 ml di capacità), sciacquando più volte il sistema filtrante fino ad ottenere una distribuzione ottimale delle fibre sul filtro di lettura (numero sufficiente di fibre e non sovrapposte).

La filtrazione è stata effettuata con sistema da vuoto su filtro di policarbonato con porosità 0,8 µm supportato da un filtro di esteri misti di cellulosa (EMC) avente porosità di 5/8 µm. Dopo asciugatura, è stata ritagliata una sezione del filtro (quarta) con un bisturi a lama n. 22 usando un'azione oscillante. La sezione ritagliata è stata quindi deposta su uno specifico portacampioni di alluminio (stub), per procedere alla grafitazione. Si è proceduto con l'osservazione al SEM (Microscopio Elettronico a Scansione Leica 430i: WD 20 mm, EHT 25 KV, I probe 300 pA) a 5000x effettuando la misura del diametro e della lunghezza di 100 fibre (sistema "point to point"). Sullo stesso materiale in analisi è stato effettuato il conteggio del numero di fibre, espresso in ff/mg. In questo caso l'osservazione al SEM è stata a 2000x, considerando tutte le fibre presenti nell'intero campo visivo.

Colture cellulari e trattamenti

Sono state impiegate cellule BALB/c 3T3 clone A 31 (American Type Culture Collection, USA). Le colture di lavoro sono state espanse a partire dallo stock originario crioconservato e mantenute a 37°C in atmosfera al 5% di CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM, GIBCO BRL, USA) addizionato con 10% Newborn Calf Serum (NCS, GIBCO BRL, USA). Per gli esperimenti sono state usate cellule in coltura da non più di 2-3 passaggi e mantenute in stato di subconfluenza (70%).

Dopo riduzione delle lunghezze, le fibre sono state diluite (75 mg/100 ml soluzione tamponata Dulbecco's Phosphate Buffer Saline, PBS) e sottoposte a sonicazione (30 minuti) ed agitazione prima della diluizione finale in D-MEM 10% NCS, che è stata fatta al momento dell'uso. Le concentrazioni di trattamento sono state espresse come µg di campione o come numero di fibre/cm² della piastra di coltura.

Test di citotossicità in vitro

Cellule BALB/c 3T3, in crescita esponenziale, sono state seminate ad una densità di 250 cellule/piastra, in piastre da 60 mm di diametro (5 repliche per trattamento) ed incubate in condizioni di coltura standard (37°C, atmosfera al 5% di CO₂). Dopo 48 ore dalla semina le cellule sono state esposte alla sospensione contenente le fibre in esame per una durata di 48 ore; come controlli negativi sono state usate cellule non trattate. Al termine del periodo di esposizione, le cellule sono state lavate con PBS e mantenute in coltura in presenza di terreno completo (DMEM+10% NCS), che è stato sostituito 2 volte a settimana per tutta la durata del test. Dopo 10-12 giorni le piastre sono state lavate con PBS, fissate con metanolo e colorate con Giemsa al 10%. Successivamente, dopo lavaggio con acqua distillata, le piastre sono state esaminate al microscopio ottico (40x). Sono state considerate solo le colonie con più di 50 cellule; i dati sono stati espressi come efficienza clonale relativa al controllo solvente (ECR) espressa in percentuale ed ottenuta dal rapporto tra la media delle colonie nel gruppo di trattamento e quella nel gruppo di controllo. La concentrazione di trattamento che riduce del 50% l'efficienza clonale (inhibitory concentration 50%, IC₅₀) è stata ricavata mediante analisi di regressione lineare dalla equazione della retta di interpolazione dei dati.

Test di trasformazione cellulare in vitro

Il test di trasformazione è stato condotto secondo le linee guida pubblicate (IARC/NCI Working Group, 1985) e successive modifiche (Matthews et al, 1993). Cellule BALB/c 3T3 in fase esponenziale di crescita sono state seminate alla densità di 3×10^4 cellule per piastra, in piastre da 60 mm di diametro (10 repliche per trattamento), che vengono incubate in condizioni di coltura standard (37°C e atmosfera al 5% di CO₂). Dopo 48 ore dalla semina, le cellule sono state esposte a diverse concentrazioni della sostanza da saggiare, ricavate da precedenti test di citotossicità. Sono stati allestiti anche controlli negativi, costituiti da cellule non trattate. Come controllo positivo è stata impiegata crocidolite NIESH (range di concentrazioni 0.05-5µg/cm²). Dopo 48 ore di incubazione, le piastre sono state lavate con PBS e è stato somministrato terreno di coltura fresco; da questo momento il terreno è stato rinnovato 2-3 volte la settimana per l'intera durata del test (5-6 settimane). Al termine del test le cellule sono state fissate e colorate. Le piastre sono state poi esaminate al fine di valutare la formazione di foci di trasformazione.

