

- Capitolo 6 -

RISULTATI

Dinamiche della cooperazione tra SV40

ed Asbesto/Fibre asbestiformi

6.1 Fluoroedenite ed Erionite.

Le fibre d' asbesto sono indubbiamente il principale fattore di rischio per l' insorgenza di MM. Accanto a queste fibre note da tempo per la loro capacità trasformante esistono fibre

asbestiformi meno note, ma indubbiamente altrettanto correlate al MM pleurico. Infatti è stata riscontrata un' alta incidenza di MM nei soggetti venuti a contatto con questi minerali, sia per esposizione professionale, sia semplicemente per esposizione ambientale, nelle zone in cui questi minerali sono geologicamente presenti.

Abbiamo voluto confrontare fibre di asbesto note e tradizionalmente utilizzate (crisotilo, crocidolite, amosite) con fibre asbestiformi (fluoroedenite, erionite-Karain e erionite-Oregon), andando ad esaminare gli effetti dell' esposizione a breve e lungo termine su cellule mesoteliali umane.

Le fibre di **Fluoroedenite** sono fibre d' asbesto appartenenti al gruppo mineralogico degli anfiboli. L' indagine è sorta sulla base di alcune evidenze epidemiologiche, rilevate dagli studi condotti dall' Istituto Superiore di Sanità, ENEA ed ISPESL, partendo da episodi di insorgenza di mesotelioma pleurico non aspettati nella zona di Biancavilla (CT) (Paoletti *et al.*, 2000).

La fonte di diffusione delle fibre minerali è stata identificata in una cava di pietrisco lavico, ubicata in località Monte Calvario, alle porte dell' abitato di Biancavilla ed attiva sin dagli anni '50 per il prelievo di materiale vulcanico da utilizzare per l' edilizia locale. Nel 1997 sia in cava che nel centro abitato si è rinvenuta la presenza di un anfibolo fibroso, simile alla tremolite, risultato poi essere una nuova specie minerale (Gianfagna e Oberti, 2001). La nuova fibra fluoroedenite non è ancora compresa nell' elenco delle fibre pericolose, nè in quello degli amianti anfibolici, pur mantenendo con alcuni di essi (tremolite ed actinolite) analoghi caratteri morfologici e chimici.

Le successive ed approfondite indagini geo-mineralogiche, ambientali e socio-sanitarie, hanno permesso di chiarire e risolvere il problema ambientale di Biancavilla, attribuendo alla presenza delle fibre di fluoroedenite nell' area in esame la causa dell' insorgenza del mesotelioma polmonare e permettendo, inoltre, la definizione di un particolare tipo di

esposizione, ambientale e non professionale, della popolazione di Biancavilla a tali fibre, per lunghi decenni.

La fluoroedenite è di colore giallo intenso, trasparente, brillante, ma a volte anche di aspetto resinoso; si presenta nelle cavità e spaccature della roccia lavica ospite con abito prismatico di tratto aciculare, con dimensioni millimetriche, ma anche fibroso ed asbestiforme, con dimensioni anche al di sotto del micrometro (**Fig. 34**).

Il caso *Biancavilla* rappresenta, quindi, un particolare caso di inquinamento ambientale da fibre anfiboliche derivante da semplice esposizione ambientale da sorgente naturale. Il fatto che la nuova fibra fluoroedenite non sia ancora contemplata nell'elenco delle fibre pericolose, ha causato non pochi problemi per il comune di Biancavilla ai fini di una eventuale, ma necessaria, opera di bonifica.

