



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI GENOVA**

Università degli studi di Genova

Scuola di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali

Corso di Laurea Magistrale in

Biologia Applicata e Sperimentale

Valutazione in vitro degli effetti biologici di fibre minerali di asbesto su un modello di epitelio respiratorio umano ricostituito.

Relatori:

Prof. Anna Maria Bassi

Dott.ssa Vanessa Almonti

Candidata: Silvia Ottonello

Correlatore:

Prof. MariaPaola Nitti

Indice

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Asbesto - caratteristiche principali e impiego

1.2 Caratteristiche chimiche e biologiche di due amianti: Crocidolite e Crisotilo

1.3 Patologie correlate all'esposizione alle fibre di amianto

1.3.1 Patologie infiammatorie e fibrotiche causate dall'amianto

1.3.2 Neoplasie correlate all'esposizione ad asbesto

Capitolo 2: Modelli in vitro per lo studio delle patologie polmonari

2.1

Overview dell'apparato respiratorio

2.2 Modelli di barriera epiteliale polmonare

2.3 Il Modello EpiAirway

Scopo della ricerca

Sezione Sperimentale

Capitolo 1 : Materiali e metodi

1.1 Preparazione delle fibre

1.2 Test di vitalità (MTT)

1.3 Analisi delle citochine pro-infiammatorie

1.4 Analisi della proteina istonica H2AX

Capitolo 2: Risultati

2.1 Test di vitalità (MTT)

2.2 Analisi dei livelli genici e proteici delle citochine pro-infiammatorie

2.3 Valutazione del danno genotossico tramite analisi della proteina H2AX

Capitolo 3: Discussione

Capitolo 4: Conclusioni

Bibliografia

Ringraziamenti

Alla mia famiglia, anche se un semplice “grazie” non sarà mai sufficiente per aver reso possibile tutto questo.

A Pamela, il fuoco interiore che mi ha spronato a credere sempre nella parte migliore di me stessa anche quando nemmeno io sapevo riconoscerla.

Alle persone rimaste al mio fianco durante questo percorso doloroso ma incredibile, nonostante le mie continue lamentele, ce l'abbiamo fatta; non posso che ringraziare le guide del mio percorso universitario, tra cui la mia relatrice, prof.ssa Anna Maria Bassi per avermi fatto capire l'importanza di coltivare una passione con impegno e dedizione.

A me stessa, per essere rimasta fedele fino alla fine a quella che sono.

Capitolo 1: Introduzione

1.1 Asbesto - caratteristiche principali e il suo impiego

Con il termine asbesto si fa riferimento a un insieme di minerali del gruppo dei silicati appartenenti alle serie mineralogiche del serpentino e degli anfiboli. All'interno del gruppo degli asbesti troviamo sei differenti fibre minerali - actinolite, amosite, antofillite, crisotilo, crocidolite e tremolite - che, oltre ad avere in comune una morfologia fibrosa sono stati ampiamente utilizzati per le loro particolari proprietà fisiche e chimiche. I termini asbestiforme e fibroso sono utilizzati per composti aventi caratteristiche morfologiche simili agli asbesti.⁽¹⁾

Le caratteristiche salienti dell'asbesto possono essere così riassunte:

- resistenza ad alte temperature, ad agenti chimici e biologici, all'abrasione e all'usura;
- resistenza meccanica e alta flessibilità grazie alla struttura fibrosa;
- capacità fonoassorbente e termoisolante
- facilità di legame con materiali da costruzione quali calce, gesso e cemento (Eternit), e con alcuni polimeri (gomma, PVC).

L'asbesto, o amianto nell'uso comune, è stato usato su scala industriale solo verso la fine del XIX secolo e soprattutto nel corso della Seconda Guerra Mondiale, esponendo a rischi milioni di lavoratori in tutto il mondo.

Per le sue caratteristiche sopracitate per anni è stato considerato un materiale estremamente versatile impiegato nella costruzione di navi e treni; venne ampiamente utilizzato nel settore dell'edilizia (tegole, pavimenti, tubazioni, vernici, canne fumarie); nella realizzazione delle tute dei vigili del fuoco, nelle auto (vernici, parti meccaniche); nella fabbricazione di corde, plastica e cartoni. La polvere di asbesto è stata largamente utilizzata anche nella filtrazione dei vini.⁽²⁾

Inizialmente i rischi erano sconosciuti, ma studi epidemiologici hanno evidenziato un aumento dell'incidenza di mesotelioma tra gli operai delle miniere di asbesto, dei cantieri navali e delle fabbriche dove il minerale veniva lavorato, come anche in tutti gli addetti alla produzione di oggetti che lo contenevano. Alla luce di queste crescenti evidenze, l'agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) ha classificato le fibre di asbesto nel gruppo 1 dei "cancerogeni per gli esseri umani"; è infatti attualmente vietata la vendita e l'uso di tutte le fibre in più di 50 paesi. ⁽³⁾

Categoria 1	Categoria 2
<i>Sostanze cancerogene per l'uomo accertate o presunte</i>	<i>Sostanze da considerare con sospetto per possibili effetti cancerogeni</i>
1A : Se sono noti gli effetti cancerogeni per l'uomo sulla base di studi sull'uomo	Esistono prove ottenute da adeguati studi su animali che non bastano tuttavia per classificare la sostanza nella categoria 1B.
1B : Si presumono effetti cancerogeni per l'uomo prevalentemente sulla base di studi su animali.	

L'Italia è stata tra i primi Paesi che hanno vietato l'impiego del minerale fibroso amianto con la messa al bando delle attività ad esso correlate, operata attraverso la Legge 257 del 27 marzo 1992 "Norme relative alla cessazione dell'impiego dell'amianto" (propriamente vietandone l'estrazione, l'importazione, l'esportazione, la produzione industriale e la commercializzazione). L'utilizzo è consentito in situazioni particolari, tenendo conto degli interventi di manutenzione e conseguente bonifica. (4)

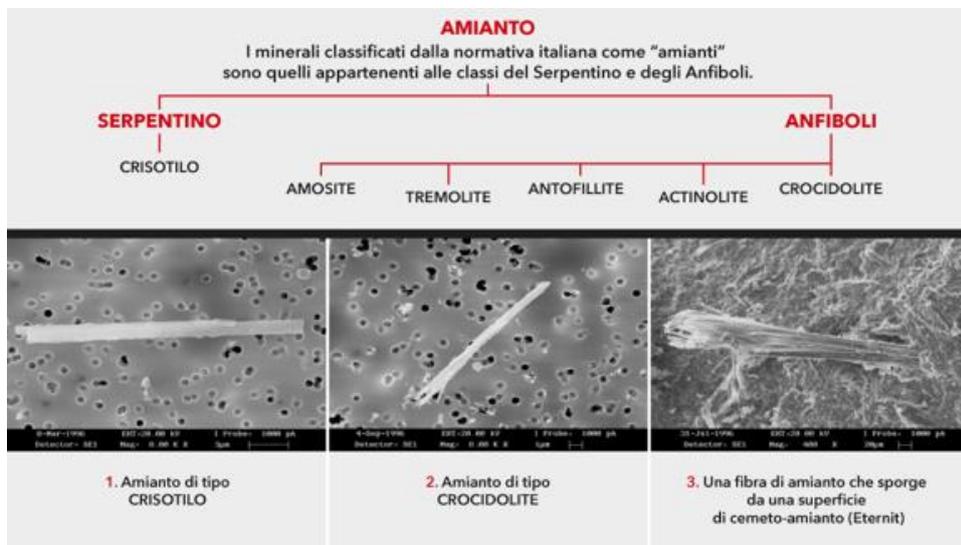


Fig. 1 Classificazione e struttura delle fibre di amianto

1.2 Caratteristiche chimiche e biologiche di due amianti: Crocidolite e Crisotilo

La **crocidolite** $[\text{Na}_2(\text{Mg,Fe})_6\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$ è una varietà di asbesto appartenente alla famiglia degli anfiboli di aspetto fibroso e colore bluastrò. Si presenta sotto forma di fibre lineari e flessibili con buone resistenza meccanica a trazione e resistenza chimica agli acidi. (5)

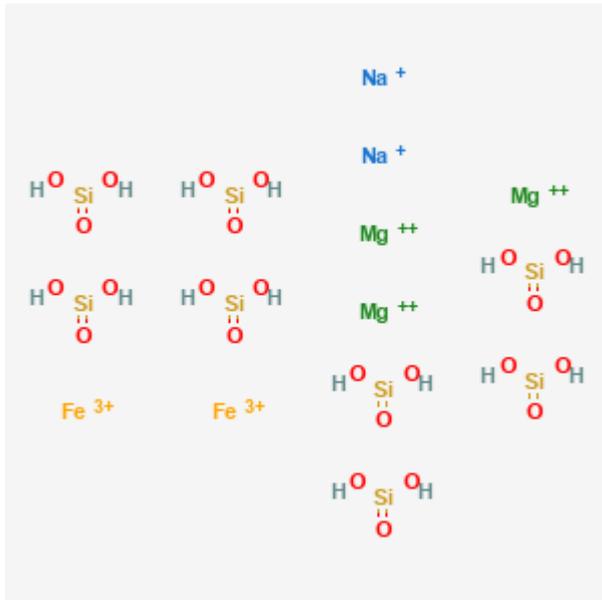


Fig. 2 Struttura chimica della crocidolite



Fig. 3 Crocidolite appartenente alla famiglia dei silicati. Classificazione strutturale: 9.ED15

La sua tossicità è ben nota e provata; sono stati quindi suggeriti due possibili meccanismi principali di danno :

- a livello indiretto: il danno dipende dalla produzione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS);
- a livello diretto: le fibre determinerebbero i danni meccanici diretti sulle strutture cellulari e che possono indurre anche un danno al DNA. ⁽⁶⁾
- In ogni caso sembra che la fagocitosi frustrata delle fibre sia un primo passo necessario; questo tipo di fagocitosi comporta la dannosa extravasazione del liquido lisosomiale nello spazio extracellulare causando un processo infiammatorio. ⁽⁷⁾

È stato riportato come questo evento accada principalmente nelle fibre di asbesto che hanno una lunghezza superiore a 10 μm , quindi particolarmente lunghe come la crocidolite, infatti le fibre relativamente corte vengono completamente racchiuse nei fagosomi ed eliminate. È stato dimostrato che le fibre di lunghezza $< 5 \mu\text{m}$ non vengono trattenute nei polmoni e non causano infiammazione cronica. Al contrario, le fibre più lunghe evidentemente non possono essere completamente endocitate dai macrofagi, provocando il processo di fagocitosi frustrata con la conseguente permanenza all'interno del polmone per molto tempo. (8)

Si pensa inoltre che la fagocitosi frustrata sia un evento associato anche a instabilità cromosomica, quindi questa evidenzia come la crocidolite abbia effetti pro-cancerogeni. (8)

È stato dimostrato come la crocidolite, a causa del suo alto contenuto di ferro, favorisca la formazione di ROS nelle cellule che la internalizzano e quindi danneggino il DNA conducendo alla formazione di rotture a doppio filamento (DBS) e modifica di basi e che quindi, di fatto, porti all'aumento del rischio di cancerogenesi. (9)

È provato che l'associazione ferro-crocidolite abbia effetti molto pericolosi e dannosi a livello mesoteliale, infatti esperimenti in vivo e vitro hanno evidenziato la veridicità di questa affermazione visto l'aumento dei danni genetici come double strand breaks (DBS) e modifiche di basi (formazione della 8-idrossi-2-deossi guanina), a causa dell'overload di potenziale ossidativo apportato sia dal ferro che dalla crocidolite nella cellula mesoteliale con formazione di ROS e conseguente stress cellulare. (9)

Inoltre sembra la crocidolite possa essere in grado di legare il ferro da fonti intracellulari. Questa ulteriore dose di ferro (Fe) può aggiungersi come fonte di potenziale reattivo che permette di prolungare la durata di permanenza della fibra dentro la cellula. (9)

Il **crisotilo** ($\text{Mg}_3(\text{OH})_4\text{Si}_2\text{O}_5$) è l'unico serpentino tra gli asbesti, a differenza degli altri 5 tipi di fibre appartenenti alla serie degli anfiboli. È uno strato di silicato fibroso naturale con una struttura idrosa triottaedrica composta da un foglio centrato in silice tetraedrico (T) e un foglio ottaedrico centrato in Mg(O).

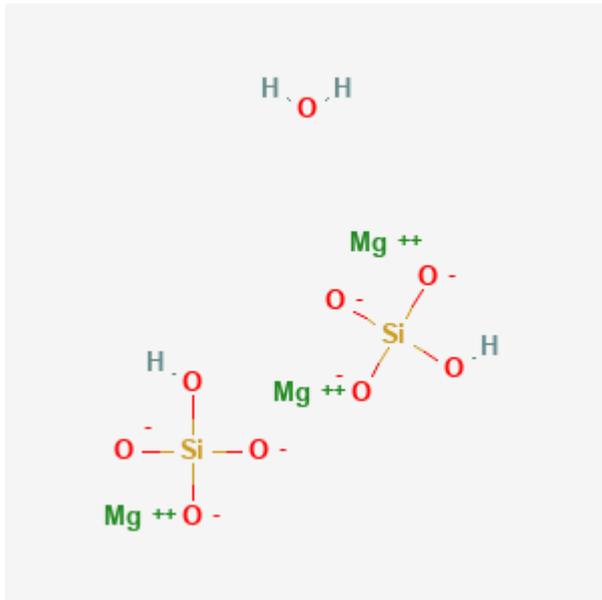


Fig. 4 Struttura del crisotilo



Fig. 5 Crisotilo appartenente alla famiglia dei silicati. Classificazione strutturale 9.ED.15

L'habitus fibroso del crisotilo è dovuto a esigenze strutturali dello stesso, in quanto, per mantenere la corrispondenza fra gli strati tetraedrici e quelli triottaedrici, cede a un incurvamento degli strati per evitare un possibile disallineamento, assumendo per questo motivo il suo tipico comportamento nell'ambiente polmonare. (10)

È stato usato fin dall'antichità per un enorme numero di applicazioni (ce ne sono più di 3000 diversi articoli e prodotti contenenti crisotilo) a causa delle sue proprietà fisiche e tecnologiche. Lo sfruttamento a livello industriale del crisotilo iniziò nel XVIII secolo in Siberia, e il suo uso massiccio in tutto il mondo (ad esempio, per la produzione di cemento-amianto) iniziò alla fine del XIX secolo e continua ancora oggi. È noto che l'esposizione a questa fibra minerale induca numerose malattie polmonari specifiche (ad es. asbestosi, placche pleuriche, carcinoma polmonare e tumori maligni come il mesotelioma). (11)

Il crisotilo è noto per non essere particolarmente biopersistente nei polmoni, poiché reagisce nell'ambiente acido del fagolisosoma dei macrofagi attraverso la lisciviazione del Mg, assumendo una struttura di silice amorfa.

L'intero processo di citotossicità si verifica in un arco di tempo che va da settimane a mesi e quindi si potrebbe affermare che abbia un'azione sia acuta che cronica. Questa tossicità in realtà differisce da quella delle fibre di amianto anfibolo per la biodurabilità eccezionalmente elevata di queste ultime; infatti, per le fibre anfiboliche inalate si può osservare solo una dissoluzione superficiale limitata e la loro azione dannosa può durare tutta la vita (azione cronica). (12)

È stato evidenziato come la pericolosità delle fibre di asbesto derivi anche dalle loro dimensioni.

Le fibre più lunghe che sono trattenute nei polmoni sono associate a lesioni croniche nei modelli umani e animali (32). Tuttavia, anche quelle più corte potrebbero non essere innocue, infatti è stato dimostrato come inducano con meno probabilità il processo tumorigenico rispetto alle fibre lunghe e sottili.