Sono stati contati soltanto i foci inequivocabilmente positivi, di diametro superiore a 1 mm, intensamente basofili, costituiti da cellule a disposizione casuale e pluristratificate, con fenotipo infiltrante nei confronti del monostrato circostante che presenta inibizione da contatto.

L'attività trasformante della molecola è stata espressa come:

- frazione di piastre con foci per trattamento;
- numero medio di foci per piastra \pm E.S.;
- frequenza di trasformazione (TF), data dal rapporto tra il numero di foci per gruppo sperimentale ed il numero delle cellule a rischio, sopravvissute dopo il trattamento con le fibre in esame, calcolato sulla base della efficienza clonale osservata nel test di citotossicità condotto in parallelo.

La valutazione statistica della distribuzione media dei foci è stata eseguita utilizzando il test t per campioni non appaiati di Mann-Whitney. La significatività delle piastre con foci rispetto alle piastre esaminate è stata verificata ricorrendo al test esatto di Fisher-Yates mediante le tavole di contingenza 2x2. Le frequenze di trasformazione sono state comparate mediante test di Poisson.

Risultati e discussione

Caratterizzazione chimica e dimensionale di fibre ceramiche refrattarie e di fibre policristalline

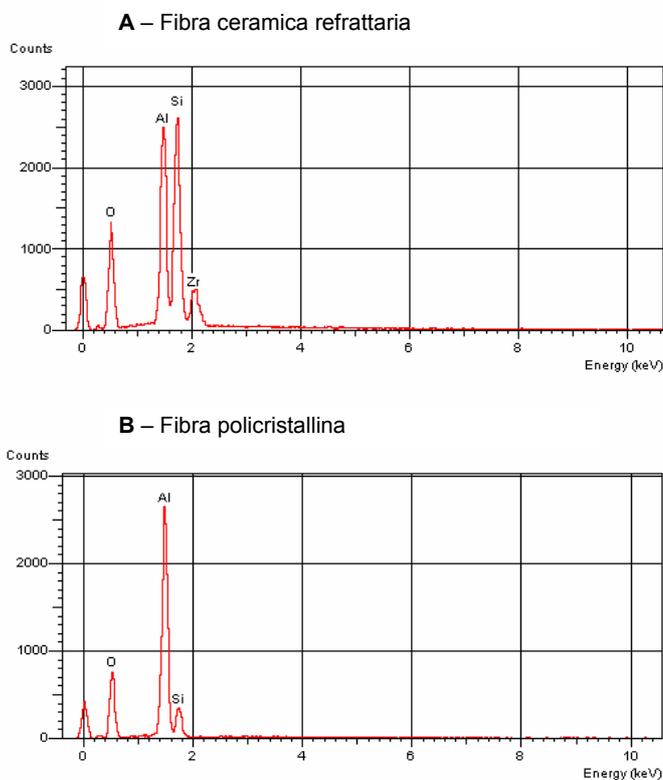
La composizione chimica delle fibre artificiali esaminate riportata nella scheda di sicurezza viene presentata nella Tabella 1.

Tabella 1 - Composizione chimica delle fibre esaminate: percentuale in peso di alcuni ossidi (come dichiarato nella scheda di sicurezza del produttore)

	SiO ₂ %	Al ₂ O ₃ %	ZrO ₂ %	Cr ₂ O ₃ %
Fibra ceramica refrattaria	48-60	25-55	< 16	>3
Fibra policristallina	~ 20	~ 80	-	-