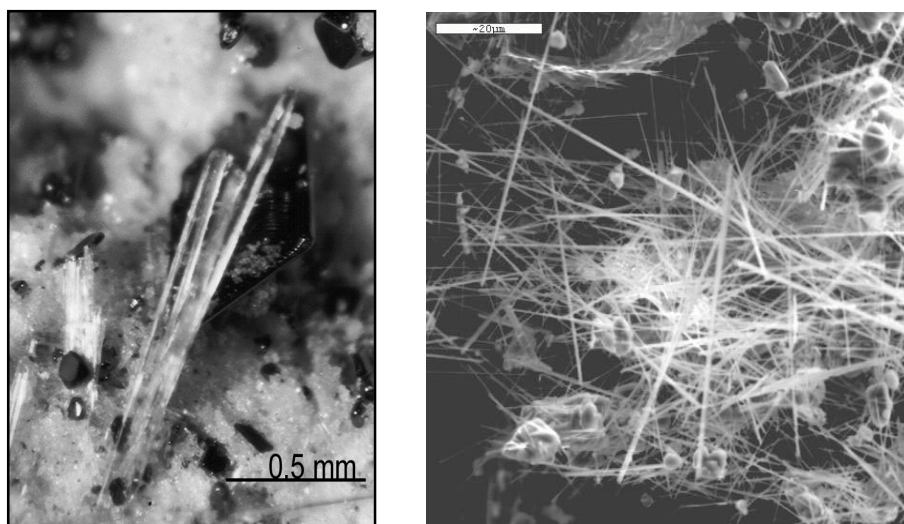


Fig. 34. Fibre di Fluoroedenite.

Sono pertanto necessari ulteriori studi epidemiologici, ambientali, sanitari, ma soprattutto studi biologici e tossicologici sulle fibre, sia *in vitro* che *in vivo*, al fine di ottenere un quadro completo sulla sua effettiva pericolosità.

Le fibre di **erionite** sono invece fibre asbestiformi appartenenti mineralogicamente al gruppo delle Zeoliti. La Zeolite è un minerale degli alluminosilicati di tipo fibroso, simile per morfologia e proprietà all' asbesto, benché il suo contenuto in ferro sia decisamente più ridotto di quest'ultimo tipo di fibre. Può essere ottenuta sinteticamente ma si trova anche in natura in forme sia altamente dannose per la salute umana (erionite) sia essenzialmente inerti (mordente) (Fach et al., 2002). Le Zeoliti sono diffuse in varie parti del mondo, ma una delle forme più pericolose, tanto da essere catalogata come cancerogeno di classe I, è l'erionite turca, usata in Cappadocia per costruire interi villaggi scavati nella roccia.

In particolare, l' alta incidenza di MM pleurico in alcuni villaggi della Cappadocia (Turchia) sembra essere strettamente correlata all' esposizione ambientale alle fibre di erionite benché la cooperazione con altri fattori di rischio sia stata ipotizzata (Dumortier *et al.*, 2001; Olut *et al.*, 2000). La capacità dell' erionite turca di indurre lesioni tumorali simili a quelle osservate nell'uomo è stata dimostrata nei ratti in seguito a inalazione (Johnson, 1992) ed iniezione intraperitoneale (Davis *et al.*, 1991) o intrapleurica (Edwards *et al.*, 1990).

In aggiunta, l' **erionite americana (Oregon)** è genotossica (Poole *et al.*, 1983) e induce alta incidenza di MM dopo inoculo intrapleurico o inalazione (Wagner *et al.*, 1985), a riprova della sua potenziale pericolosità per l' uomo, benché non esistano ancora dati epidemiologici a riguardo.

Gli effetti dannosi delle fibre di erionite sono presumibilmente dovuti al danno ossidativo esercitato sulle cellule mesoteliali, in modo del tutto analogo a quello osservato in seguito a trattamento con fibre d' asbesto (Zoller e Zeller, 2000). Tuttavia è stato dimostrato che in cellule esposte all' erionite la proliferazione e/o la riparazione di DNA mutato prevalgono, a parità di dosaggio, sul processo apoptotico, a differenza di quanto osservato dopo trattamento con asbesto, capace di indurre prevalentemente morte cellulare (Timblin *et al.*, 1998). Questo

spiegherebbe come mai la carcinogenicità dell' erionite sia di oltre 200 volte maggiore in termini di dose-risposta rispetto alle fibre di amianto blu (crocidolite) (Hill *et al.*, 1992).