Il serpentino (crisotilo), ad esempio, a causa della forma ricurva, penetra con più difficoltà e viene più efficacemente smaltito dalla clearance muco-ciliare. (13)

Sebbene l'amianto crisotilo sia classificato come "sostanza cancerogena" dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC), questa fibra è ancora estratta e utilizzata in nazioni come la Russia, che rappresenta attualmente uno dei principali paesi produttori ed esportatori di crisotilo nel mondo, con più del 50% della produzione globale, insieme ad altri sette paesi tra cui Cina, India e Kazakistan. Secondo questi infatti la bassa biodurabilità del crisotilo lo rende meno pericoloso per la salute umana rispetto ad altre fibre di asbesto. (14)

Recentemente negli Stati Uniti, l'Agenzia per la protezione ambientale ha nuovamente autorizzato l'utilizzo del crisotilo come materiale per l'edilizia, revocando il divieto in vigore dal 1989.

Negli ultimi dieci anni, si è cercato di far inserire la fibra di crisotilo nell'elenco della Convenzione di Rotterdam al fine di porre restrizioni alla sua commercializzazione. Si tratta infatti di una convenzione che obbliga le parti contraenti a informare altre parti su qualsiasi decisione di divieto o di limitazione severa dell'utilizzazione di prodotti chimici e a notificare le esportazioni di tali sostanze ai Paesi importatori. (48)

Nel 2017 viene sottolineato da Masucci ⁽⁴⁸⁾ come il Crisotilo Russo non sia stato incluso nella lista dei prodotti pericolosi del commercio internazionale e di come questo evento sia allarmante visto che sono circa 107.000 le persone nel mondo che ogni anno muoiono per malattie collegate alla sua esposizione, materiale ancora ampiamente utilizzato nonostante la riconosciuta pericolosità.

L'effettivo pericolo per la salute rappresentato dal Crisotilo Russo commerciale russo non è stato valutato quantitativamente fino ad oggi.

1.3 Patologie correlate all'esposizione a fibre di amianto

L'esposizione per via inalatoria alle fibre di amianto determina numerose patologie infiammatorie croniche, con una evoluzione verso la fibrosi polmonare e la comparsa di tumori.

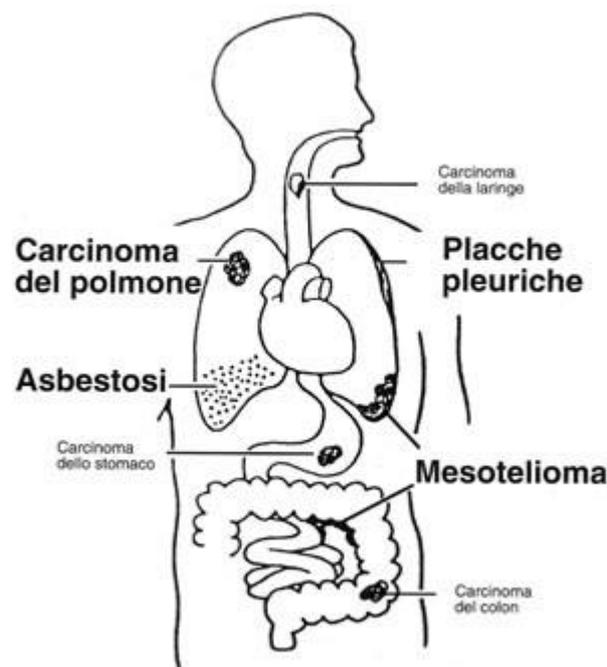


Fig. 6 : Malattie provocate dall'esposizione all'amianto (<https://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/amianto/quali-malattie-puo-provocare>)

1.3.1 Patologie infiammatorie e fibrotiche causate dall'amianto

Tra le patologie infiammatorie e fibrotiche causate dall'amianto troviamo le placche pleuriche, calcificazioni, ispessimenti, aderenze, versamento e mesotelioma.

Le placche pleuriche e l'asbestosi sono condizioni causate unicamente dall'esposizione all'amianto.

Placche pleuriche

Rappresentano le lesioni più comuni associabili all'esposizione all'amianto, si presentano come aree grigio-bianche di tessuto ispessito nella pleura. Poiché sono costituite da tessuto cartilagineo (collagene ialino), sono a volte indicate come placche pleuriche ialine. Sono considerate manifestazioni tipiche di un'esposizione all'amianto di moderata o medio-grave entità avvenuta un decennio prima.

In uno studio, i ricercatori hanno riscontrato che circa l'89% delle persone esposte all'amianto hanno successivamente sviluppato placche pleuriche. (15)

Si ritiene che a seguito dell'inalazione di amianto da parte di un individuo le fibre possano rimanere incorporate nel rivestimento polmonare e causare irritazione. Sembra che il sistema linfatico possa essere responsabile del trasporto delle fibre fino alla pleura, e che, durante il loro percorso, a causa delle loro ridotte dimensioni, queste possano rimanere bloccate all'interno di alcuni organi e permanervi.

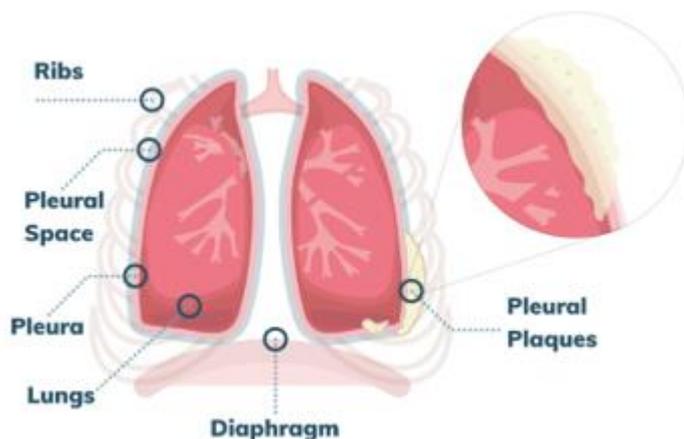


Fig. 7 : Schema riassuntivo della patogenesi delle placche pleuriche da asbesto (<https://www.mesothelioma.com/asbestos-cancer/pleural-plaques/>)



Fig. 8: Esempi di placche pleuriche su una Tomografia Computerizzata del torace (A) e una radiografia toracica (B). Le frecce indicano placche frontali, freccia spessa indica placca di profilo, e le punte di freccia indicano placche calcificate. (49)

Le placche pleuriche possono iniziare a svilupparsi una volta che le fibre di amianto raggiungono la pleura. Spesso si sviluppano nella membrana esterna del rivestimento polmonare che aderisce alla parete toracica (pleura parietale). In alcuni casi, le placche possono svilupparsi nella membrana interna (pleura viscerale), oppure possono anche svilupparsi nel diaframma dopo l'ingestione o l'inalazione di fibre di amianto.

Le fibre di amianto causano infiammazione e fibrosi nel tempo. Le placche pleuriche si presentano come depositi fibrosi localizzati che addensano il rivestimento del polmone. Esse si sviluppano come lesioni bianche con una consistenza gommosa, anche se possono calcificare nel tempo.

I ricercatori hanno osservato un periodo di latenza medio di 20 anni prima che si possano sviluppare placche pleuriche, ma alcuni pazienti hanno sperimentato la condizione molto prima. (16)

A differenza di altre malattie gravi legate all'amianto come il mesotelioma maligno, le placche pleuriche non sono cancerose, anche se possono rappresentare un fattore di rischio per lo sviluppo successivo del mesotelioma.⁽¹⁶⁾

In uno studio, i ricercatori hanno osservato più di 13.000 lavoratori di amianto a partire dal 2003 fino al 2011. Hanno analizzato le istanze di placche pleuriche, ispessimento pleurico e la prevalenza di future diagnosi di mesotelioma. ⁽¹⁶⁾

Le placche pleuriche raramente presentano sintomi e richiedono un intervento medico minimo o nullo. Tuttavia, alcune ricerche hanno indicato che i pazienti con diagnosi di placche pleuriche hanno una maggiore probabilità di sviluppare mesotelioma pleurico o altre malattie legate all'amianto. ⁽¹⁶⁾

Asbestosi

È una condizione polmonare grave causata da esposizione all'amianto. Molti casi di asbestosi sono riconducibili a un'esposizione costante a materiali contenenti amianto in cantieri edili, navi e impianti industriali. ⁽¹⁷⁾

L'asbestosi fa parte di molte malattie polmonari interstiziali che causano l'infiammazione e la cicatrizzazione nei polmoni. Le fibre inalate dell'amianto, infatti, possono causare fibrosi polmonare. L'asbestosi viene definita pneumoconiosi o malattia polmonare professionale. ⁽¹⁷⁾

È una malattia polmonare incurabile che rende la respirazione progressivamente più difficile.



Fig. 9 Radiografia del torace di un paziente con asbestosi, l'immagine mostra i cambiamenti reticolari con aspetto a nido d'ape nella patologia. (<https://www.msmanuals.com/it-it/professionale/malattie-polmonari/disturbi-polmonari-ambientali/asbestosi>)

Non esiste una cura per questa patologia ma il trattamento può alleviare i sintomi e rallentare la progressione della malattia. Contribuisce a causare la morte di circa 600 fino a più di 1.000 persone ogni anno, e quindi rappresenta un elevato fattore di rischio per lo sviluppo di neoplasie legate all'amianto. (17)

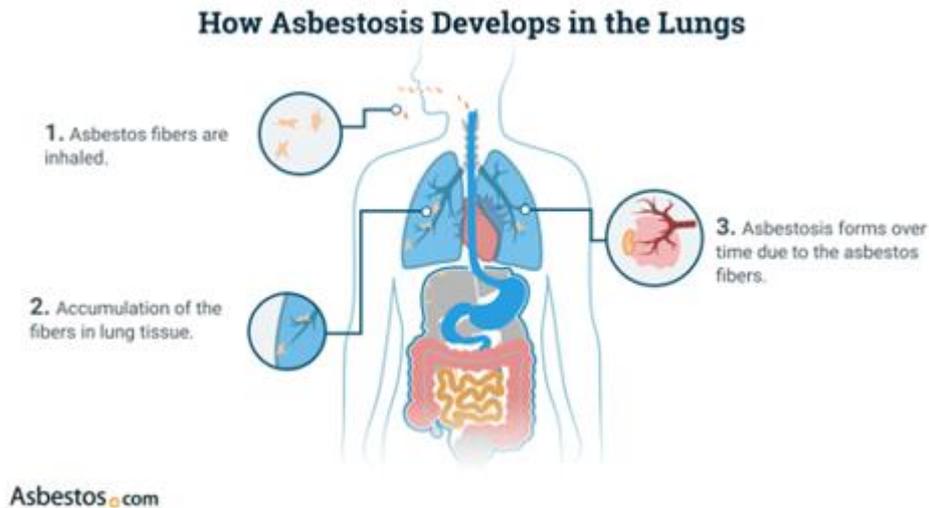


Fig. 10 Schema della patogenesi dell'asbestosi (<https://www.asbestos.com/cancer/>)

La malattia compare in genere dopo molte decine di anni dall'esposizione. Le fibre di amianto inizialmente si posizionano a livello delle alte vie aeree dove si creano le prime lesioni. Successivamente, si assiste a un ispessimento diffuso e a una fibrosi che si estende ai polmoni. Inoltre, il deposito delle fibre attiva il sistema immunitario e ne segue una reazione infiammatoria da corpo estraneo. In questo caso il tessuto polmonare subisce un'alterazione cicatriziale perdendo elasticità.

Contemporaneamente lo scambio gassoso a livello alveolare diventa progressivamente meno efficiente. Negli stadi avanzati l'asbestosi causa dispnea e alterazioni della funzione polmonare (sono tipiche le alterazioni ventilatorie restrittive con ulteriore deterioramento della disfunzione). Nella forma più tipica essa può condurre a un'invalidità polmonare. L'asbestosi, inoltre, si associa a un aumento del rischio di carcinoma polmonare ⁽¹⁷⁾

1.3.2 Neoplasie correlate all'esposizione ad asbesto

In generale, la cancerogenesi inizia quando si verificano una serie di mutazioni nel DNA di una cellula.

Non sono ancora chiari gli elementi responsabili delle mutazioni genetiche iniziali che conducono al mesotelioma, benché i ricercatori abbiano identificato i fattori che possono

aumentarne il rischio. È probabile che la causa dell'esordio di cancerogenesi sia frutto di un'interazione fra molti fattori, quali la predisposizione genetica, l'ambiente, lo stato di salute e lo stile di vita. (18)

L'esposizione all'amianto rappresenta il fattore di rischio primario per il mesotelioma. Durante il processo di estrazione o durante la rimozione di isolamento dell'amianto, si può entrare in contatto con la polvere che se inalata o ingerita, porta alla deposizione delle fibre di amianto nei polmoni o nello stomaco, e da qui provocare irritazione e quindi il mesotelioma. Il tempo di latenza della malattia è molto lungo, impiega da 20 a 60 anni o più. (18)

La maggior parte delle persone esposte all'amianto comunque non sviluppa mai il mesotelioma, per cui si ritiene che altri fattori possano essere coinvolti, quali la predisposizione genetica, la storia personale di esposizione all'amianto, la convivenza con soggetti che lavorano con l'amianto; infatti le persone che sono state esposte possono, a seguito della deposizione di amianto sulla loro pelle e vestiti, portare a contaminare i propri conviventi. (18)

L'esposizione a queste fibre nel corso di molti anni può mettere a rischio di mesotelioma i soggetti non esposti in modo diretto all'amianto. Per ridurre questo rischio occorre quindi migliorare le condizioni igieniche personali (docce frequenti e cambio di vestiti possibilmente contaminati). (18)

Tumori polmonari

In genere, a seguito dell'esposizione all'amianto, le fibre microscopiche possono depositarsi nel tessuto polmonare. I ricercatori hanno studiato il modo in cui queste fibre di amianto causano il cancro e hanno trovato prove che l'amianto può innescare cambiamenti all'interno del DNA stesso.

Nel 2017, l'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC) ha condotto un ampio studio di ricerca che ha fornito nuove prove per collegare l'amianto alla metilazione del DNA con alterazione del materiale genetico dell'individuo.

Questa reazione chimica- metilazione del DNA- ha impatto sui processi biologici. I ricercatori IARC hanno spiegato infatti che "i meccanismi epigenetici come la metilazione del DNA sono fondamentali nella regolazione dell'espressione genica e della cancerogenesi". (20)

I processi biologici che vengono influenzati in modo significativo includono il trasporto di ioni di potassio. I canali del potassio infatti regolano i comportamenti della massa tumorale risultando avere effetti antitumorali. Una loro alterazione della capacità di ostacolare l'avanzamento del tumore potrebbe consentire a quest'ultimo di progredire in modo aggressivo.

Il processo di cancerogenesi polmonare innescato dall'amianto stesso può richiedere decenni dal momento dell'esposizione fino all'insorgenza dei sintomi. Infatti il tumore del polmone correlato all'amianto impiega in genere tra i 15 e 35 anni per svilupparsi.

A causa di questo lungo periodo di latenza, la maggior parte dei casi diagnosticati oggi è iniziata con l'esposizione professionale all'amianto avvenuta decenni fa. I veterani e altri legati al servizio militare sono ad alto rischio perché l'uso di amianto nelle forze armate era ampio. Anche i lavoratori dell'industria mineraria, dell'edilizia, dell'industria pesante, la costruzione navale e i vigili del fuoco sono gruppi ad alto rischio. (20)

Sebbene non tutte le persone esposte all'amianto sviluppino il cancro ai polmoni, quelle esposte a grandi quantità di amianto per lunghi periodi di tempo sono quelle maggiormente a rischio.