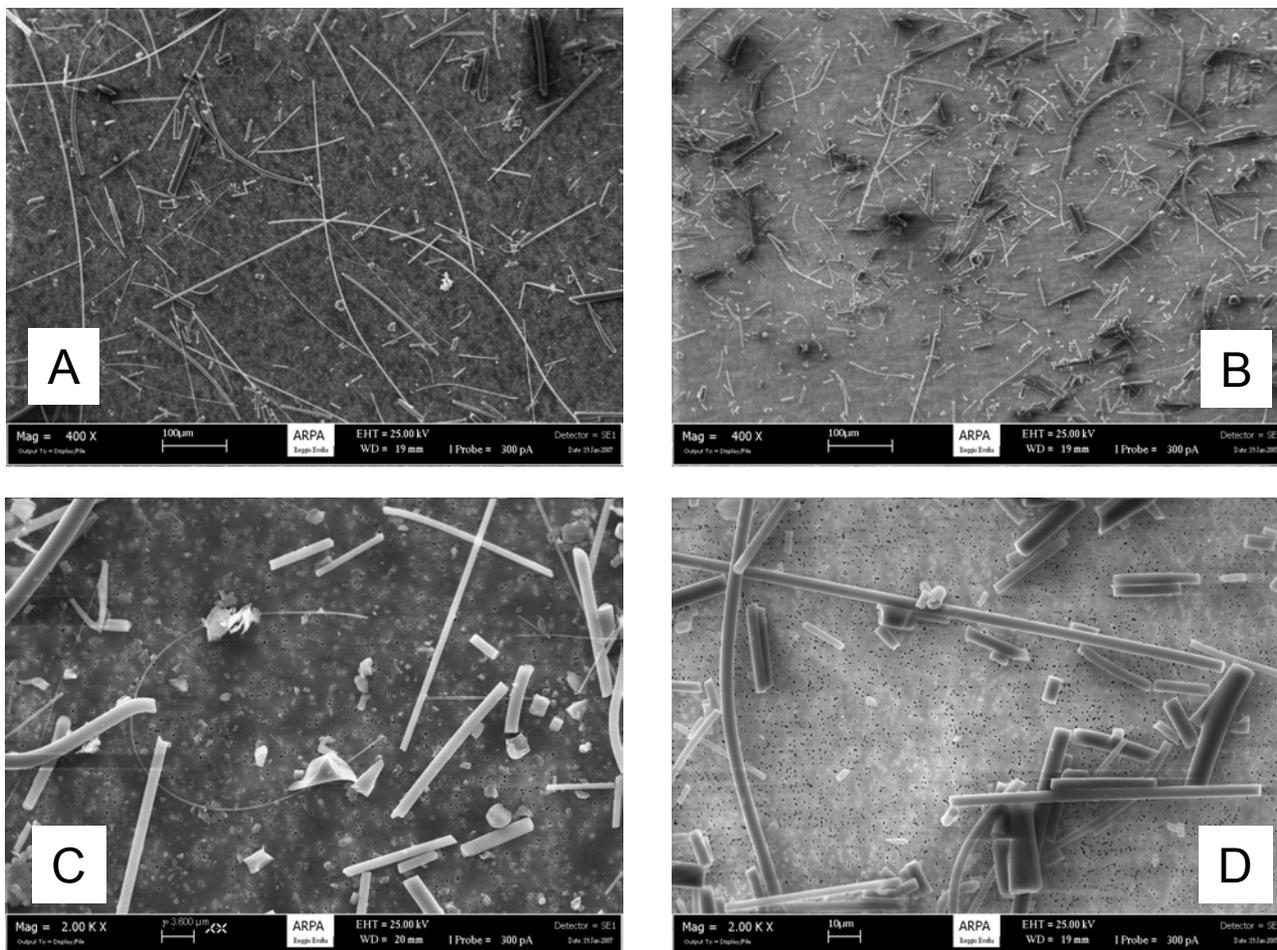
Gli spettri EDX confermano il contenuto percentuale di Al e Si dichiarato dai produttori (Figura 2).

Figura 2 – Microanalisi chimica elementare SEM - spettri EDX



L'aspetto della fibra Policristallina, come appare al microscopio elettronico a scansione (SEM), è più tozzo rispetto a quello della FCR, che presenta fibre più sottili e allungate (Figura 3).

Figura 3- Morfologia delle fibre ceramiche refrattarie (A e C) e delle fibre policristalline (B e D) esaminate al SEM.



L'osservazione morfologica trova conferma nella caratterizzazione dimensionale (Tabella 2). La fibra policristallina presenta in media diametro superiore e lunghezza inferiore alla fibra ceramica refrattaria, con un intervallo di variazione dimensionale più contenuto. La crocidolite NIESH, utilizzata come controllo positivo, presenta solo fibre di diametro inferiore a 1 µm, mentre le lunghezze sono estremamente variabili (Tabella 3). La media aritmetica è inferiore a quella delle altre fibre esaminate, ma sono presenti anche fibre di lunghezza pari a 1000 µm.