Dal nostro studio, è emerso come, indipendentemente dal tipo di fibre usate, la tossicità sia dose-dipendente, benché superiore, a parità di dosaggio, con l' amosite e la fluoroedenite. Le fibre di erionite e il crisotilo sono invece risultate poco tossiche e il vetro quasi inerte (**Fig. 35A**).

Il saggio di incorporazione di BrdU ha invece mostrato come la neosintesi di DNA dopo esposizione per breve tempo alle fibre (24 h) prevalga usando fibre di amosite, fluoroedenite ed erionite-Karain (**Fig. 35B**).

L' effetto citotossico è stato confermato dalla valutazione dell' apoptosi attraverso la marcatura del DNA con l' Hoechst da cui è emersa una netta condensazione cromatinica tipica dell' apoptosi dopo esposizione alle fibre di amianto e asbestiformi, ma non a quelle di vetro (**Fig. 36**). È interessante notare come l' osservazione al contrasto di fase abbia permesso di rilevare una densità cellulare residua sensibilmente più ridotta dopo il trattamento con le fibre di amosite rispetto a quella delle cellule esposte ad erionite, a conferma della maggior tossicità dell' amianto rispetto alle zeoliti.

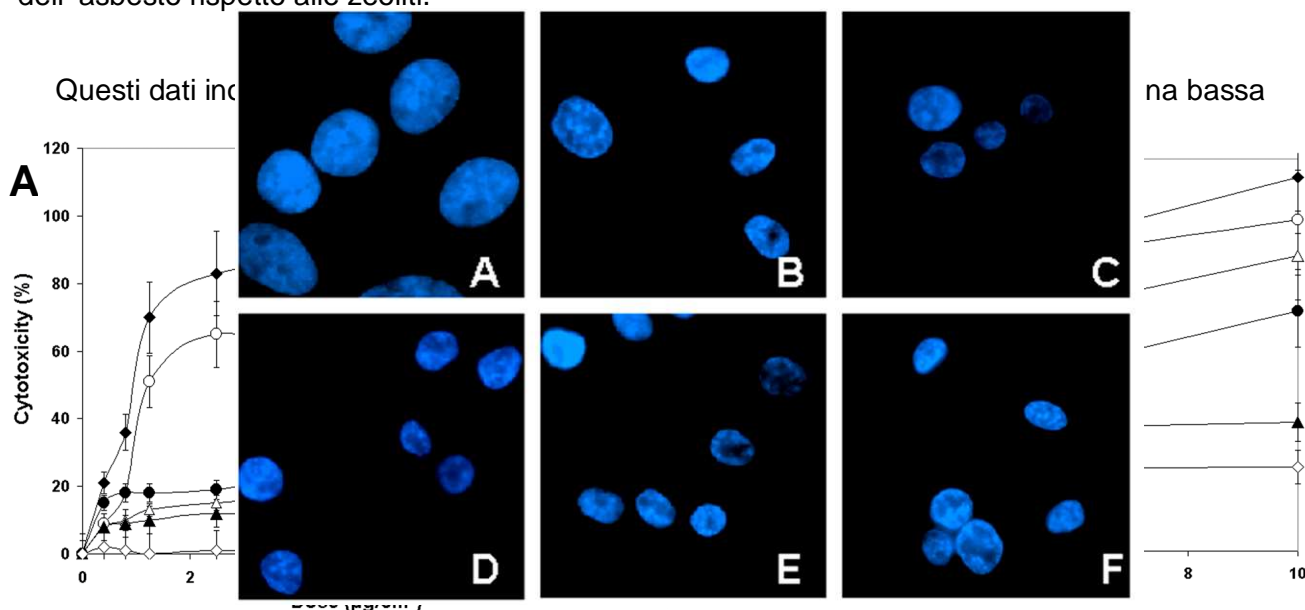


Fig. 36 –Apoptosi indotta da fibre d' amianto/asbestiformi. Sono mostrati i nuclei di HMC esposte a $5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ di fibre per 24h, osservati al microscopio a fluorescenza dopo colorazione con Hoechst. La condensazione cromatinica tipica dell' apoptosi è chiaramente visibile dopo i trattamenti con VP16 (B), amosite (C), fluoroedenite (D), erionite-Karain (E) e erionite-Oregon (F), ma non dopo quello con fibre di vetro (A). Ingrandimento originale: x100

6.2 La neosintesi di DNA indotta da erionite non è solo una compensazione del danno cromosomale ma consente proliferazione cellulare.