(20)

L'esposizione all'amianto può causare qualsiasi tipo di cancro ai polmoni. Le due grandi classificazioni del cancro polmonare sono carcinoma polmonare non a piccole cellule e a piccole cellule:

Il carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC) rappresenta tra il 10% e il 15% dei casi ed è più difficile da trattare. Il cancro può diffondersi ad altre parti del corpo prima di presentare sintomi. (20)

Diversi studi epidemiologici (21) sulla mortalità di lavoratori entrati in contatto con amianto rilevano come l'esposizione alle fibre possa essere correlata con l'aumento del rischio di sviluppare carcinoma polmonare, in particolare il cancro del polmone non a piccole cellule (non-small-cell lung cancer, NSCLC). (22)

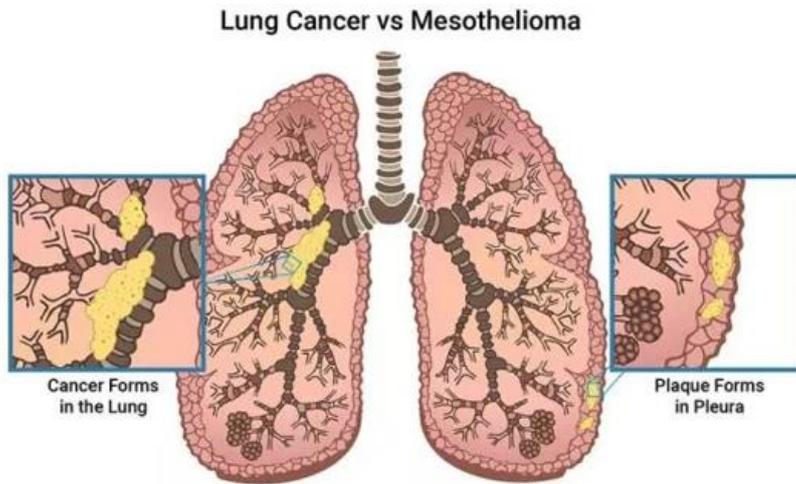


Fig. 11 Confronto della localizzazione del tumore polmonare e mesotelioma (<https://www.asbestos.com/cancer/lung-cancer/mesothelioma/>)

NSCLC è un tipo di tumore polmonare maligno che si differenzia dal tumore polmonare a piccole cellule per l'aspetto delle cellule del tumore stesso al microscopio. A sua volta il NSCLC si divide in altri sottotipi, fra cui i tre tipi principali sono l'adenocarcinoma, il carcinoma a cellule squamose e il carcinoma a grandi cellule (indifferenziato) del polmone. Il cancro polmonare è la terza neoplasia maligna più comune in Europa; il NSCLC rappresenta l'85-90% di tutti i tumori polmonari maligni.

Il fumo di sigaretta costituisce il principale fattore di rischio per lo sviluppo di questo tipo di tumore, la sua associazione con l'asbesto è provata che sia esponenzialmente dannosa e pericolosa per la trasformazione neoplastica in nell'ambiente polmonare. (23)

Il cancro del polmone si sviluppa nel polmone stesso, mentre il mesotelioma si sviluppa nel rivestimento del polmone.

I due tumori crescono in modo diverso, infatti il tumore del polmone tende a crescere in masse individuali, note come noduli, con confini definiti mentre il mesotelioma inizia come minuscoli noduli tumorali che disperdono il rivestimento mesoteliale e alla fine si uniscono a formare una guaina attorno all'organo. (24)

Il cancro polmonare ha la tendenza a diffondersi o metastatizzare precocemente ad altri organi, mentre il mesotelioma tende ad essere una malattia più localmente aggressiva che rimane all'interno di una cavità corporea. (24)

Ulteriori differenze tra mesotelioma e tumore polmonare	
Mesotelioma	Tumore polmonare
Le statistiche sul mesotelioma mostrano che oltre l'80% dei casi di mesotelioma sono il risultato dell'esposizione all'amianto.	Il 90 % di tutti i decessi per cancro ai polmoni sono attribuiti al consumo di tabacco. L'esposizione al radon è la seconda causa di cancro ai polmoni.
Questo tumore impiega in genere dai 20 ai 50 anni per svilupparsi dopo l'esposizione iniziale all'amianto	Questo tumore ha un periodo di latenza più breve e può comparire da 10 a 30 anni dopo la prima esposizione a un cancerogeno come l'amianto o il fumo di sigaretta.

Mesotelioma maligno della pleura e del peritoneo

Si tratta di un tumore che riguarda principalmente la pleura (mesotelioma pleurico) o, raramente, del peritoneo rapidamente progressivo dopo l'esordio. Studi sperimentali hanno evidenziato che nelle nazioni industrializzate occidentali la maggior parte dei mesoteliomi maligni sia causato da una precedente esposizione all'amianto

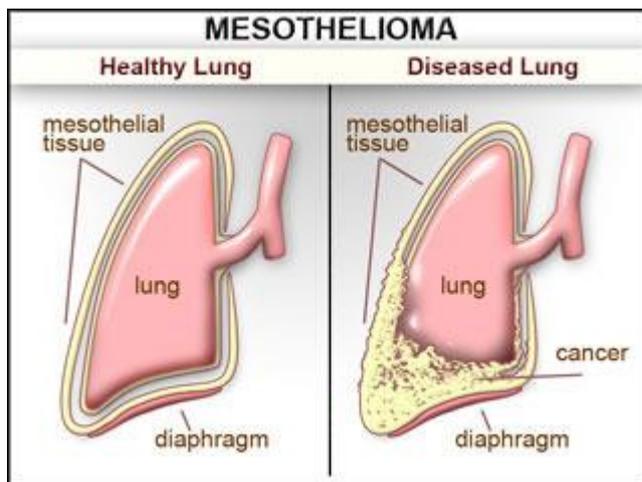


Fig. 12 Confronto del tessuto mesoteliale di un polmone sano vs polmone malato (da <https://www.informazionimediche.com/patologie/il-mesotelioma-informazioni-e-cause.html>)

I tumori pleurici del mesotelioma dal punto di vista istologico si classificano sulla base del tipo cellulare predominante.

La maggior parte dei casi di mesotelioma maligno sono diagnosticati con un elevato numero di cellule epiteliali, chiamate anche cellule epitelioidi. Questo tipo di tumore risponde meglio al trattamento.

Il mesotelioma sarcomatoide è la tipologia di mesotelioma meno comune. È aggressivo e difficile da trattare, e la maggior parte di questi casi si verificano nei pazienti pleurici.

Il mesotelioma “a cellule bifasiche” presenta cellule con entrambi i fenotipi, quindi sia sarcomatoide che epitelioide. La risposta di questo tipo di tumore alla terapia dipende dal rapporto delle cellule. Se sono presenti più cellule epitelioidi, risponderà meglio dei tumori composti da più cellule sarcomatoidi.

Il tumore si manifesta con estroflessioni nodulari della pleura che evolvono rapidamente causando versamenti sierosi (versamento pleurico, ascite) a livello toracico o addominale. Per

quanto riguarda l'esordio a livello toracico solitamente sono presenti fin dall'inizio dolori e dispnea.

L'International Mesothelioma Interest Group ha creato il sistema di stadiazione TNM, il sistema di stadiazione più utilizzato per il mesotelioma pleurico. Gli stadi 1 e 2, che sono considerati gli stadi iniziali, indicano tumori localizzati. Le fasi 3 e 4, che denotano le fasi successive, classificano i tumori che si diffondono. (19)

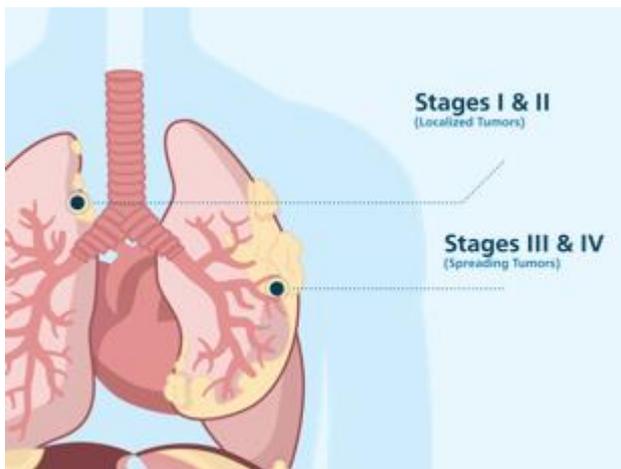


Fig. 13 Stadiazione della tumorigenesi mesoteliale (<https://www.asbestos.com/mesothelioma/pleural/>)

Il mesotelioma tutt'oggi è considerato non guaribile, benché esistano diverse opzioni terapeutiche e trattamenti farmacologici. Queste permettono soltanto un limitato miglioramento della prognosi. Senza terapia la maggior parte dei pazienti con mesotelioma non sopravvive a 1 anno dalla diagnosi. Con la chemioterapia si è tentato di ottenere un miglioramento del tempo di sopravvivenza, ma senza significativi miglioramenti. (19)

Aspettativa di vita del mesotelioma (suddivisa per fasi) di pazienti idonei alla chirurgia⁽¹⁹⁾:

FASI	TEMPISTICHE (MESI)	PROGRESSIONE
Fase 1	22.2 mesi	Il tumore rimane localizzato dentro e intorno al rivestimento tissutale di un polmone
Fase 2	20.0 mesi	Le cellule tumorali entrano nel polmone attraverso i linfonodi
Fase 3	17.9 mesi	Il tumore si espande agli organi vicini e ai linfonodi più distanti
Fase 4	14.9 mesi	Il tumore si espande agli organi distanti

Capitolo 2: Modelli in vitro per lo studio delle patologie polmonari

2.1 Overview dell'apparato respiratorio

I polmoni sono gli organi principali dell'apparato respiratorio che hanno la funzione primaria di consentire lo scambio di gas durante il processo respiratorio. Sostanze provenienti dall'inquinamento atmosferico, agenti patogeni e fumo di sigaretta contribuiscono allo sviluppo di malattie, infezioni e lesioni che colpiscono la struttura e la funzione del polmone, causando esiti gravi e spesso fatali. Dal punto di vista anatomico, l'apparato respiratorio è diviso in tratto respiratorio superiore e inferiore. L'aria entra nel corpo attraverso il tratto respiratorio superiore che comprende le cavità nasali e orali. Il tratto respiratorio inferiore comprende la laringe, la trachea, i bronchi primari destro e sinistro si ramificano in piccoli bronchi, bronchioli, dotti alveolari e alveoli. (59)

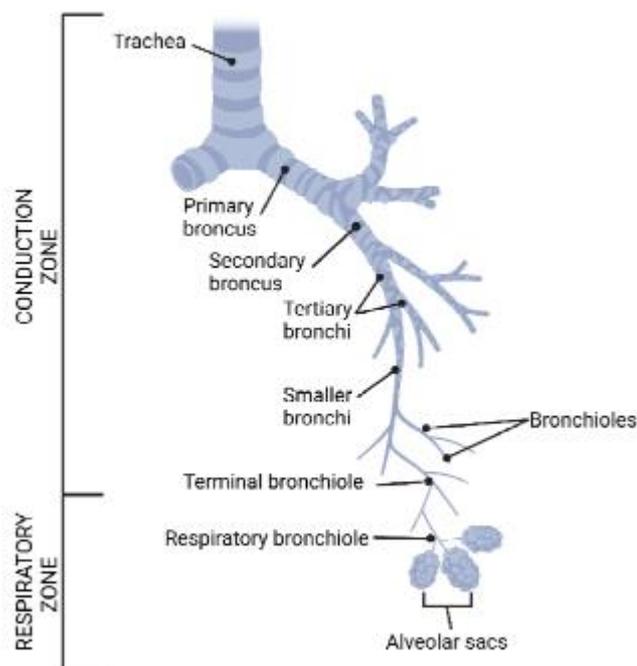


Fig. 14 Rappresentazione schematica dell'apparato respiratorio. (da BioRender.com)

La porzione respiratoria è la parte funzionale dei polmoni (parenchima polmonare) coinvolta nella diffusione dei gas in entrata e in uscita dal flusso sanguigno e comprende i bronchioli respiratori e le strutture alveolari (dotti alveolari, sacche alveolari e alveoli).⁽⁵⁹⁾

Porzione Alveolare

Circa il 90% del volume totale del polmone è occupato dalla zona alveolare; gli alveoli, situati nella porzione distale dei polmoni, sono delle piccole strutture che rappresentano l'unità funzionale dell'apparato respiratorio.

Di fatto i fenomeni di scambio gassoso si verificano a livello della parete alveolare che divide lo spazio aereo alveolare dal lume capillare.

La continuità e la tenuta dei componenti della barriera alveolare-capillare (epitelio alveolare, endotelio capillare polmonare, membrana basale e spazio interstiziale) sono fondamentali per l'equilibrio dei fluidi nella regione alveolare. ⁽⁷⁴⁾

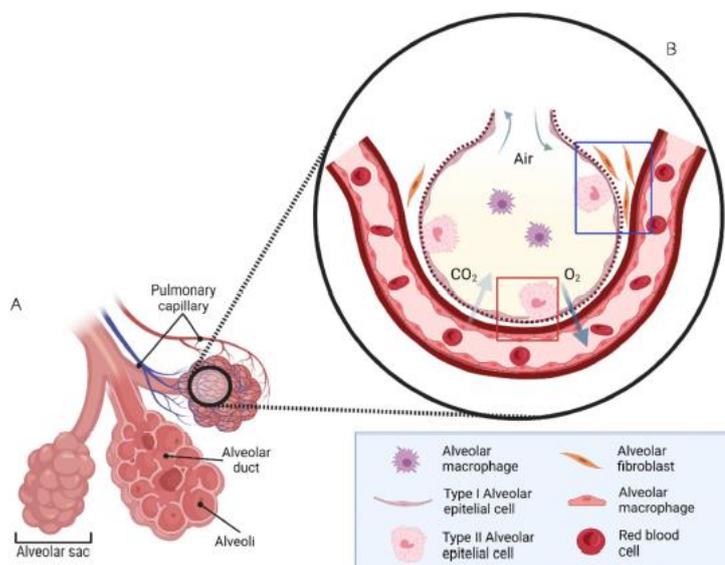


Fig. 15 Rappresentazione schematica dell'architettura alveolare (da BioRender.com)

A livello alveolare troviamo cellule epiteliali alveolari di tipo I e II, le prime hanno il compito di facilitare lo scambio di gas tra aria e sangue, nonché di regolare l'equilibrio fluido

e ionico all'interno degli alveoli, quelle di tipo II presentano corpi lamellari all'interno del citoplasma contenenti il tensioattivo polmonare, il quale previene il collasso della struttura alveolare durante la respirazione. Hanno un ruolo molto importante anche le cellule endoteliali, che controllano il passaggio di diverse sostanze (prostaglandine, ammine vasoattive, nucleotidi di adenina, peptidi lipidici, ormoni e farmaci) nella circolazione sistemica. (75)

I macrofagi alveolari sono un'altra tipologia di cellule che risiedono nello spazio aereo-alveolare. Il loro ruolo si esplica nel fornire la risposta infiammatoria protettiva contro gli elementi patogeni e le particelle esogene, nonché nel prevenire l'accumulo intra-alveolare di proteine e lipidi mediante la degradazione selettiva di piccoli aggregati non funzionali di tensioattivo polmonare. Esistono 3 tipi di macrofagi: macrofagi di tipo I, di tipo II e di tipo regolatorio.(76)

I primi hanno proprietà infiammatorie e regolano la difesa dell'ospite contro virus e batteri. I macrofagi di tipo II hanno una funzione anti- infiammatoria e svolgono un ruolo cruciale nella riparazione e nella ferita dei tessuti in guarigione. I macrofagi regolatori sono anch'essi anti-infiammatori e sono responsabili del controllo delle risposte infiammatorie e immunitarie eccessive. (76)

Le strutture cellulari principali nell'alveolo sono:

- La membrana basale alveolare consistente in una matrice extracellulare specializzata (ECM) coinvolta nel supporto degli strati cellulari epiteliali ed endoteliali. I componenti principali della membrana basale includono collagene di tipo IV, elastina, laminina, proteoglicani e altre proteine della matrice extracellulare.
- Lo spazio interstiziale, sul lato più spesso della parete alveolare, che separa l'epitelio alveolare dall'endotelio capillare polmonare; l'interstizio conferisce stabilità meccanica al parenchima polmonare e svolge un ruolo cruciale nel mantenimento dell'omeostasi cellulare. (76)

Proprio a causa della complessità strutturale dell'apparato respiratorio e della necessità di sviluppare terapie sicure ed efficaci per le malattie polmonari sono necessari solidi modelli preclinici e sperimentali che forniscano un'accurata comprensione della progressione della patologia e dell'efficacia della terapia.