Il $D_{LG} - 2$ ES (Tabella 2) misurato per la fibra ceramica (1.60 µm) è circa la metà di quello ottenuto per la fibra policristallina (2.71 µm). Sulla base di questo dato, entrambi i campioni si pongono nell'ambito delle fibre respirabili per l'uomo e cancerogene secondo la Nota R (CM 4 del 15/03/00).

Nella Tabella 4 sono riportati la distribuzione percentuale dei diametri e il numero di fibre/mg. Nella fibra policristallina non sono presenti fibre con diametro < 1 µm, che nella fibra ceramica refrattaria rappresentano invece il 23% del totale. In entrambe i tipi di fibre la classe più rappresentata è quella con diametro compreso tra 1 e 3 µm. Il campione di crocidolite è invece costituito nella sua totalità da fibre con diametro < 3 µm. La preparazione mediante pressatura

secondo la metodica normalmente in uso (Draft 4, rev. 2 del metodo ECB, 2004) ha prodotto rotture irregolari delle estremità delle fibre in entrambi i campioni e formazione di particolato. Ciò ha reso difficoltosa la misura delle lunghezze in presenza di sezioni non ortogonali all'asse longitudinale e la valutazione della loro distribuzione percentuale.

Il numero delle fibre per unità di peso (mg) stimato per la fibra policristallina è doppio rispetto alla fibra ceramica e 5 volte inferiore a quello riportato in letteratura per crocidolite (Cavallo et al, 2004).

Tabella 2 - Principali parametri descrittivi delle misure dei diametri e delle lunghezze delle fibre esaminate e valore del DLG - 2SE ottenuto dell'applicazione della formula 4 del punto 2.1 della Draft 4 rev. 2

	FCR		PC	
	Diametro (μm)	Lunghezza (μm)	Diametro (μm)	Lunghezza (μm)
Media aritmetica	2.84	60.89	3.20	42.62
Deviazione standard	2.55	87.96	1.39	39.41
Media geometrica	1.93	37.49	2.95	31.30
Deviazione standard geometrica	2.60	2.49	1.50	2.16
Errore standard	0.10	0.09	0.04	0.08
Valore minimo	0.10	10.23	1.13	8.74
Valore massimo	16.5	746.15	8.44	274.72
D_{LG} - 2ES (μm)	1.60		2.71	

Tabella 3 - Principali parametri dimensionali della crocidolite NIESH

	Crocidolite ^a	
	Diametro (μm)	Lunghezza (μm)
Media aritmetica	0.27	10
Valore minimo	0.22	0.5
Valore massimo	0.64	1000

^a i dati riportati sono tratti dal Report of Investigation 8452 United States Department of the Interior – Bureau of Mines.

Tabella 4 – Caratterizzazione delle fibre utilizzate in termini di distribuzione percentuale dei diametri e delle lunghezze e numero di fibre/mg

	Diametri (μm) (%)				N° fibre (x $10^6/\text{mg}$)
	< 1	1 - 3	3 - 6	> 6	
FCR	23	38	31	8	0.399
FPC	0	50	45	5	0.786
crocidolite ^a	100	0	0	0	3.16

^a la caratterizzazione percentuale è tratta dal Report of Investigation 8452 United States Department of the Interior – Bureau of Mines; il n° fibre/mg è riportato da Cavallo et al, 2004.

Effetti citotossici indotti da fibre ceramiche refrattarie e da fibre policristalline in cellule BALB/c 3T3

Sono state effettuate prove preliminari per la valutazione della tossicità utilizzando un intervallo di concentrazioni di FCR (0-15 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) individuate dopo analisi della letteratura disponibile (Elias et al, 2002). Per effettuare un confronto su base gravimetrica sono stati determinati gli effetti delle medesime concentrazioni di fibre policristalline sull'efficienza clonale di cellule BALB/c 3T3. Le fibre sono state preparate per l'esperimento sia con il metodo della pressatura che con il metodo della comminuzione mediante taglio con bisturi, al fine di valutare quale fosse la metodica di preparazione del campione più idonea per l'esecuzione dello studio. Sulla base dei risultati di queste prove, che indicavano una assenza di tossicità per concentrazioni inferiori a 3.75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e una migliore linearità con la preparazione mediante pressatura (dati non mostrati), sono stati condotti ulteriori esperimenti in cui le fibre, sottoposte a pressatura, sono state saggiate nell'intervallo 3.75-20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 4). Gli effetti delle fibre artificiali sono stati messi a confronto con quelli indotti da crocidolite (Figura 5) in un range di concentrazioni (0.05-5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) selezionato sulla base dei dati disponibili in letteratura (Lin et al, 2000).