La proliferazione cellulare è stata monitorata dopo esposizione alle fibre per comprendere meglio il significato della neosintesi di DNA osservata.

Entrambi i tipi di fibre di erionite utilizzati hanno indotto un forte stimolo proliferativo nelle 24 h seguenti al trattamento, mentre questo non è stato osservato dopo esposizione ad amosite o fluoroedenite. Dopo 72 h, al raggiungimento della confluenza, queste differenze sono risultate ancora evidenti benché meno marcate per via del raggiungimento di un plateau di crescita (**Fig. 37A**).

Inoltre, 4 h dall'esposizione ad ogni tipo di fibre, il trasduttore JNK è andato incontro ad una fosforilazione transiente, probabilmente a causa dello stress ossidativo da fibre. Questo segnale si è ridotto a 8 h, tranne che dopo l'esposizione ad amosite, che ha indotto un'attivazione più prolungata, a conferma della maggior tossicità (**Fig. 37B**). Erk1/2 e p38 non hanno subito fosforilazione dopo esposizione al vetro. Al contrario la fosforilazione di Erk1/2 è perdurata fino a 4 h dal trattamento, mentre quella di p38 è risultata più evidente in cellule esposte ad erionite piuttosto che ad asbesto, suggerendo un ruolo chiave giocato da questo effettore nell'aumentata proliferazione erionite-dipendente (**Fig. 37B**).

In base a questi risultati possiamo concludere che la neosintesi di DNA osservata dopo trattamento breve non è solo compensatoria del danno cromosomale indotto da erionite. Inoltre la breve esposizione pare essere comunque sufficiente per trasdurre i primi segnali proliferativi a conferma del fatto che l'erionite, in particolare quella turca, possieda un elevato potenziale trasformante sul mesotelio umano.