Esistono diversi modelli (ex-vivo ed in vitro) di parenchima polmonare che sono stati e continuano ad essere oggetto di studio volti a comprendere il complesso ambiente tridimensionale e dinamico della crescita tissutale. (52)

L'obbiettivo della comunità scientifica e della ricerca verte quindi sull'implementazione di modelli polmonari avanzati in vitro per migliorare l'efficacia delle terapie personalizzate prima di eseguire studi clinici sull'uomo. Un approccio per affrontare questa sfida consiste nello sviluppare modelli biomimetici in vitro in cui le cellule vengono coltivate in un microambiente simile a quello fisiologico in vivo che induce l'imitazione in vitro delle funzioni tessuto-specifiche. (52)

2.2 Modelli di barriera epiteliale polmonare

Le malattie polmonari croniche e acute sono una delle principali cause di morbilità e mortalità in tutto il mondo; sono stati sviluppati diversi modelli per lo studio di queste patologie in pazienti con malattie polmonari croniche come la broncopneumopatia cronico-ostruttiva (BPCO), asma grave, cancro ai polmoni e malattie polmonari parenchimali per cui attualmente non sono disponibili terapie curative.(52)

I modelli animali sono stati utilizzati per studiare ruoli e meccanismi delle aree polmonari, nonché per identificare i mediatori chiave nello sviluppo e nella progressione delle patologie. Le specie animali sono selezionate come modelli in vivo in base alla loro capacità di correlare con la fisiologia umana, alla loro capacità di riprodurre malattie e alla loro risposta alle terapie. Topi e cavie sono le specie animali più frequentemente impiegate; i topi geneticamente modificati sono ampiamente utilizzati perché consentono di valutare la funzione fisiologica di geni specifici e di studiare lesioni e processi infiammatori nei polmoni.(52)

Sebbene gli studi su questo tipo di modello animale per lo studio di malattie polmonari abbiano approfondito la comprensione dei meccanismi patologici della malattia e abbiano portato all'identificazione di potenziali nuovi bersagli terapeutici questi modelli mostrano differenze biologiche e fisiologiche rilevanti se confrontati con l'uomo.(51)

A tal proposito, l'uso degli esseri viventi per scopi scientifici è stato criticato offrendo la possibilità di utilizzare strategie più etiche e sostenibili in linea con i principi delle 3R.

Questi puntano alla salvaguardia degli animali utilizzati a scopi scientifici e si basano sulla: riduzione (Reduction), raffinazione (Refinement) e sostituzione(Replacement). In particolare:

- Reduction : si riferisce alla riduzione del numero di animali nel modello sperimentale.
- Refinement : si riferisce alla modifica di eventuali procedure relative agli animali da laboratorio, per ridurre il dolore, l'angoscia e la sofferenza subiti.
- Replacement : si riferisce alla possibilità di trovare modelli e approcci non basati sull'utilizzo di animali ma di una complessità tale da poter essere comunque comparati ai tessuti e a parti di organi umani. (77)

Tra i modelli in vitro più spesso utilizzati esistono quelli in bidimensionali (2D) convenzionali, i quali implicano la coltura di linee cellulari (derivate da animali o pazienti donatori) che crescono in monostrato su piastre. Una volta isolate, le colture cellulari 2D sono facili da manipolare e mantenere consentendo di studiare la risposta delle cellule a fattori di crescita solubili o farmaci. Purtroppo però sebbene i sistemi 2D siano tecniche a basso costo e facilmente replicabili con protocolli stabiliti, non riescono a replicare alcuni comportamenti cellulari complessi. In effetti, il loro uso nel riprodurre un modello polmonare in vitro è vincolato dall'incapacità di imitare le tre dimensioni naturalmente presenti (3D). (1)

Le colture polmonari ex vivo sono modelli convenienti per l'analisi delle interazioni della materia ambientale o dei patogeni in un contesto tissutale tridimensionale delle vie aeree o del parenchima polmonare, nonché per la valutazione delle risposte e della tossicità dei farmaci. Si tratta di porzioni (“fette”) di tessuto polmonare tagliate con precisione (PCLS), le quali rappresentano un modello ex vivo costituito da tutti i tipi cellulari rilevanti nel loro ambiente microanatomico. (52)

Sebbene questi modelli traggano vantaggio dal mantenimento della normale architettura del tessuto polmonare, sono limitati dalla loro vitalità relativamente a breve termine e le proprietà barriera epiteliale sono compromesse dall'esposizione dell'intero campione di tessuto asportato agli agenti potenzialmente dannosi.(52)

Nel lavoro di Gerckens et al. (51) si evidenzia come queste PCLS possano essere utilizzate per allestire colture di tessuti polmonari 3D, chiamati 3D-LTC. I 3D-LTC rappresentano infatti un

modello di coltura cellulare su tre dimensioni rilevante, vista la loro somiglianza con tessuti in vivo grazie alla loro complessità, alla biomeccanica e alla composizione molecolare. I 3D-LTC derivati da PCLS umani possono essere utilizzati per analizzare le risposte a nuovi farmaci, che potrebbero ulteriormente aiutare a comprendere meglio i meccanismi ed effetti funzionali di farmaci nel tessuto umano.

Tuttavia, l'elaborazione e l'ottenimento del tessuto polmonare rimane difficile per diversi motivi. A differenza di un tessuto solido, il parenchima polmonare di origine tende a collassare senza ventilazione e mostra una minore rigidità dei tessuti. Queste proprietà impediscono il taglio corretto del tessuto e l'allestimento del modello 3D stesso. (51)

Altri modelli polmonari umani ricostituiti in vitro, si basano sull'uso di linee cellulari ampiamente impiegate sia per studi fisiopatologici delle risposte della barriera alveolare agli agenti endogeni ed esogeni e alle loro vie di segnalazione associate, sia per studi di trasporto attraverso la barriera epiteliale⁽⁵²⁾. Inoltre, un vantaggio da non sottovalutare è che questi modelli basati sull'immortalizzazione di linee cellulari di epitelio polmonare umano sono economicamente più convenienti degli esperimenti in vivo. Permettono inoltre di effettuare numerosi esperimenti in un arco di tempo ristretto. Tuttavia, presentano anche alcune limitazioni in quanto sono frequentemente costituiti da colture in monostrato di singole tipologie cellulari, possono avere un fenotipo atipico (ad esempio, derivato da adenocarcinomi) e le loro giunzioni strette potrebbero non essere rappresentative del tessuto che si vuole imitare.

(52)

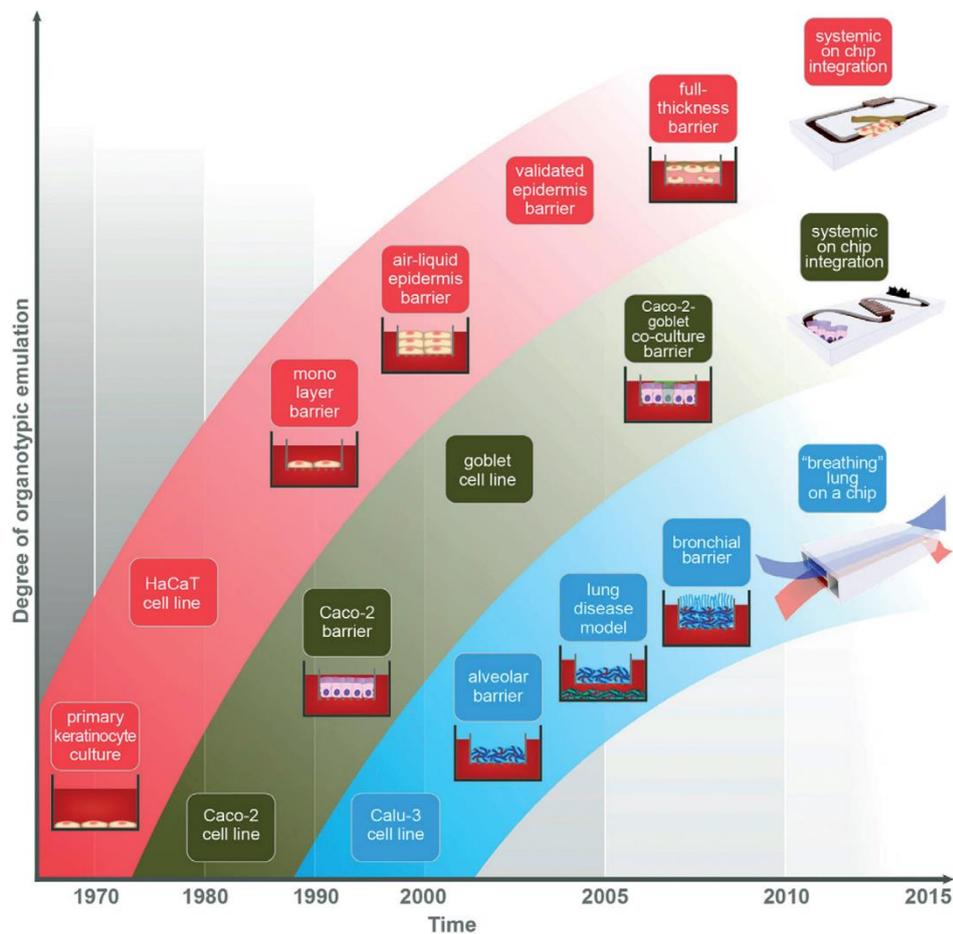


Fig. 16 Sviluppo nel corso del tempo di modelli epiteliali umani in vitro ⁽⁵⁹⁾ (da Altex 32(4), 2015)

Esistono modelli in vitro ad oggi utilizzati che si basano sull'utilizzo di colture polmonari primarie. Sono stati stabiliti diversi protocolli per la coltura in vitro di cellule epiteliali primarie delle vie aeree umane (PBEC) ottenute da spazzolamenti bronchiali o biopsie.⁽⁵²⁾

L'uso di PBEC differenziate in grado di riprodurre un modello di tessuto epiteliale polmonare più fedele alla fisiologia delle vie aeree in vivo. Sono state sviluppate quindi diverse tecniche per realizzare questo tipo di colture tridimensionali basate sull'utilizzo di PBEC. Tra queste vi sono scaffold a matrice cellulare, colture a goccia sospesa, e colture di interfaccia aria-liquido (ALI) che partono dal modello Transwell per eseguire indagini più funzionali soprattutto per tessuti con caratteristiche di barriera, consentendo di valutare l'architettura cellulare, l'adesione, la motilità e l'invasione. I sistemi Transwell infatti sono costituiti da una camera apicale e una basolaterale divise da una membrana di poliestere microporosa. Questa configurazione permette di ricreare la condizione fisiologica dell'interfaccia aria-liquido (ALI), che induce la formazione di uno strato di cellula epiteliale polarizzata. ⁽⁵²⁾

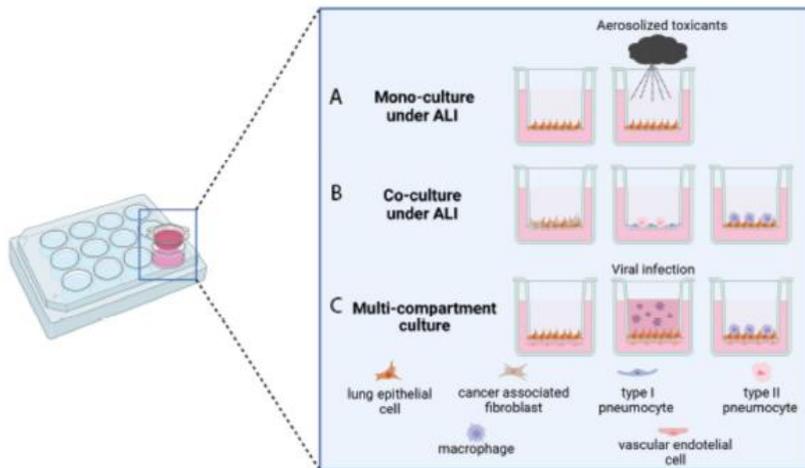


Fig. 17 Rappresentazione schematica del sistema di coltura cellulare Transwell utilizzato per i modelli in vitro polmonari (da BioRender.com)

Il primo problema del modello Transwell è correlato all'incapacità di ricreare l'ambiente dinamico sperimentato dalle cellule nel tessuto in vivo, che può comportare cambiamenti nel comportamento cellulare specifico e nelle proprietà di barriera. Inoltre, negli inserti Transwell, le cellule vengono coltivate su membrane 2D in poliestere (PET) o policarbonato che non imitano le proprietà dell'ECM nativa e la complessità dell'architettura 3D del tessuto polmonare⁽⁷⁸⁾

Una limitazione significativa di molti modelli di colture cellulari in vitro è che studiano le risposte solo da un tipo di cellula isolato mentre in vivo l'interazione tra molti tipi cellulari diversi è cruciale per l'omeostasi cellulare. Al fine di affrontare queste complesse interazioni in modelli sperimentali, sono attualmente stati investiti notevoli sforzi nello sviluppo di modelli di co-cultura e costrutti di tessuti tridimensionali che integrano cellule e componenti della matrice extracellulare per imitare più da vicino lo stato in vivo .⁽⁵²⁾

Nel tentativo di ricreare un microambiente dinamico, i sistemi basati su bioreattori sono stati proposti come approcci promettenti per la creazione di un modello attendibile del tessuto polmonare. I bioreattori sono sistemi che supportano la coltura di cellule in un ambiente altamente controllato, consentendo di regolare e monitorare il trasporto di gas, nutrienti e rifiuti. ⁽⁷⁹⁾

Tra i diversi tipi di bioreattori disponibili, esiste un sistema a camera compartimentale che permette di simulare la configurazione in vivo della parete alveolare, mostrando diverse camere separate da inserti su cui vengono seminate le cellule.⁽⁷⁹⁾

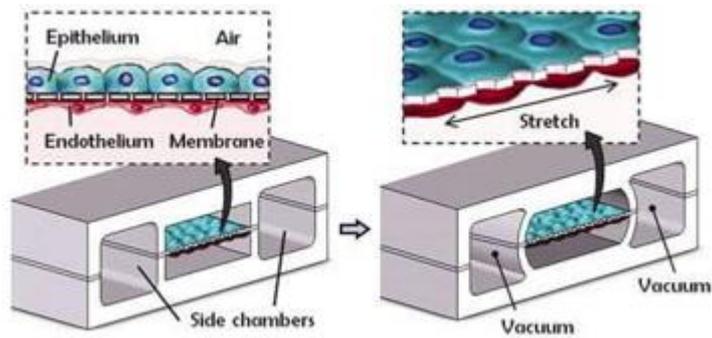
I sistemi di bioreattori che ospitano inserti transwell sono stati anche sfruttati per simulare l'esposizione mediata dal flusso a nanoparticelle o polline, dimostrando che i modelli dinamici in vitro possono essere più predittivi della risposta delle cellule polmonari rispetto ai modelli statici tradizionali.⁽⁷⁹⁾

Attualmente il modello epiteliale polmonare più avanzato è il cosiddetto modello "lung-on-a-chip", un dispositivo con cellule epiteliali alveolari sul lato apicale di una membrana porosa e cellule endoteliali sul lato basolaterale della stessa. In questo modello, le cellule ricevono nutrimento tramite flusso microfluidico che consente anche l'aggiunta di cellule immunitarie al modello.⁽⁵²⁾

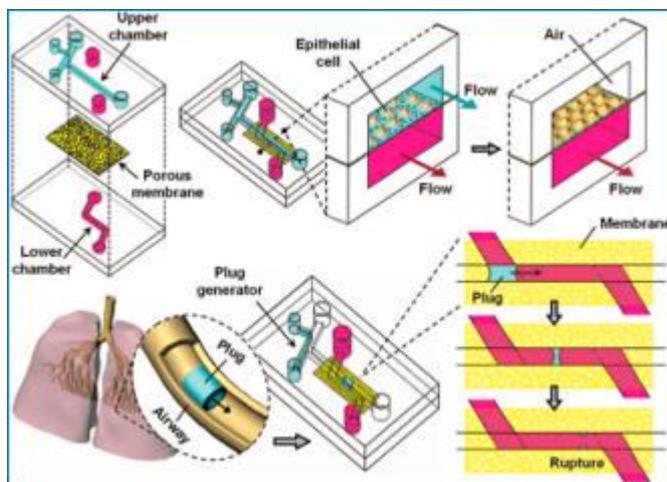
Le nuove sfide per il futuro mirano quindi a sviluppare modelli in vitro ingegnerizzati innovativi che ricreano in modo più accurato le proprietà del tessuto parenchimale polmonare sano e patologico, incluse le funzioni della matrice extracellulare.⁽⁸⁰⁾

Il principio delle strategie di ingegneria tissutale è quello di combinare cellule, materiali e segnali bioattivi al fine di ottenere strutture biomimetiche che ricapitolano le proprietà dei tessuti in vivo come scaffold polimerici e idrogel che vengono impiegati come supporti per colture cellulari, consentendo di ricreare la struttura, la composizione chimica e le proprietà meccaniche della matrice extracellulare in vivo.⁽⁸⁰⁾

A.