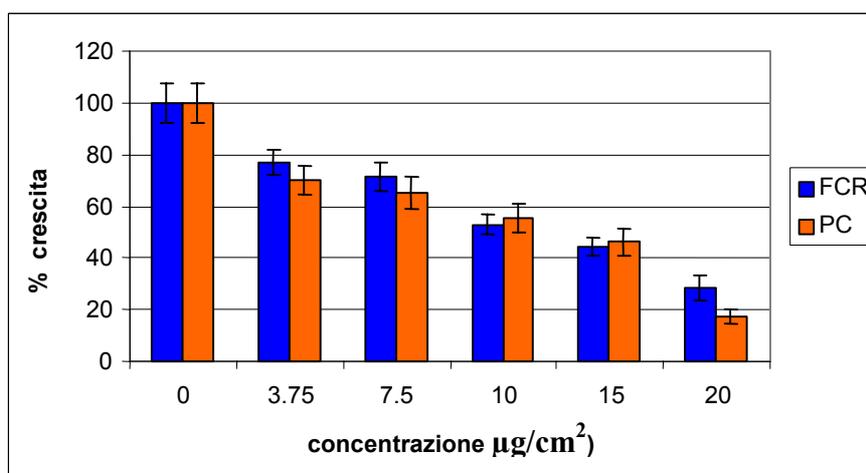


Figura 4 - Effetto di fibre ceramiche refrattarie e di fibre policristalline sull'efficienza clonale di cellule BALB/c 3T3

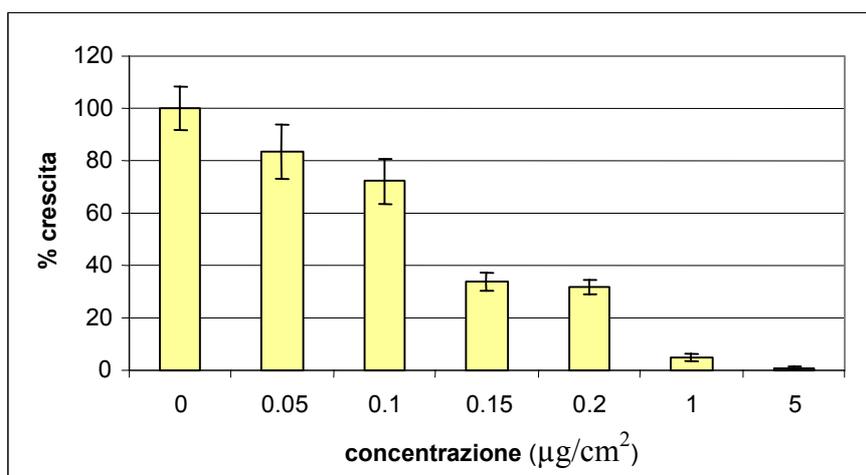


Figura 5 - Effetto di crocidolite NIESH sull'efficienza clonale di cellule BALB/c 3T3

Nel nostro studio sia le FCR che le PC hanno indotto citotossicità nel modello 3T3, con una netta relazione dose-risposta. Quando il confronto è condotto su base gravimetrica, non sembrano emergere differenze significative nella tossicità indotta dai due tipi di fibra per nessuna delle dosi esaminate. Il potenziale citotossico rispetto alla crocidolite è inferiore di 2 ordini di grandezza, come si evince dalle relative IC₅₀ (Tabella 5).

Tabella 5 - IC 50 dei campioni esaminati calcolata sulla base della retta di regressione lineare