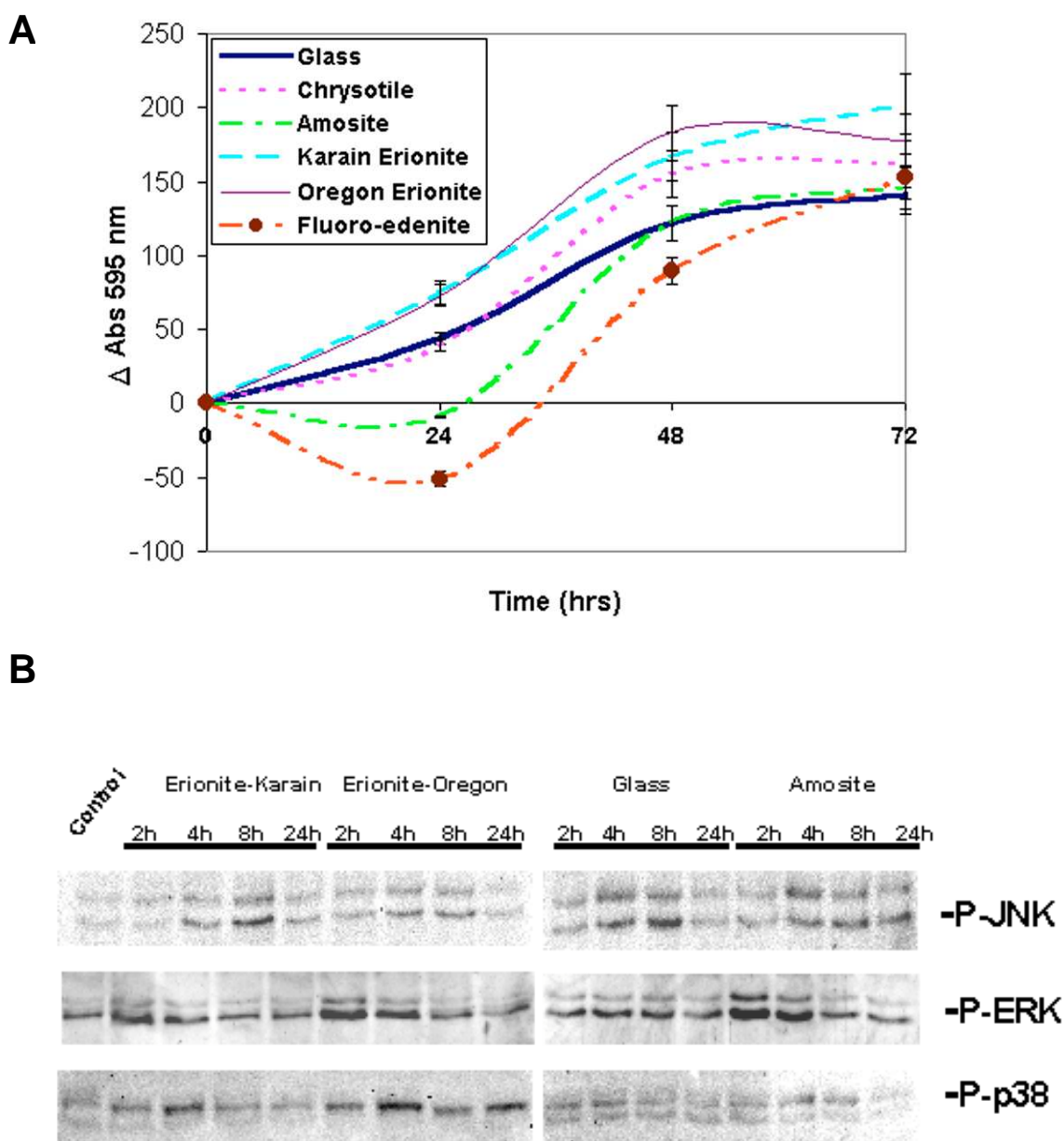


Fig. 37 – L' erionite induce neosintesi di DNA non solo a scopo compensatorio. (A) Curva di crescita di cellule HMC esposte alle fibre per 24 h. Il numero di cellule monitorato nelle 72 h successive alla stimolazione è stato stimato sulla base dei valori di Abs_{595nm} del cristal violetto assorbito. (B) Immunoblotting su lisati totali di cellule HMC esposte alle fibre per 2h-4h-8h-24 h. Gli anticorpi usati sono indicati alla destra dei blots.

6.3 L' esposizione cronica a fibre di erionite promuove di per sé trasformazione del mesotelio umano.

Analogamente a quanto fatto precedentemente con le fibre di amosite, abbiamo voluto verificare se l' esposizione a basse dosi di erionite potesse indurre trasformazione di cellule mesoteliali e se questo effetto fosse Tag dipendente.