B.



C.

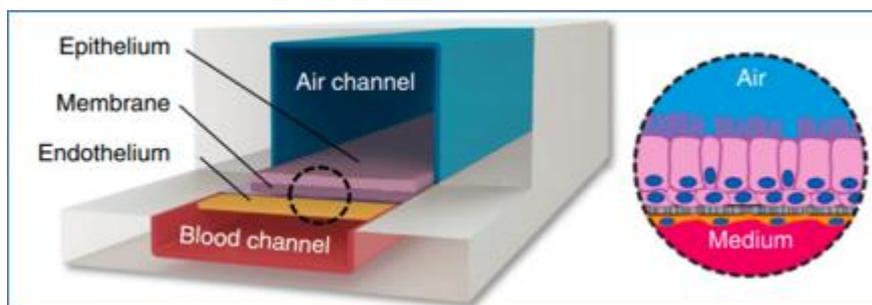


Fig 18. Modelli di lung on a chip. (<https://www.elflow.com/microfluidic-reviews/organs-on-chip-3d-cell-culture/lung-on-a-chip-history-origins-development/>). (A) Dispositivo “lung on a chip” meccanicamente attivo (71) . (B) Modello di lung on a chip dotato di tappo liquido. (72) (C) Modello “Small Airway lung-on-a-chip” , che utilizza cellule epiteliali bronchiolari seminate su una membrana

microporosa nel "canale dell'aria", sul lato opposto a uno strato di cellule endoteliali nel "canale del flusso sanguigno. (73)

2.3 Il Modello EpiAirway

Tra i modelli in vitro commerciali fisiologicamente rilevanti ci sono i tessuti 3D basati su colture di cellule epiteliali primarie delle vie aeree umane con lo scopo di migliorare la rappresentazione dell'assorbimento di sostanze endogene ed esogene a livello polmonare. EpiAirway™ (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA) è un modello di tessuto muco ciliare 3D costituito da cellule epiteliali tracheali/bronchiali normali di derivazione umana.

Questo modello cellulare si presenta con un aspetto pseudostratificato; inoltre, grazie alla coltura in interfaccia Aria-Liquido (ALI) e alla presenza di più tipi e strutture cellulari come ad esempio le cellule caliciformi che producono muco, le cellule ciliate e le giunzioni strette consente di avere una rappresentazione più attendibile della struttura dell'epitelio polmonare in vivo.

È stato infatti riportato come questo modello cellulare sia stato in grado di riprodurre più fedelmente l'epitelio polmonare rispetto alle linee cellulari immortalizzate convenzionali (35)

EpiAirway™ quindi, per le caratteristiche elencate sopra, è in grado di simulare le risposte della barriera muco ciliare osservate a seguito di infezioni, esposizione ad agenti tossici e successivo innesco di processi infiammatori. (25)

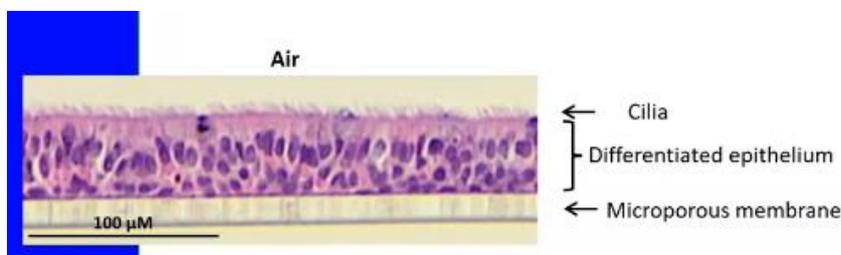


Fig. 19 Modello di tessuto respiratorio mucociliare 3D Struttura EpiAirway™

L'inserto è la caratteristica principale dell'intera struttura EpiAirway™. È costituito da una membrana microporosa, sul lato apicale di questa viene allestita la coltura del tessuto; il terreno di coltura viene aggiunto al lato basolaterale in modo che permi fino al tessuto tramite la

membrana e simili la condizione di esposizione all'aria che avviene sul lato apicale delle cellule in vivo. (25)

I vantaggi che offre EpiAirway™ sono molteplici, tra di questi ad esempio l'utilizzo di un modello in cui sono presenti strutture differenziate come un'epitelio mucociliare, che mima l'ambiente in vivo in modo più efficiente rispetto alle cellule immortalizzate. Un altro vantaggio è rappresentato dalla possibilità di avere una varietà di background di donatori diversi, quindi ottenere cellule dell'epitelio polmonare da individui sani, fumatori o da individui con patologie respiratorie come l'asma e Broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO). Il fatto di poter sfruttare le proprietà e le caratteristiche di barriera del tessuto, con l'aggiunta cellule cigliate e muco consente di studiare la variabilità individuale di molte malattie respiratorie umane.

Un aspetto rilevante da considerare è che EpiAirway™ consente di non avere problemi etici legati alla sperimentazione animale, questo vantaggio è direttamente correlato alla possibilità di avere dei risultati che sono altamente riproducibili nonché di evitare l'estrapolazione interspecie che si presenta nel momento in cui si utilizzano cellule di derivazione animale.

Le applicazioni di questo modello tracheo-bronchiale possono essere diverse, tra questi vi sono studi di tossicità in senso generale, che è anche il settore per cui EpiAirway™ è più utilizzato vista la numerosità di sostanze tossiche che possono ledere la funzionalità del pathway respiratorio.

EpiAirway™ è impiegato anche in studi riguardanti infezioni virali e batteriche, come ad esempio nel lavoro di Ren e Daines (41) dove è stato utilizzato per la caratterizzazione delle interazioni ospite-patogeno a lungo termine con *Haemophilus influenzae* non tipizzabile (NTHi); si tratta di un batterio gram-negativo adattato all'uomo che può causare infezioni ricorrenti e croniche della mucosa respiratoria; l'obiettivo di questo studio infatti è stato eseguire la co-coltura a lungo termine dei tessuti EpiAirway con NTHi e quantificare i batteri associati alle cellule e interiorizzati nel tempo.

Scopo della ricerca

Gli esperimenti descritti nel corso di questa tesi sono stati condotti con lo scopo di evidenziare gli effetti della citotossicità sull'epitelio polmonare nel modello EpiAirway™ di MatTek di evidenziare come le due fibre asbesto di Crisotilo Russo, contrariamente a quanto sostenuto in questi studi di coorte ^{(55) (56) (57)} abbiano degli effetti dannosi sulla salute umana.

Le informazioni riguardanti l'evidenza della tossicità del Crisotilo Russo sono poche e discordanti, in questo lavoro di Gino Rubini ⁽⁵⁸⁾ i ricercatori di IARC mostrano come l'incidenza della mortalità per cancro ai polmoni, spesso causata dall'esposizione all'amianto, è del 30% più alta nella cittadina russa di Asbest nella quale l'estrazione, la lavorazione e la vendita della fibra di amianto crisotilo contribuivano significativamente all'economia locale rispetto ad altre regioni russe.

Nonostante i dati mostrino una tossicità significativa si continua a negare il fatto che l'esposizione al crisotilo possa essere mortale, affermando che non è possibile impedire l'esposizione ai cittadini e ai lavoratori al crisotilo, ampiamente utilizzato nei materiali da costruzione e in oggetti di uso comune.

Proprio alla luce di questo per supportare l'evidenza scientifica gli effetti nocivi delle fibre di Crisotilo Russo sono stati analizzati in questa tesi in termini di vitalità, citochine pro-infiammatorie e danno genotossico.

Sezione Sperimentale

Capitolo 1 - Materiali e Metodi

1.1 Preparazione delle fibre

Negli esperimenti condotti e descritti in questa tesi è stata utilizzata:

- Crocidolite standard UICC (CRO),
- Crisotilo Russo in due diverse lunghezze $< 5 \mu\text{m}$ [CHR-S] e $> 5 \mu\text{m}$ [CHR-L].

Le fibre utilizzate in questo studio sono state gentilmente fornite dal gruppo di ricerca coordinato dal professor Alessandro F. Gualtieri dell'Università di Modena e Reggio Emilia.

Le fibre di Crisotilo Russo sono state sottoposte a macinatura con Retsch mixer mill MM 400 (RETSCH GmbH Retsch-Allee 1-5 42781 Haan Germany) per alcuni minuti in modo da ottenere il campione tritato a due diverse dimensioni ($< 5 \mu\text{m}$ e $> 5 \mu\text{m}$), infine valutato tramite analisi granulometrica.

La soluzione sperimentale è stata preparata sospendendo 10 mg di fibre (CRO, CHR-S, CHR-L) in 2 ml di PBS, (Phosphate Buffered Saline, Sigma Aldrich S.r.l., Germania). Dopo averla sottoposta a sonicazione per 5 minuti in ghiaccio. La soluzione stock è stata conservata a -20°C .

Il giorno preposto alla sperimentazione la soluzione di fibre è stata scongelata, vortexata e successivamente diluita in acqua MilliQ prima di iniziare i trattamenti.

I tessuti EpiAirwayTM posti in piastre da 24 pozzetti sono stati ricostituiti nel mezzo specifico di coltura EpiAirway con 1 ml di terreno per ciascun tessuto e incubati (37°C e $5\% \text{CO}_2$) in ALI, ovvero con il terreno di coltura cellulare aggiunto sul lato basolaterale della membrana microporosa e il lato apicale lasciato esposto all'aria.

Air-Liquid Interface (ALI) Culture Platform

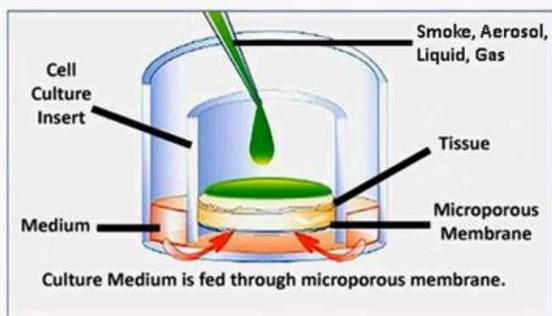


Fig. 1 Coltura del tessuto in interfaccia Aria Liquido (ALI)

Successivamente all'incubazione overnight, la superficie apicale dei modelli EpiAirway™ è stata sottoposta a 3 lavaggi con DPBS (Dulbecco Phosphate Buffered Saline, 0,4 ml per pozzetto). Dopo avere rimosso la soluzione salina i tessuti sono stati posti in una piastra da 24 pozzetti dotata di un particolare piano superiore rialzato in cui erano presenti gli inserti che permettesse l'aggiunta di 5 ml di terreno sul lato basolaterale.

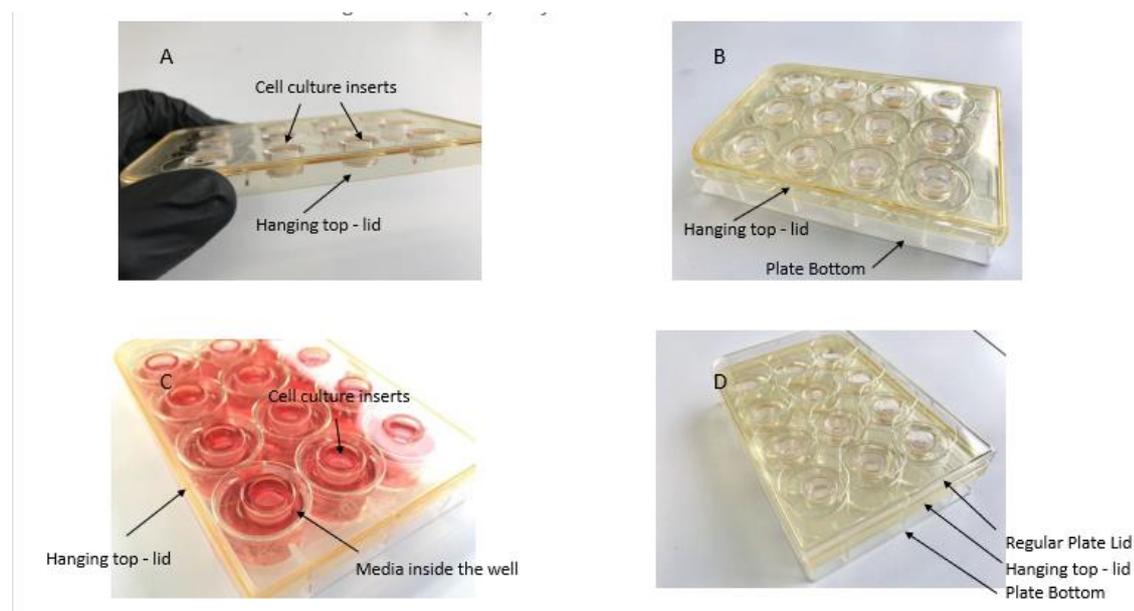


Fig. 2 (A) Insert per colture cellulari inserito all'interno della piastra rialzata, (B) Piastra rialzata con gli inserti posizionata sopra il fondo di una piastra comune. (C) Piastra rialzata posizionata sul fondo della piastra contenente il terreno di coltura (D) Piastra Hanging top con 12 pozzetti (HNG-TOP-12) completamente assemblata.

Quindi sulla superficie apicale è stata aggiunta la soluzione sperimentale (100 µl/pozzetto) contenente le fibre CRO, CHR-S e CHR-L diluite a una concentrazione di 100 e 200 µg/ml. I trattamenti sperimentali sono stati condotti per 24 e/o 48 h in base all'analisi prevista.

Gli effetti biologici delle fibre di amianto sul modello EpiAirway™ sono state analizzate con la valutazione degli indici di tossicità cellulare (Test MTT) del potenziale pro-infiammatorio (livelli genici e proteici di citochine pro-infiammatorie) e di marker di genotossicità tramite analisi della proteina istonica H2AX

1.2 Test di vitalità (MTT)

Con lo scopo di evidenziare gli effetti citotossici del Crisotilo Russo abbiamo analizzato la vitalità delle cellule tramite saggio MTT esposte ai trattamenti con le fibre CRO, CHR-S e CHR-L per 24 e 48 h. ⁽⁵⁴⁾

La riduzione del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (comunemente indicato con la sigla MTT) è uno dei metodi più frequentemente utilizzati per misurare la capacità riducente della succinato deidrogenasi, indicativa della vitalità cellulare.