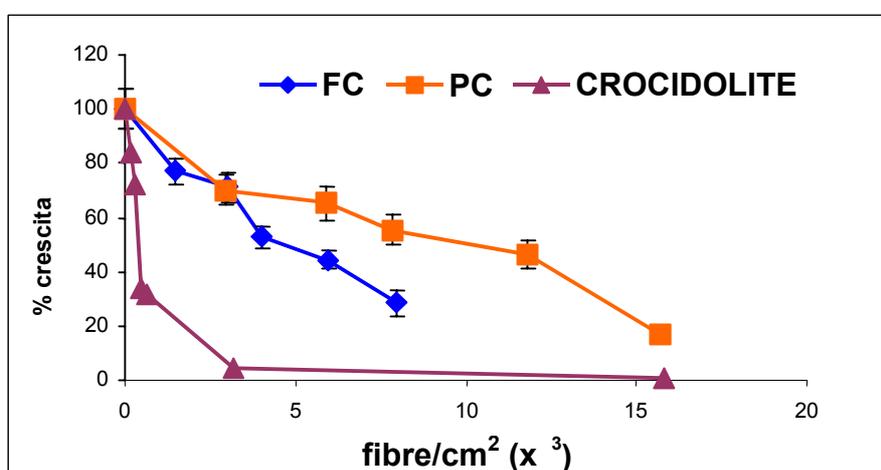
	IC 50 ± ES (µg/cm ²)
Fibra ceramica refrattaria	12.09 ± 0.56
Fibra policristallina	11.65 ± 1.58
Crocidolite	0.16 ± 0.03

Gli effetti citotossici diretti delle FCR sono stati estesamente studiati *in vitro* (vedi NIOSH, 2006), utilizzando vari endpoint quali inibizione della proliferazione, riduzione dell'efficienza clonale, il distacco cellulare, la misurazione del rilascio di enzimi (LDH o beta-glucuronidasi) o dell'assunzione di coloranti vitali (Trypan blue) da parte delle cellule, che indicano l'alterazione dell'integrità o della permeabilità della membrana. Gli studi sono stati compiuti su numerose linee cellulari, sia di ratto che umane, e hanno evidenziato come l'inibizione della proliferazione sia dose-dipendente, confermando inoltre la relazione diretta tra lunghezza della fibra e tossicità. Quando sono state utilizzate dosi equivalenti su base gravimetrica, le FCR hanno mostrato effetti citotossici significativamente inferiori a quelli della crocidolite (Hart et al, 1994; Yegles et al, 1995; Cullen et al, 1997). Questo non è sempre stato confermato effettuando il ranking di potenza citotossica in base al numero di fibre (Yegles et al, 1995; Cullen et al, 1997).

Abbiamo quindi utilizzato la stima del numero delle fibre/unità di peso per comparare la capacità delle fibre esaminate di indurre effetti citotossici in cellule BALB/c 3T3 (Figura 6). In base al numero totale di fibre, il ranking di potenza citotossica è: crocidolite >> FCR > PC. Il numero di fibre necessario per ottenere una riduzione del 50% del numero delle colonie passa da 0.44×10^3 per la crocidolite a 4.79×10^3 e 8.82×10^3 , rispettivamente per le FCR e le PC.

Il tempo di esposizione può influenzare la risposta della cellula. E' stato dimostrato che il trattamento di cellule U-937 con la dose $50 \mu\text{g/ml}$ di MMVF induce tossicità solo dopo esposizione prolungata, mentre sono sufficienti 24 ore di trattamento con la dose $200 \mu\text{g/cm}^2$ per ottenere una riduzione significativa della proliferazione (Dika Ngueta et al, 2005). Nel nostro studio l'IC₅₀ calcolata per le FCR ($12 \mu\text{g/cm}^2$) risulta più elevato del valore di IC₅₀ riportato in letteratura per le FCR (pari a $2.6 \mu\text{g/cm}^2$), nella linea SHE dopo esposizione della durata di 7 giorni (Elias et al, 2002).

Figura 6 – Effetto citotossico delle fibre esaminate in cellule BALB/c 3T3



Valutazione dell'attività di fibre policristalline nella trasformazione in vitro: confronto con FCR e con crocidolite

Sulla base dei dati di citotossicità ottenuti sono state scelte le concentrazioni di lavoro per l'esecuzione del test di trasformazione ($7.5-15 \mu\text{g/cm}^2$). L'attività trasformante delle FCR, già in precedenza dimostrata nel modello SHE (Elios et al, 2002), è stata confermata anche nel modello di trasformazione *in vitro* in cellule BALB/c 3T3. La frequenza di trasformazione aumenta in modo dose-relato ed è significativamente diversa dal controllo non trattato dopo esposizione alla concentrazione $10 \mu\text{g/cm}^2$ (Figura 7). Analogamente, anche le PC sembrano capaci di indurre la comparsa di foci di trasformazione, con un incremento significativo dopo trattamento con la dose più elevata saggiata ($15 \mu\text{g/cm}^2$).