Abbiamo esposto le HMC alle fibre, secondo il protocollo di esposizione prolungata illustrato nel capitolo *Materiali e Metodi*. Dopo 60 gg, solo le cellule esposte ad erionite hanno acquisito un netto cambiamento morfologico, divenendo più allungate (**Fig. 38B**) delle cellule di origine (**Fig. 38A**). Inoltre alcune di queste cellule fibroblastoidi hanno perso l' inibizione da contatto e hanno prodotto foci di trasformazione (**Fig. 38C**). L' erionite-Karain, sulla base del conteggio dei foci per numero di cellule piastrate, è risultata più trasformante di quella dell' Oregon, mentre nessun focus si è ottenuto dalle fibre di vetro e di crisotilo, mentre l' amosite e la fluoroedenite sono risultate troppo tossiche per poter completare l' esperimento (**Fig. 38D**).

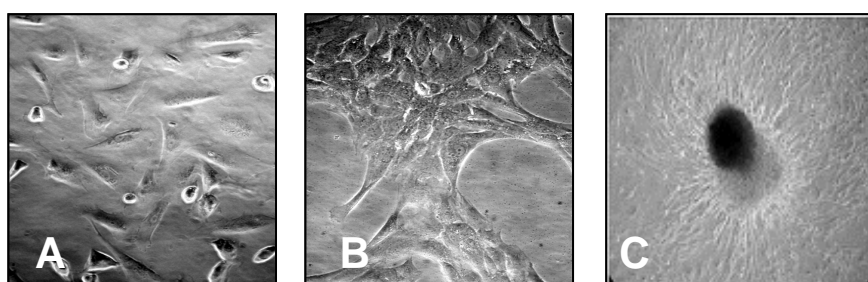


Fig. 38 – L' esposizione prolungata all' erionite produce trasformazione di per sé. Morfologia di cellule HMC prima dell' esposizione alle fibre (A;x320), 2 mesi dopo quando sono divenute fibroblastoidi (B;x320) e sono apparsi i primi foci (C;x32). (D) Nà medio di foci generati dall'esposizione ai vari tipi di fibre a distanza di due mesi dal trattamento prolungato.

D	Treatment	foci number
	Untreated	0
	Glass	0
	Chrysotile	0
	Fluoroedenite	0
	Amosite	0
	Karain Erionite	$1,0 * 10^{-4}$ cells
	Oregon Erionite	$1,0 * 10^{-5}$ cells

L'analisi del ciclo cellulare dopo sincronizzazione in colchicina ha messo in evidenza che le cellule derivate dai *foci*, che hanno perso la dipendenza da siero per la propria crescita, si sono concentrate per lo più in fase S (**Fig. 39A**) mentre l'ipopiccino subG₁-S, tipico delle quiescenti HMC, non è stato più rilevabile. Questa osservazione è stata confermata anche da curve di crescita realizzate colorando le cellule a vari tempi con cristal violetto (**Fig. 39B**).