Questo test è stato eseguito seguendo il protocollo per il test di tossicità sul tessuto fornito dalla stessa azienda produttrice.

Dopo aver preparato la soluzione delle fibre CRO, CHR-S, CHR-L a concentrazione di 100 e 200 µg/ml abbiamo proceduto esponendo i tessuti ai trattamenti per 24 e 48 h e successivamente posti in incubatore.

Il saggio colorimetrico è stato quindi utilizzato al fine di valutare la citotossicità a seguito dell'esposizione alle fibre di asbesto.

Al termine del trattamento i tessuti sono stati rimossi dall'incubatore e la soluzione contenente le fibre è stata aspirata. Quindi i tessuti sono stati lavati tre volte immergendoli in DPBS. Nel frattempo, 300 µL del reagente MTT sono stati aggiunti in ciascun pozzetto in una nuova piastra da 24 pozzetti e i tessuti EpiAirway sono stati posti nei pozzetti contenenti il reagente MTT preriscaldato. Quindi sono stati incubati a 37°C e 5% CO₂ per 1 h e 30 min.

Passato questo periodo, ciascun insert di tessuto è stato rimosso dalla soluzione MTT, asciugato su un tovagliolo di carta e immerso in 2 ml di soluzione estraente (isopropanolo) in modo da sciogliere il sale di formazano viola, successivamente è stato posto su uno shaker a temperatura ambiente per due ore al buio.

Successivamente al periodo di estrazione, gli inserti con il tessuto sono stati rimossi e la soluzione con i sali di formazano disciolti è stata miscelata e trasferita in una piastra da 96 pozzetti. La densità ottica del formazano estratto è stata determinata tramite spettrofotometro a 570 nm utilizzando isopropanolo come controllo negativo.

1.3 Analisi delle citochine pro-infiammatorie

Al fine di dimostrare il potenziale infiammatorio quindi la capacità delle fibre di indurre un danno nelle cellule innescando l'infiammazione abbiamo proceduto analizzando l'espressione delle citochine pro-infiammatorie e il loro rilascio da parte delle cellule esposte alle fibre. (53)

Come controllo positivo della risposta infiammatoria alcuni campioni sono stati in parallelo esposti a lipopolisaccaride (LPS, 5 µg/ml), Si sono analizzati i profili genici e proteici delle citochine pro-infiammatorie IL-1β, TNF- α, IL-6 e IL-8 mediante tecnica RT-qPCR e Milliplex, rispettivamente dopo 24 e 48 h di esposizione alle fibre in oggetto. E' stata analizzata in termini quantitativi l'espressione genica di IL-1β, TNF- α, IL-6 e IL-8.

Dopo aver preparato le soluzioni contenenti le fibre (CRO, CHR-S, CHR-L) a concentrazione 100 µg/ml abbiamo sottoposto i tessuti al trattamento. Successivamente si è proceduto lisando i tessuti di EpiAirway con il LBP lysis buffer RNA plus (Macherey- Nagel- Thermo Fisher Scientific). L'RNA totale è stato estratto utilizzando il RNeasy Micro Kit (Qiagen S.r.l., Milano, Italia) secondo le indicazioni del produttore.

La qualità e la quantità dell'RNA sono state analizzate utilizzando uno spettrofotometro NanoDrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) e quindi il cDNA (150 ng per campione) è stato sintetizzato utilizzando il sistema di sintesi del primo filamento SuperScriptTMIII (Thermo Fisher Scientific).

I profili delle citochine pro-infiammatorie , IL-1β, TNF-α, IL-6 e IL-8 rilasciate nel mezzo di coltura tramite dosaggio con tecnica MILLIPLEX® Map.

Dopo aver preparato le soluzioni contenenti le fibre diluite (CRO, CHR-S,CHR-L) a concentrazione 100 µg/ml, i tessuti sono stati quindi trattati per 24 e 48 h, successivamente sono stati raccolti i terreni di coltura, centrifugati a 2000 RPM per 10 min e conservati a -20°C. Successivamente abbiamo proceduto all'analisi tramite il kit Milliplex® MAP(Merck KGaA).

Questo kit consente di analizzare contemporaneamente i biomarcatori multipli con dosaggi multiplex su sfere magnetiche su cui è associato un anticorpo specifico per l'analita da quantificare. Le microsfele sono coniugate a 2 fluorocromi (streptavidina-ficoeritrina) in

concentrazioni diverse, tali da determinare fino a 100 diverse regioni e quindi ad altrettanti analiti nello stesso campione. In breve, i surnatanti sono stati raccolti al termine di ogni procedura sperimentale e conservati a -20°C fino al momento dell'uso. I livelli di IL-1 β , IL-8, IL-6 e TNF α sono stati analizzati in doppio nei campioni sottoposti ai trattamenti sperimentali per 24 e 48 h. Il metodo è stato eseguito secondo le istruzioni del produttore e le letture della fluorescenza delle microsfere sono state effettuate con Luminex® 200™ (Merck KGaA), uno strumento, che sfrutta lo stesso principio del citofluorimetro per rilevare reazioni che avvengono sulla superficie di microsfere fluorescenti.

1.4 Analisi della proteina istonica H2AX

La risposta ad un danno del DNA può manifestarsi a seguito di una varietà di segnali di stress endogeni o esogeni. Come conseguenza possono essere generate rotture a doppio filamento (DSB) che provocano rapidamente la fosforilazione della variante dell'istone H2A, cioè H2AX.

Poiché la fosforilazione di H2AX nella sua Serina in posizione 139 (γ -H2AX) è abbondante, veloce e si correla bene con ciascun DSB, questo è il marcatore più sensibile che può essere utilizzato per esaminare il danno al DNA prodotto e la successiva riparazione della lesione del DNA. (50)

Il western blot o immunoblot è una tecnica biochimica che permette l'identificazione di una determinata proteina all'interno di una miscela proteica, mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. L'utilizzo di questo saggio ci ha permesso di analizzare la fosforilazione della proteina istonica H2AX. I campioni cellulari utilizzati sono stati esposti alle soluzioni contenenti 100 μ g/ml di fibre per 24 h e successivamente lisati e raccolti utilizzando una soluzione di tampone RIPA (Sigma Aldrich S.r.l., Germania), in cui è stato diluito un cocktail di inibitori di proteasi 1:25 (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim Germania) con l'aiuto di uno scraper. Quindi sono stati sonicati per ottimizzare l'estrazione. Successivamente alla quantificazione dei campioni proteici mediante dosaggio Quantum Protein (Bicinchoninic Protein Assay Kit) sono stati caricati 30 μ g di proteine in mini gel prefabbricato (Ani KDTM, Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) in SDS-PAGE, trasferiti su membrana di polivinilidenefluoruro (PVDF, Thermo Scientific, Rockford, USA) sondati con anticorpi primari di coniglio (H2AX, Abcam, Cambridge, UK) e topo (anti-phospho-H2AX, Abcam, Cambridge, UK) seguito da incubazione con una soluzione contenete i rispettivi anticorpi secondari HRP (A9340V e A931V, contro anticorpi primario di coniglio e di topo, (Abcam, Cambridge, UK). Ciò ha permesso di ottenere il rapporto tra γ -H2AX/H2AX come espressione del danno genotossico prodotto dalle fibre. Le proteine sono state rilevate da Western Bright ECL (Advansta, CA, USA), esposto a pellicola ed analizzato con software BIORAD Geldoc 2000. I dati presentati sono stati calcolati dopo la normalizzazione con GAPDH. I dati metrici di densità delle bande sono state ottenute grazie al software Quantity One (Bio-Rad, Hercules, California, Stati Uniti) il quale ha permesso di effettuare un' analisi statistica.

Capitolo 2 : Risultati

2.1 Test di vitalità MTT

Dopo il trattamento dei tessuti EpiAirway™ con le fibre CRO, CHR-S e CHR-L (100 e 200 µg /ml) per 24 e 48 h è stato valutato l'indice di vitalità tramite test MTT.

La vitalità dei campioni trattati è diminuita significativamente rispetto ai tessuti di controllo con ogni tipo di fibra a tutte le concentrazioni dopo 24 h.

Infatti dopo 24 h i tessuti trattati con CHR-S e CHR-L con 100 e 200 µg, /ml hanno mostrato una riduzione significativa della vitalità cellulare. Il CHR-S a concentrazione di 100 µg/ml provoca un effetto dannoso maggiore dopo 24 h rispetto al CHR-L e alla CRO a entrambe le concentrazioni utilizzate.

Dopo 48 h la vitalità delle cellule trattate con CRO è ulteriormente scesa rispetto al primo time point, mentre la risposta ai trattamenti con entrambi i CHR è rimasta invariata nel tempo.

La vitalità dei tessuti dopo l'esposizione a 200 µg /ml CHR-L a concentrazione è aumentata in modo significativo.

Le cellule esposte a CHR-L a 100 µg /ml hanno subito un incremento della morte cellulare.

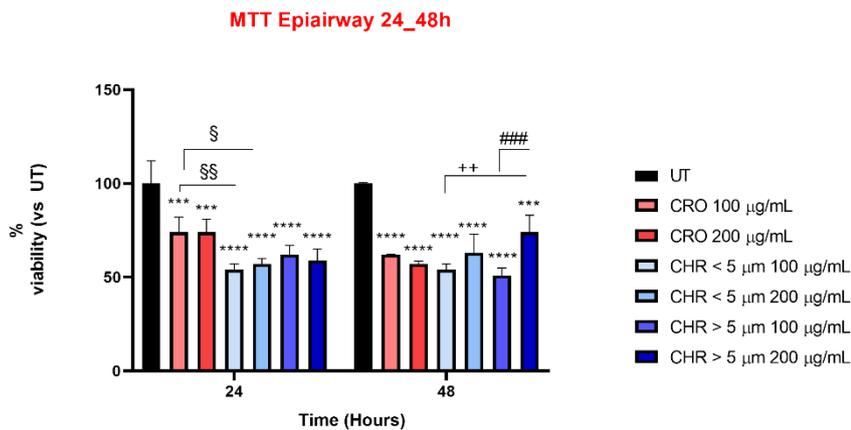


Fig. 3 Indice di vitalità estrapolato con MTT assay. L'assorbanza è stata misurata tramite spettrofotometro e la vitalità cellulare è stata calcolata come % rispetto ai valori dei campioni tissutali di controllo- non trattati (UT 100%). ***p<0.001, ****p<0.0001 vs UT §p<0.05, §§p<0.001 vs campioni trattati ++ p<0.001, ###p<0.001 vs campioni trattati

2.2 Analisi dei livelli genici e proteici delle citochine pro-infiammatorie

Per valutare l'innesco della cascata infiammatoria è stata analizzata l'espressione genica di alcune citochine proinfiammatorie quali IL-1β, TNF- α, IL-6 e IL-8.

Dopo le prime 24 h di trattamento CHR-S ha stimolato l'espressione genica di IL-1β rispetto alle cellule non trattate. L'esposizione con CHR-L ha fatto registrare valori simili a quella della CRO. Dopo 48 h si nota un decremento generale dell'espressione genica a seguito dell'esposizione con tutti gli stimoli.

Il TNF- α non fa registrare livelli di espressione genica significativi rispetto alle cellule non trattate sia dopo 24 che dopo 48 h di esposizione.

Per quanto concerne l' IL-6 dopo 24 h si evidenzia un aumento dell'espressione genica con CHR-S e CHR-L paragonabile a quello prodotto da CRO e LPS. Dopo 48 h si nota un aumento lineare dell'espressione genica di IL-6 da parte delle cellule esposte a CHR-S mentre con gli altri trattamenti i livelli restano pressochè simili.

Riguardo infine all'espressione di IL-8 nelle cellule esposte alle fibre per 24 h si nota un aumento significativo dell'espressione di questa citochina nei trattamenti con tutti e tre i tipi di fibra e anche con LPS, che fa registrare il valore più alto. Dopo 48 h tutti i livelli di espressione genica si abbassano ai livelli delle cellule non trattate.

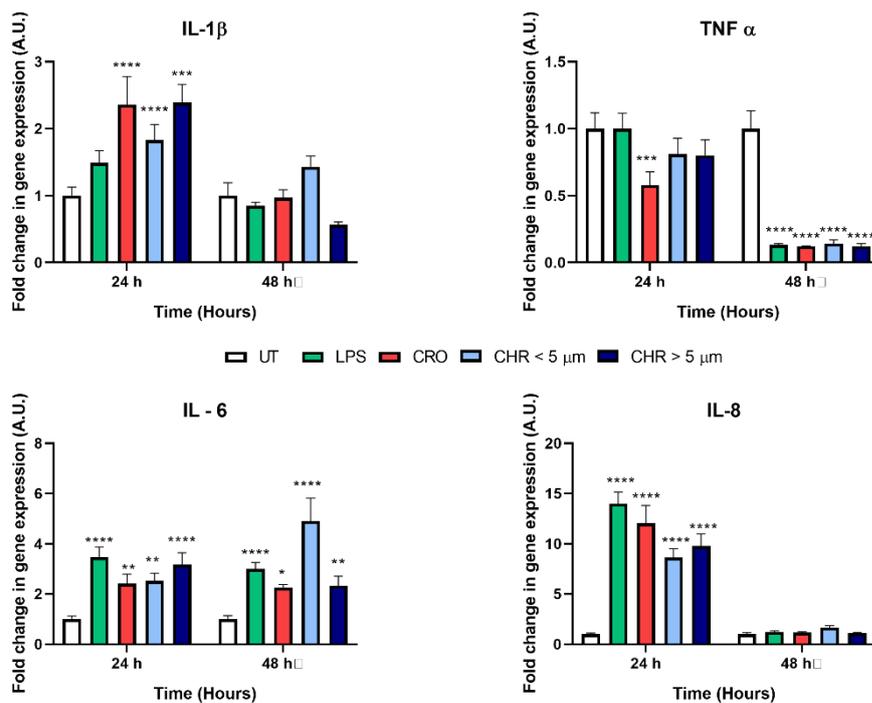


Fig. 4 Livelli genici delle citochine pro-infiammatorie analizzate con la tecnica RT-qPCR. I valori sono stati normalizzati con il gene housekeeping HPRT-1 ed espressi come aumento del ripiegamento dell'mRNA comparato con le cellule non trattate (UT). *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs. UT

Attraverso il saggio Milliplex è stato valutato il rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , TNF- α , IL-6,IL-8) nel mezzo di coltura dopo i trattamenti di 24 e 48 h con CRO, CHR-S, CHR-L(100 μ g /ml).

Dopo le prime 24 h si evidenzia un aumento significativo del rilascio di IL-1 β nel mezzo di coltura a seguito dell'esposizione con tutte le fibre e anche con LPS, che fa registrare il valore più basso rispetto al tessuto non trattato.

Dopo 48 h si evidenzia un incremento lineare del rilascio per quanto con tutte le fibre, mentre per quanto concerne l'LPS si misura una riduzione del rilascio ai livelli basali.

Relativamente a TNF- α , dopo 24 h, si nota un maggiore rilascio della citochina a seguito dell'esposizione con CHR-S rispetto agli altri trattamenti. Il CHR-L ha fatto registrare valori di rilascio poco significativi rispetto al controllo negativo e LPS. A 48 h si nota un aumento lineare del rilascio di TNF- α con CHR-S rispetto ai tessuti non trattati e quelli trattati con LPS. Il rilascio da parte delle cellule di questa citochina in risposta al trattamento con CHR-L non è stata significativa paragonata al controllo negativo e LPS.

Si nota come CRO abbia causato un aumento significativo della secrezione di TNF- α dopo 48 h rispetto alle cellule non trattate con le fibre e LPS, che fa registrare valori simili nel rilascio di citochina a quelli del tessuto non trattato.

Osservando l' IL-6 dopo 24 h la risposta delle cellule in termini di rilascio di questa citochina nel terreno di coltura non è stata significativa paragonata al controllo negativo. A 48 h si evidenzia un aumento significativo del rilascio della citochina solo dopo il trattamento con CHR-S.