Come controllo positivo è stata utilizzata crocidolite NIESH (range $0.05-5 \mu\text{g/cm}^2$). I dati presenti in letteratura, ottenuti in cellule BALB/c 3T3, dimostrano per la crocidolite una attività trasformante dose-dipendente a concentrazioni comprese tra 0.2 e $20 \mu\text{g/cm}^2$ (Lin et al, 2000). Nel nostro studio la crocidolite NIESH induce un aumento significativo della frequenza di trasformazione alla concentrazione $0.1 \mu\text{g/cm}^2$ (Figura 8). Concentrazioni superiori, che determinano una inibizione della crescita molto elevata, hanno impedito la formazione di un monostrato cellulare completo e uniforme.

Figura 7 - Effetto di PC e FCR sulla frequenza di trasformazione di cellule BALB/c 3T3

* differenza significativa ($p < 0.05$) rispetto al controllo non trattato

** differenza altamente significativa ($p < 0.01$) rispetto al controllo non trattato

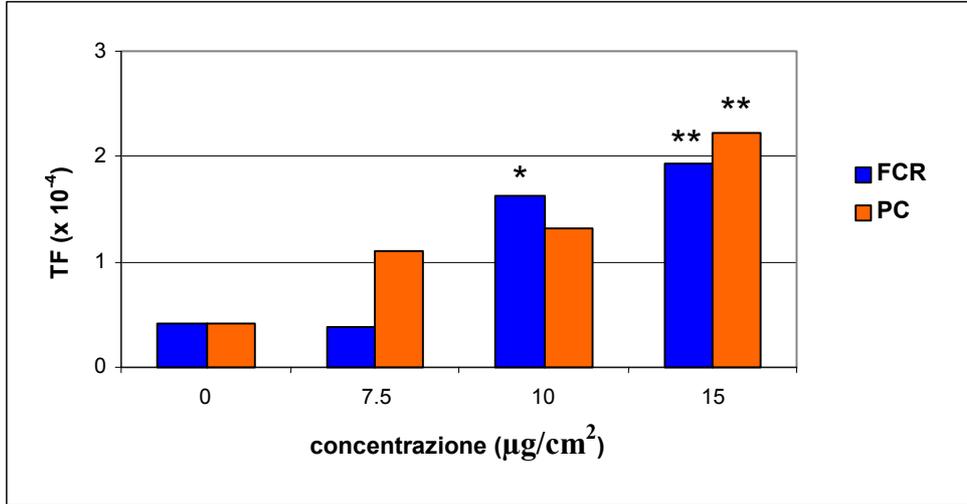


Figura 8 - Effetto di crocidolite NIESH sulla frequenza di trasformazione di cellule BALB/c 3T3

* differenza altamente significativa ($p < 0.01$) rispetto al controllo non trattato

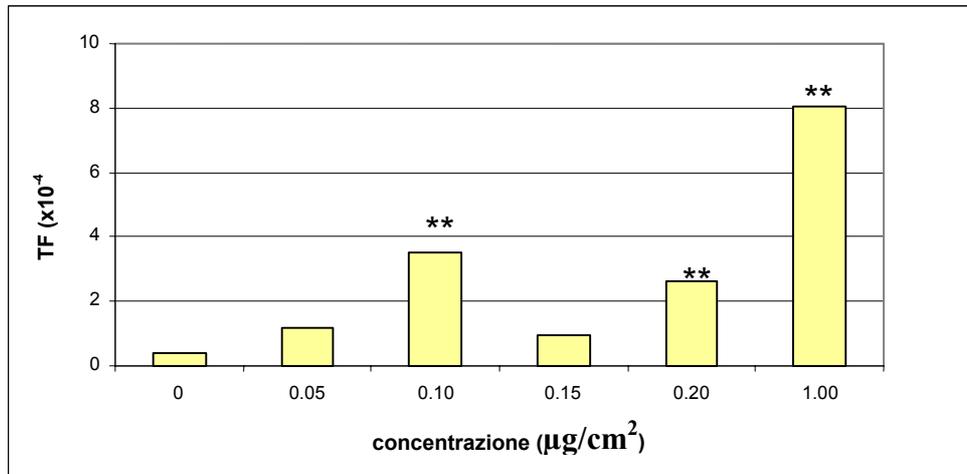
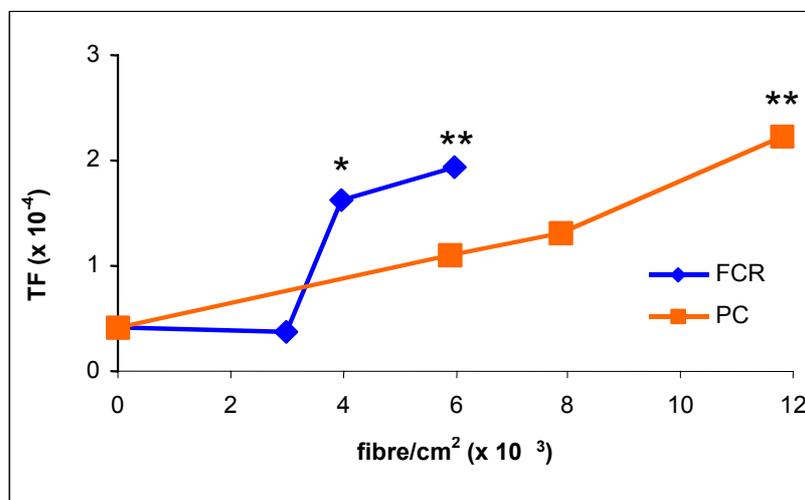