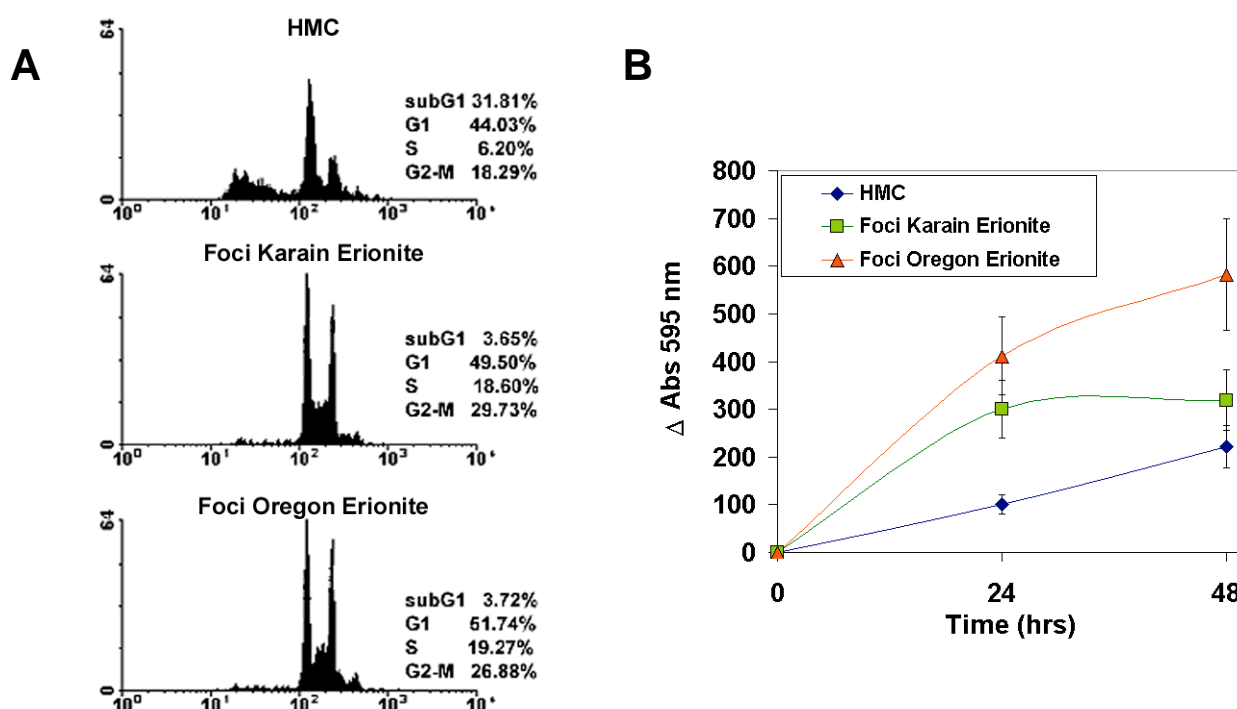


Fig. 39. La trasformazione indotta dalle fibre di erionite induce proliferazione. (A) Cicli cellulari di cellule HMC e di cellule derivate dai *foci* prodotti dalle fibre di erionite a due mesi dal *trattamento prolungato*. Le cellule sono state sincronizzate in colchicina (Colcemyd) e poi rimesse in coltura per 4 gg prima di eseguire l'analisi. Sulla destra di ogni istogramma è riportata la percentuale delle cellule nelle varie fasi del ciclo. (B) Curve di crescita delle stesse cellule monitorate per 48 h. La conta è stata stimata attraverso l'Abs_{595nm} del cristal violetto assorbito.

Inoltre, è stata osservata in queste cellule sincronizzate con Colcemid iperespressione delle cicline D₁ ed E, coinvolte nella transizione G₁/S del ciclo cellulare (**Fig. 40**).

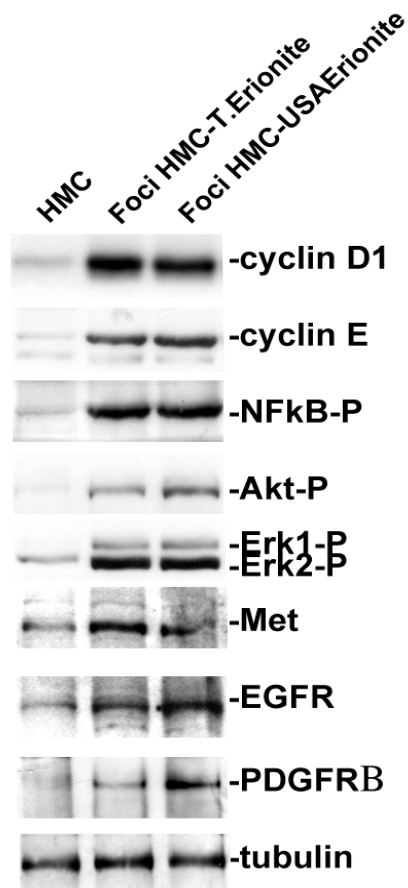


Fig. 40. Caratterizzazione delle cellule derivate dai foci indotti dall' erionite. Immunoblotting su lisati totali di cellule HMC e di cellule derivate dai *foci* eseguiti con gli anticorpi indicati sulla destra. L' analisi è stata eseguita su un *pool di foci* rappresentativo dei cloni ottenuti.