Infine, in riferimento all' IL-8 dopo 24 h si nota un significativo rilascio della citochina evidente con tutti i trattamenti rispetto alle cellule non trattate. Al secondo time point si assiste ad un incremento lineare della liberazione della citochina con CHR-S, CRO e CHR-L.

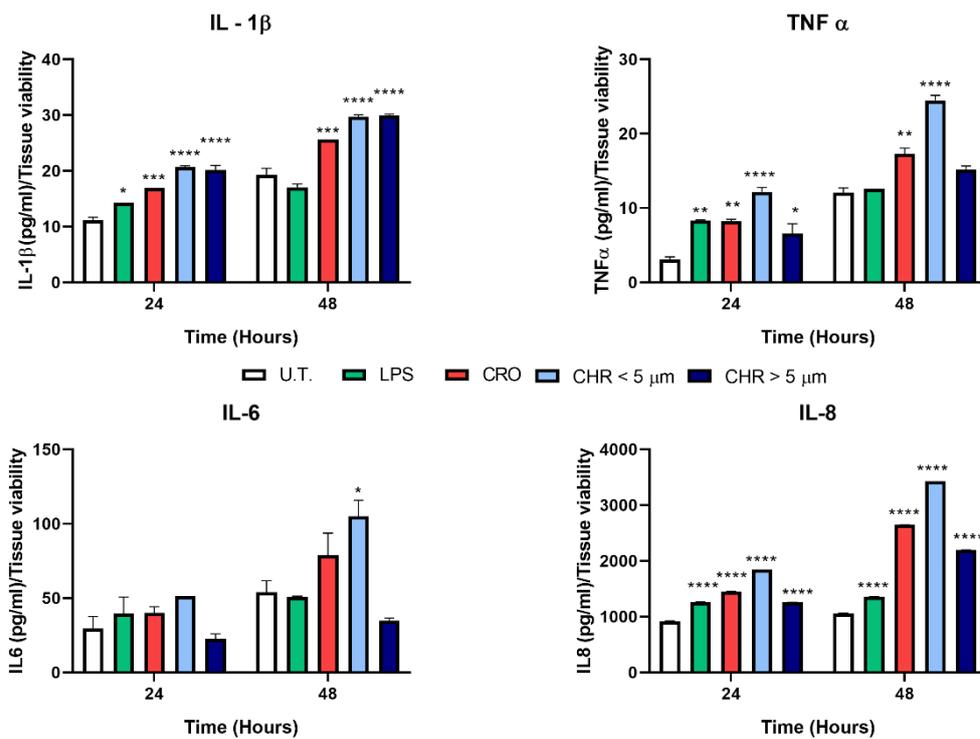


Fig. 5 Livelli proteici delle citochine IL-1 β , IL-6, TNF α e IL-8 rilasciate nel terreno sperimentale. L'analisi è stata misurata tramite Milliplex map dopo 24 e 48 h. I valori dei livelli di citochine sono stati ottenuti con Luminex ed espressi in pg/ml e sono stati determinati sulla base dei valori dell'indice di vitalità cellulare (MTT). *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001 vs UT

2.3 Valutazione del danno genotossico tramite analisi della proteina H2AX

Tramite la tecnica Western Blot siamo andati a osservare l'avvenuta fosforilazione della proteina istonica H2AX nei trattamenti con le fibre CRO, CHR-S, CHR-L (100 µg/ml) dopo 24 h per valutare l'eventuale danno a carico del DNA.

Dopo il trattamento con le fibre si osserva un aumento del segnale della proteina istonica fosforilata (γH2AX) solo nei campioni trattati con CHR-L.

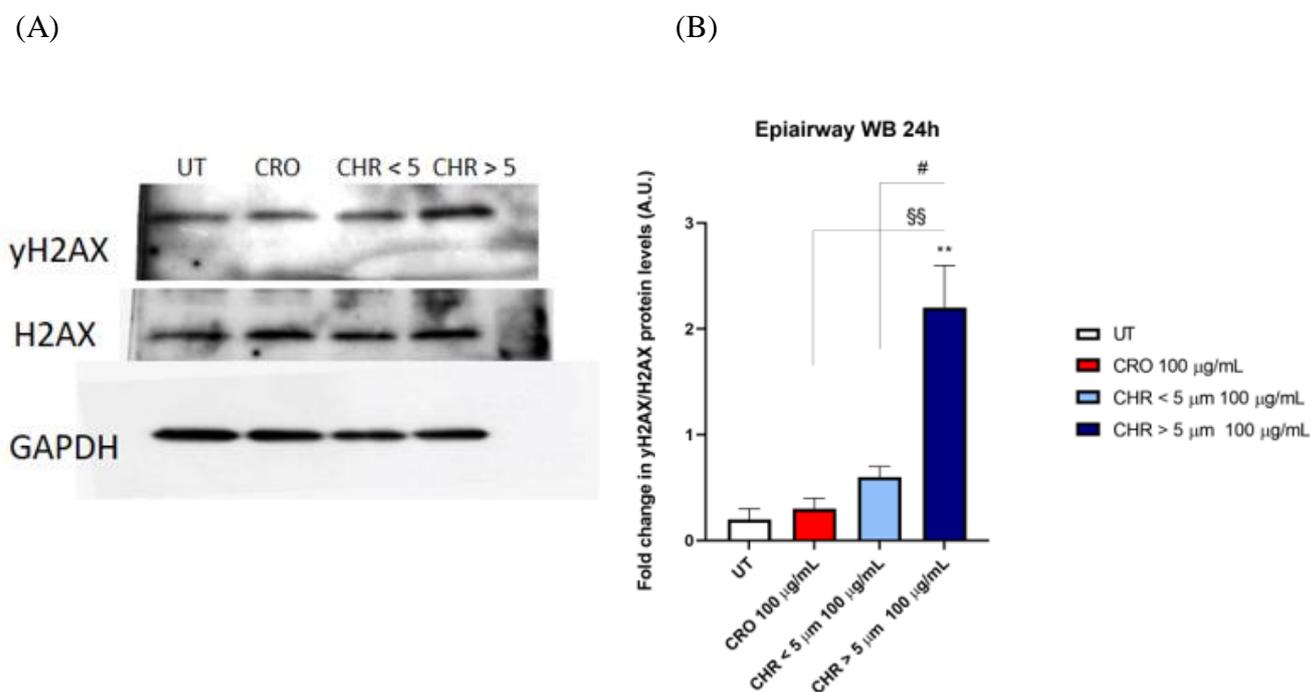


Fig. 6 Danno genotossico indotto dalle fibre nei tessuti EpiAirway. (A) Immagine rappresentativa di almeno 3 analisi simili di immunoblot dei livelli delle proteine H2AX , γ-H2AX (phospho-Ser 139) nei tessuti non trattati e trattati con le fibre CRO, CHR-S e CHR-L (mean ± SD; n=3) (B) Il grafico mostra il rapporto γ-H2AX /H2AX ed è espresso in unità arbitrarie Vs tessuti non trattati. **p<0.001 vs UT; §§p<0.001, #p<0.05 vs treated cells

Capitolo 3 : Discussione

Nel laboratorio di Analisi Ricerca di Fisiopatologia (LARF) del DIMES ho collaborato all'osservazione degli effetti citotossici e pro – infiammatori della fibra di Crisotilo Russo a due diverse lunghezze ($< 5 \mu\text{m}$ CHR-S e $>5 \mu\text{m}$ CHR-L) utilizzando la fibra di Crocidolite come controllo positivo di innesco del danno polmonare. Inoltre è stata effettuata una valutazione del danno genotossico tramite analisi della proteina istonica H2AX.

Partendo dalle analisi di citotossicità il test colorimetrico MTT ha mostrato una riduzione significativa della vitalità dei tessuti con tutte le fibre minerali sia a 24 che 48 h rispetto ai tessuti non trattati; in particolar modo è interessante notare che, dopo 24 h, sia CHR-S che CHR-L hanno indotto un effetto citotossico maggiore rispetto ai tessuti trattati con CRO.

La citotossicità delle fibre è legata a molti fattori correlati alle caratteristiche chimico-fisiche delle stesse che influenzano la manifestazione del danno, tra queste in particolare ci sono la bio-persistenza e la bio-durabilità. La prima è definita come la capacità delle fibre di resistere ad agenti chimici, fisici e altri meccanismi di clearance fisiologici messi in atto da un individuo per eliminare la sostanza. La bio-durabilità è invece la capacità della sostanza di resistere alle alterazioni chimiche e biochimiche alle quali viene sottoposta dall'organismo in cui si trova, costituendo di fatto un fattore dal quale dipende la bio-persistenza stessa.

In generale, data la bassa bio-durabilità del CHR, l'aumento della sua tossicità nelle cellule dopo il trattamento di 24 h potrebbe essere esplicativo di un effetto infiammatorio più rapido rispetto alla CRO, infatti l'esposizione al serpentino (in particolare CHR-S a concentrazione $100 \mu\text{g/ml}$) mostra un effetto citotossico maggiore rispetto ai trattamenti con CRO. Da notare che quando l'esposizione viene prolungata a 48 h gli effetti che CHR-S e CHR-L hanno sulla vitalità cellulare sono equiparabili a quelli indotti da CRO, la quale è nota per provocare, con il progredire dell'esposizione al trattamento, uno stato di infiammazione cronica legato alla

notevole bio-durabilità e bio-persistenza della fibra stessa nella cellula, che con il passare del tempo potrebbe condurre a sofferenza cellulare ed eventualmente alla cancerogenesi. (61)

Infatti, poco dopo l'inalazione delle fibre di amianto, le prime cellule che entrano in contatto con la CRO sono le cellule epiteliali che rivestono le vie aeree e gli alveoli; queste possono riscontrare un danno meccanico dato dall'interazione con la fibra (63). È stato dimostrato che queste lesioni si verificano nell'uomo attraverso meccanismi sia citolitici che non citolitici.

(64) Il conseguente aumento della permeabilità dell'epitelio dovuto ai danni meccanici della fibra può portare alla fibrosi attraverso un aumento del passaggio dei mediatori dell'infiammazione dagli alveoli nell'interstizio e causando così il collasso delle piccole vie aeree e dei dotti alveolari nel polmone, aumentando quindi il rischio di tumorigenesi.(65)

Muhle et al. (62), in uno studio condotto sul polmone di un modello animale (ratto) in cui veniva misurata la biodurabilità di fibre minerali mettono in evidenza come l'intervallo di tempo di eliminazione della fibra CRO dal polmone arrivi fino a più di 300 giorni.

È quindi dimostrato che CRO abbia un'evidente azione dannosa e citotossica, quello che è emerso dai risultati degli esperimenti da me condotti è che sia CHR-S che CHR-L abbiano manifestato effetti simili sui tessuti esposti ad essi, visto il decremento della vitalità cellulare dopo 48 h di trattamento con le suddette fibre.

Un altro aspetto da considerare, oltre al danno meccanico che le fibre di asbesto possono causare, è la dissoluzione delle stesse, ovvero il fatto che le fibre possano rilasciare nell'ambiente intra e/o extracellulare ioni metallici come Fe, Cr, Ni e Mn portando a stati di sofferenza cellulare ed eventualmente apoptosi. La tipologia di ioni liberati dipende dalla struttura chimica del tipo di fibra che viene considerata, dalle caratteristiche fisiche dell'ambiente in cui si trova la fibra come il pH, la temperatura, il mezzo di sospensione e la sua forza ionica e, infine, la disponibilità dei costituenti a formare complessi in seguito ad interazioni con le cellule(38).

Nonostante il CHR, come già sottolineato in questa tesi, abbia un tempo di dissoluzione e quindi di permanenza all'interno delle cellule inferiore (38), quindi presumibilmente un'azione cancerogena inferiore rispetto alla crocidolite ha mostrato di possedere comunque effetti citotossici simili nell'arco del secondo time point di esposizione, questo evidenzia la sua azione dannosa nei confronti della cellula.

Da questo si può arrivare a dedurre che sulla base della dissoluzione è possibile fornire un'indicazione dei livelli di tossicità a breve e lungo termine, importanti per valutare il grado di tossicità delle fibre (39).

Riguardo l'aspetto sopracitato, di Di Giuseppe et al. (43) fanno riferimento per la prima volta all'indice del potenziale di tossicità della fibra (FTPI): questo è stato usato per determinare quantitativamente la tossicità/patogenicità di alcuni tipi di fibre di asbesto, tra cui quella del Crisotilo Russo.

La tossicità di altri tipi di crisotili quali ad esempio quella del Crisotilo italiano di Balangero sono note (37), mentre quella del Crisotilo Russo è ancora in discussione; come già osservato, il crisotilo di Balangero risulta avere una percentuale maggiore di ferro ridotto (Fe II) rispetto al Crisotilo Russo e quindi potrebbe essere classificato come maggiormente tossico rispetto a questo (44). Di fatto il ferro (principalmente Fe II) sulla superficie delle fibre minerali favorisce la formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) e reattive specie azotate (RNS), con effetti citotossici e genotossici.

L'indice di tossicità potenziale delle fibre minerali non dipende però solo dal contenuto di Fe II, infatti nello stesso articolo viene evidenziato come in realtà il FTPI del Crisotilo Russo sia leggermente superiore a rispetto quello del crisotilo italiano e ad altre tipologie di crisotilo prese in considerazione nello studio, questo dovuto essenzialmente a differenze di parametri morfologici come l'area di superficie specifica e l'ampiezza media della fibra tra le varie tipologie di fibre.

Quindi il Crisotilo Russo potrebbe essere comunque considerato un potenziale pericolo per la salute, non solo a causa del rilascio di Fe II, bensì per la liberazione di altri ioni metallici durante il processo di dissoluzione che in certe quantità possono risultare potenzialmente tossici per la cellula e determinare effetti a breve termine.

Per quanto concerne l'analisi dell'espressione genica delle citochine pro-infiammatorie tramite RT-qPCR è risultato evidente come in tutti i trattamenti ci sia stato un aumento dei livelli delle citochine prese in considerazione a eccezione di TNF- α . Questo è indicativo del fatto che in generale, le fibre di Crisotilo Russo prese in analisi per quanto riguarda il potenziale infiammatorio stimolano l'espressione genica e la conseguente produzione di citochine pro-infiammatorie che vanno a sostenere la flogosi.

Per quanto concerne l'IL-1 β , si nota come il livello di espressione genica della citochina aumenti a seguito dei trattamenti con CHR-L (paragonabile alla crocidolite) nelle 24 h, mentre nel time point successivo subisce un decremento con CHR-L e CHR-S.

Come viene sottolineato da Ren e Torres ⁽⁶⁷⁾ l'IL-1 β è una citochina pro-infiammatoria implicata nel fenomeno infiammatorio e nelle condizioni autoimmuni. Esistono diversi tipi di strutture proteiche responsabili di innescare l'infiammazione come l'inflammasoma il quale svolge un ruolo cruciale nella tumorigenesi a causa delle sue proprietà immunomodulatorie, di differenziamento cellulare e di apoptosi.

Secondo Moossavi et al. ⁽⁶⁸⁾ una sovraespressione di IL-1 β causata dall'inflammasoma e quindi dal fenomeno infiammatorio, potrebbe condurre alla carcinogenesi. Quindi si potrebbe pensare che a seguito della sua interazione con il tessuto la fibra di Crisotilo Russo possa condurre all'attivazione di strutture come l'inflammasoma e quindi generi infiammazione risultando nell'aumento del livello di citochine come IL-1 β , e di conseguenza aumenti il rischio di tumorigenesi.