Figura 9 - Effetto di FPC e FCR sulla frequenza di trasformazione di cellule BALB/c 3T3

* differenza significativa ($p < 0.05$) rispetto al controllo non trattato

** differenza altamente significativa ($p < 0.01$) rispetto al controllo non trattato



Quando la comparazione tra fibre è condotta in base al numero di $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, la capacità delle FCR di indurre trasformazione sembra superiore rispetto a quella delle PC (Figura 9). La diversa attività potrebbe essere messa in relazione alla differenza nelle lunghezze delle due fibre artificiali. Anche la struttura cristallina, che influenza la frequenza e il tipo delle fratture che si riscontrano nelle fibre e quindi la loro reattività, potrebbe giocare un ruolo nel determinare le differenze di comportamento negli end point studiati tra FCR, che sono fibre artificiali vetrose, e le fibre Policristalline.

CONCLUSIONI

I dati presentati in questo studio hanno messo in luce la capacità delle fibre Policristalline di indurre effetti citotossici e trasformazione morfologica in vitro nel modello BALB/c 3T3. Il confronto su base gravimetrica non ha messo in evidenza differenze significative nell'attività biologica dei due tipi di fibre. Le differenze evidenziate tra fibre Policristalline e FCR nei parametri dimensionali sembrano riflettersi in differenze significative negli effetti sugli end point valutati nello studio, quando la comparazione viene effettuata sulla base del numero totale di fibre. Secondo questo parametro, l'attività citotossica e trasformante delle fibre Policristalline risulta inferiore a quella delle FCR e il ranking di potenza per entrambi gli endpoint valutati sembra essere crocidolite \gg FCR $>$ PC. Anche il nostro studio sembra confermare la dipendenza della tossicità dalla lunghezza delle fibre, almeno per quanto riguarda fibre simili per composizione chimica e diametro. Nel determinare l'elevata attività citotossica della crocidolite entrano probabilmente in gioco altri fattori capaci di influenzare l'attività biologica di una fibra, quali il diametro, le proprietà di superficie. La composizione chimica e la presenza di ferro.

In conclusione l'approccio sperimentale illustrato può essere proposto per una valutazione preliminare di materiali fibrosi di nuova introduzione e/o per cui non esistono ancora dati in vivo. La possibilità di falsi positivi costituisce un rischio concreto quando si utilizzino test in vitro a breve termine per esaminare gli effetti di fibre a bassa biopersistenza, che non si accumulerebbero nel polmone fino a dare effetti patogenici. Nel caso delle fibre Policristalline, classe di fibre molto eterogenea per composizione chimica e tenore di ossidi, la struttura policristallina potrebbe portare a ipotizzare una elevata biopersistenza (Fanizza et al, 2005). Nonostante le ovvie limitazioni, i modelli in vitro di trasformazione cellulare sembrano porsi come validi approcci alternativi ai bioassay a lungo termine nell'animale per la valutazione dell'attività cancerogena di fibre e per lo studio dei meccanismi di azione a livello cellulare e molecolare. La dimostrazione dell'attività citotossica e trasformante di fibre Policristalline nel modello 3T3 potrebbe quindi costituire un punto di partenza per studi ulteriori che possano condurre all'estrapolazione del rischio legato all'esposizione e ad una categorizzazione delle fibre Policristalline da parte degli Enti regolatori preposti.