L' analisi della trasduzione del segnale in Immunoblotting ha mostrato che queste cellule mostrano attivazione dei trasduttori Akt, Erk1/2 e NF-κB. Met, EGFR e PDGFRβ sono invece risultati più espressi ma non fosforilati (**Fig. 40**).

Inoltre, le cellule derivate dai *foci* sono risultate più resistenti al VP16 (Etoposide) in saggi MTT (**Fig. 41A**).

Infine, l'analisi al citofluorimetro non ha mostrato incremento significativo di attività caspatica dopo trattamento con VP16, osservato invece nelle HMC di controllo (**Fig. 41B**), segno di aumentato *survival*, conseguente alla *selezione* operata dalle fibre.

Possiamo concludere che l'erionite è a tutti gli effetti un agente trasformante del mesotelio e che risulta ancora più potente dell'asbesto, in quanto la trasformazione da esso innescata è risultata SV40 indipendente, benché non si possa escludere che l'efficienza della trasformazione possa ulteriormente crescere in presenza del virus SV40.

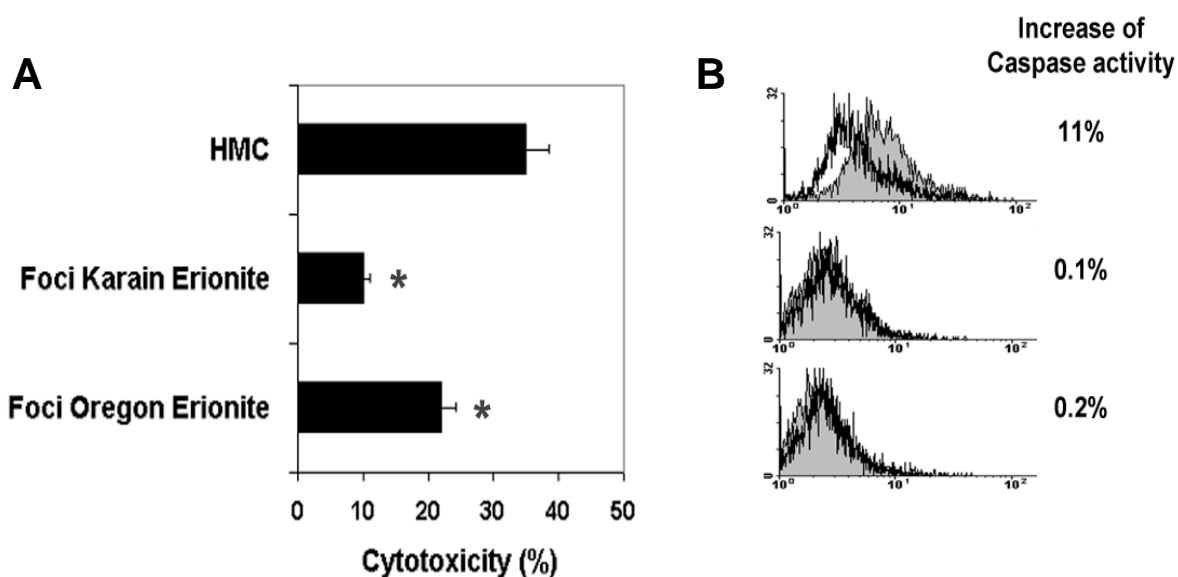


Fig. 41 – Aumentato survival delle cellule derivate dai foci indotti dall'erionite.

Citotossicità valutata con saggio MTT ripetuto in triplicato (A) e aumento di attività caspatica misurato al citofluorimetro su 5000 eventi (B) dopo trattamento con 100 μ M VP16 per 24 h. *= diverso significativamente dal risultato ottenuto in cellule HMC.