Relativamente all'analisi dell'espressione genica della citochina TNF- α , considerando le sue caratteristiche di pirogeno endogeno, di induttore di apoptosi nella cellul e cachessia, di agente inibente la carcinogenesi e la replicazione virale si potrebbe affermare che la diminuzione della sua espressione genica in relazione al prolungamento dei tempi di esposizione delle cellule (48 h) indichi un pericoloso incremento del rischio di cancerogenesi ⁽³⁰⁾. Un'altra caratteristica di TNF- α è quella di rispondere ad agenti lesivi attraverso la stimolazione della produzione cellulare di IL-1 e IL-6 ⁽³⁰⁾. Infatti in riferimento alla sua azione appena descritta si potrebbe pensare che sia in grado di indurre un incremento dell'IL-6 durante le 48 h.

Considerando la situazione dell'espressione genica delle citochine nel trattamento delle 48 h possiamo notare un decremento generale di queste a eccezione dell'IL-6, a indicare come, pur prolungando l'esposizione ad un agente dannoso come le fibre la sintesi di citochine pro-infiammatorie cali.

L'IL-6 è un'interleuchina che ha un'azione sia pro-infiammatoria che antinfiammatoria. Negli esperimenti eseguiti si è assistito a un incremento lineare della sua espressione nelle cellule trattate dopo 24 e 48 h in particolare con CHR-S.

Infatti l'IL-6 risulta avere anche un effetto inibitorio su TNF- α ed IL-1 β ⁽⁴⁵⁾, di cui vediamo diminuire l'espressione nel trattamento durato 48 h.

È interessante considerare anche la reazione delle cellule dopo l'esposizione alle fibre per quanto concerne l'aumento dell'espressione genica dell'IL-8. Questa infatti è una chemochina che ha un ruolo di mediatore della risposta immunitaria innata; infatti ha due funzioni principali: è capace di indurre chemiotassi delle cellule bersaglio, in primo luogo neutrofili ma anche altri granulociti, che in questo modo migrano verso il sito di infezione; la sua seconda funzione è quella di indurre la fagocitosi da parte degli stessi (33).

Quindi, vista la sua capacità di reclutamento di altre tipologie cellulari per contrastare l'infiammazione (66) un aumento dell'espressione genica di IL-8 potrebbe essere correlato con l'incremento di infiltrazione neutrofila che si osserva durante la flogosi nelle patologie infiammatorie post esposizione all'amianto.

Nell'analisi del rilascio delle stesse citochine pro-infiammatorie tramite tecnica Milliplex è si evidenzia come, i livelli delle citochine nel terreno sia aumentato dopo 48 h.

In particolare come si può notare l'analisi ha evidenziato un aumento della secrezione di $TNF\alpha$, IL-1 β e IL-8 nel mezzo tissutale dopo 24 e 48 h di esposizione ai due CHR e CRO.

Per quanto riguarda la presenza nel terreno dell'IL-6 si è evidenziato come dopo il trattamento di 48 h con CHR-S questa citochina venga rilasciata maggiormente dalle cellule rispetto al trattamento con CHR-L.

Se confrontiamo i risultati dei trattamenti con le fibre a quelli ottenuti con LPS vediamo un aumento del livello nel terreno di tutte le citochine analizzate dopo 48 h, in particolare con CHR-S, mentre per quanto concerne i trattamenti con LPS l'aumento del livello di tutte le citochine nei due time point è lineare.

Questo potrebbe indicare che, con il passare del tempo di esposizione alle fibre, le cellule vengano spinte a produrre citochine pro-infiammatorie a causa dell'instaurarsi di meccanismi infiammatori presumibilmente scatenati dallo stress ossidativo creatosi nelle prime ore di esposizione alla fibre a causa dalla liberazione di ioni metallici tossici dalle stesse e anche dai danni meccanici che le fibre inducono sulle cellule.

Vlahopoulos et. al (34) si sostiene che lo stress ossidativo possa provocare un aumento della secrezione di IL-8 nel tessuto, il quale a sua volta fa sì che il reclutamento di cellule infiammatorie provochi un ulteriore aumento di mediatori di stress ossidativo, il che la rende un indicatore utile di infiammazione localizzata.

Quindi si potrebbe suggerire che il contatto con le fibre induca nelle cellule una risposta accompagnata dalla produzione di una chemochina come l'IL-8 che stimola il richiamo dei protagonisti della risposta immune a seguito del presunto danno ossidativo causato dalle fibre stesse.

Inoltre, a sostegno di questa ipotesi, il fatto di assistere a un aumento generale del rilascio di citochine quali IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8 nei trattamenti è compatibile con il quadro delle analisi ottenute tramite RT-qPCR riguardanti lo studio dei livelli genici di queste citochine. Infatti si vede chiaramente come nelle 24 h ci sia un aumento della sintesi dell'RNA delle citochine, che corrisponde dopo 48 h ad un effettivo aumento del rilascio dei livelli proteici di queste ultime.

Il danno genotossico, misurato come espressione della proteina H2AX fosforilata tramite tecnica Western Blot ha dimostrato come il trattamento con CHR-L incrementi l'espressione della forma fosforilata dell'istone H2AX, sia in grado di indurre un danno a carico del DNA.

H2AX contribuisce alla formazione di nucleosomi, al rimodellamento della cromatina e alla riparazione del DNA, ed è anche usato in vitro come test per le rotture del doppio filamento (DSB). In questo ultimo caso H2AX viene fosforilato a livello della serina 139, poi chiamata γ H2AX, corrispondente ai punti in cui si ha il distacco delle catene nucleotidiche dalla proteina istonica utili alla cellula per intervenire dopo il danno.

La presenza di γ H2AX di per sé, tuttavia, non rappresenta l'evidenza di DSB permanenti. (31) Il ruolo della forma fosforilata dell'istone nella riparazione del DNA è in discussione, ma è noto che a causa della modifica il DNA diventi meno condensato, in modo da lasciare spazio per il reclutamento delle proteine necessarie per la riparazione dei DSB. (31)

Il danno genotossico osservato potrebbe essere il risultato del probabile potenziale pro-ossidante della fibra nell'ambiente intracellulare, risultando in un danno ossidativo.

Infatti, il CHR subisce una rapida dissoluzione rispetto alla CRO e quindi si comporta come un trasportatore che rilascia il carico di metalli nell'ambiente polmonare(38) i quali potrebbero aumentare il rischio di generare radicali liberi nella cellula. Questo rende evidente il fatto che

anche una fibra non biodurevole come il CHR possa esercitare un'azione dannosa risultando dunque avere un comportamento citotossico.

Per esempio, nel lavoro di Cralley et al. (27) viene riportato che quantità relativamente ingenti di metalli sono intimamente associati ad alcune forme di asbesto, come il CHR e hanno presentato i primi dati di esposizione comprovanti il possibile ruolo dei metalli nello sviluppo dei tumori legati all'esposizione all'amianto nell'industria tessile.

Nello studio in vitro di Studer et al. (28) sul contenuto di metalli nelle fibre minerali e il loro possibile rilascio in vivo viene ipotizzato il cosiddetto "effetto cavallo di Troia" osservato anche con le nanoparticelle NP. Un'ampia classe di NPs infatti rilascia ioni metallici (e.g., Fe, Co, Cu, Cr, e Ni) ai danni della cellula (29). Se questo modello venisse applicato alle fibre minerali, la tossicità dovrebbe includere anche il potenziale di una fibra non biodurevole come il crisotilo. Poiché le fibre di asbesto includono metalli tossici nella struttura, quelle a dissoluzione rapida come il crisotilo potrebbero rilasciare il loro carico tossico nell'ambiente polmonare.

In conclusione, si può affermare il danno genotossico nelle cellule evidenziato dall'aumento del segnale della forma fosforilata dell'istone H2AX possa essere dovuto alla formazione di ROS che si possono generare a seguito dell'internalizzazione della fibra da parte delle cellule vista la presenza nella sua struttura di ioni metallici promuoventi la produzione di radicali liberi nella cellula come il ferro (Fe) (42); questi meccanismi potrebbero andare a contribuire allo stress ossidativo portando la cellula verso la morte oppure contribuire alla trasformazione neoplastica della stessa. (26)

Fino ad oggi non è stato ancora determinato il grado di dissoluzione delle fibre di Crisotilo Russo ma si può sottolineare il danno evidente a carico dei tessuti sottoposti ai trattamenti con CHR, dato l'aumento della mortalità cellulare e l'aumento del segnale della forma fosforilata dell'istone H2AX.

È quindi deducibile dai risultati del test di vitalità, dall'analisi dei livelli genici e proteici delle citochine pro-infiammatorie e dall'analisi del danno genotossico che il Crisotilo Russo possa essere potenzialmente dannoso per i soggetti esposti.

Capitolo 4: Conclusioni

In questa tesi è stata messa in evidenza la tossicità del Crisotilo Russo a due diverse lunghezze (< 5 µm e > 5 µm) rispetto allo standard di Crocidolite UICC. È stato dimostrato che il Crisotilo Russo sia in grado di indurre un significativo abbassamento dell'indice di vitalità e di innescare il rilascio di segnali pro-infiammatori, nonché di mostrare un effetto dannoso a carico del DNA già dopo 24 h.

L'uso e l'estrazione del Crisotilo sono state vietate in quasi tutto il mondo, tuttavia ad oggi sono almeno sette i paesi che hanno interessi economici nella commercializzazione della fibra in questione, in primis la Russia, che rappresenta il principale produttore. (47)

Attualmente sono circa 60 le nazioni ad aver bandito l'amianto, sia europee che extraeuropee, nonostante questo però il Crisotilo continua ad essere prodotto e utilizzato.

La Cina infatti risulta essere in assoluto il principale paese consumatore di amianto Crisotilo, seguito da India, Kazakistan, Brasile, Indonesia, Thailandia, Vietnam e Ucraina. Il Crisotilo rappresenta ad oggi la maggioranza di tutto l'amianto prodotto ed utilizzato a livello mondiale ed il 95% di tutto l'amianto usato a partire dal 1900. (70)

I dati rilevati in questo studio hanno rivelato che il Crisotilo Russo ha mostrato gli stessi effetti cellulari avversi simili a quelli della crocidolite dopo poche ore esposizione.

Questo sottolinea come la fibra in questione possa potenzialmente risultare dannosa per la salute umana nonostante in questo lavoro di Rubini del 2021 venga sostenuto l'opposto dai governatori delle principali cittadine minerarie di amianto russe e dai rappresentanti del Movimento Sindacale Internazionale "For Chrysotile" di Russia, India, Brasile, Canada, Kazakistan, Ucraina, Messico, Colombia, sostenendo come il crisotilo, lavorato in "maniera controllata", a differenza delle altre fibre di amianto dovrebbe risultare innocuo. (58) (69)

Detto ciò, i dati ottenuti sono molto preliminari, necessitano di approfondimenti e di essere indagati ulteriormente. A questo scopo si potrebbe mirare allo sviluppo di modelli in vitro ingegnerizzati innovativi che ricreano in modo più accurato le proprietà del tessuto parenchimale polmonare sano e patologico quindi più sempre più rappresentativi della realtà in vivo.

Bibliografia

1. Chem. Res. Toxicol. 2019, 32, 2063–2077
2. Silica and some silicates". IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon, France. 42: 1–239. 1987.
3. Towards a quantitative model to predict the toxicity/pathogenicity potential of mineral fibers
Alessandro F. Gualtieri
4. Opuscolo C-17 del Ministero della salute
(https://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_6.jsp?lingua=italiano&id=658&area=Sicurezza%20chimica&menu=amianto)
5. Geologia dell’Ambiente, Periodico trimestrale della SIGEA Società Italiana di Geologia Ambientale Associazione di protezione ambientale a carattere nazionale riconosciuta dal Ministero dell’ambiente, della tutela del territorio e del mare, con D.M. 24 maggio 2007, G.U. n. 127 del 4.6.2007, A cura di Daniele Baldi
6. Redox Biology 47 (2021) 102174
7. D.M. Brown, I.A. Kinloch, U. Bangert, A.H. Windle, D.M. Walter, G.S. Walker, C.A. Scotchford, K. Donaldson, V. Stone, An in vitro study of the potential of carbon nanotubes and nanofibres to induce inflammatory mediators and frustrated phagocytosis.

8. shida, T., Fujihara, N., Nishimura, T. *et al.* Live-cell imaging of macrophage phagocytosis of asbestos fibers under fluorescence microscopy. *Genes and Environ* **41**, 14 (2019). (<https://doi.org/10.1186/s41021-019-0129-4>)
9. H Fung, Y W Kow, B Van Houten, B T Mossman, Patterns of 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA and indications of oxidative stress in rat and human pleural mesothelial cells after exposure to crocidolite asbestos., *Carcinogenesis*, Volume 18, Issue 4, Apr 1997, Pages 825–832, (<https://doi.org/10.1093/carcin/18.4.825>)
10. Geologia dell’Ambiente, Periodico trimestrale della SIGEA Società Italiana di Geologia Ambientale Associazione di protezione ambientale a carattere nazionale riconosciuta dal Ministero dell’ambiente, della tutela del territorio e del mare, con D.M. 24 maggio 2007, G.U. n. 127 del 4.6.2007, A cura di DANIELE BALDI
11. Chem. Res. Toxicol. 2019, 32, 2063–2077
12. *Chem. Res. Toxicol.* 2019, 32, 10, 2063–2077
13. Cytotoxicity of Long and Short Crocidolite Asbestos Fibers in Vitro and in Vivo¹ Lee A. Goodglick and Agnes B. Kane²
14. Evaluation of cytotoxicity and pro-inflammatory effects of Russian chrysotile fibres on the EpiAirway *In Vitro* Human Airway Model
15. Pleural Plaques and the Risk of Lung Cancer in Asbestos-exposed Subjects
Brims FJH, Kong K, Harris EJA, Sodhi-Berry N, Reid A, Murray CP, Franklin PJ, Musk AB, de Klerk NH. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020 Jan 1;201(1):57-62. doi:
10.1164/rccm.201901-0096OC. PMID: 31433952
16. Pleural Plaques and Asbestos di Linda Molinari <https://www.mesothelioma.com/asbestos-cancer/pleural-plaques/>
17. Asbestosi- Istituti Clinici Scientifici Maugeri
(<https://www.icsmaugeri.it/patologie/asbestosi>)
18. Mesothelioma Causes- di Karen Selby
(<https://www.asbestos.com/mesothelioma/causes/>)

19. Pleural Mesothelioma – di Karen Selby (<https://www.asbestos.com/mesothelioma/pleural/>)

20. Asbestos-Related Lung Cancer di Suzanne Dixon (<https://www.asbestos.com/cancer/lung-cancer/>)

21. Lene Snabe Nielsen CandScientSanPubl, Jesper Bælum MD, DrMedSci, Jesper Rasmussen MD, PhD, Søren Dahl MD, Karen Ege Olsen MD, DrMedSci, Maria Albin MD, DrMedSci, Niels Christian Hansen MD & David Sherson MD (2014) Occupational Asbestos Exposure and Lung Cancer—A Systematic Review of the Literature, *Archives of Environmental & Occupational Health*, 69:4, 191-206

22. Mortality from Lung Cancer in Asbestos Workers di Richard Doll, National Library of Medicine

23. Guide ESMO per il paziente basate sulle Linee Guida per la Pratica Clinica ESMO (Kstorfin Medical Communications Ltd per conto di ESMO)
<https://www.esmo.org/content/download/87433/1608958/1/IT-Cancro-del-Polmone-non-a-Piccole-Cellule-NSCLC-Guida-per-il-Paziente.pdf>

24. Mesothelioma vs. Lung Cancer di Karen Selby

25. Sito di MatTek Corporation (<https://www.mattek.com/products/epi-airway/>)

26. The health effects of chrysotile: Current perspective based upon recent data, by David M. Bernstein, John A. Hoskins

27. Cralley, L.J., Keenan, R.G., Kupel, R.E., Kinser, R.E., Lynch, J.R., 1968. Characterization and solubility of metals associated with asbestos fibers. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 29,

28. Studer, A.M., Limbach, L.K., Van Duc, L., Krumeich, F., Athanassiou, E.K., Gerber, L.C., Moch, H., Stark, W.J., 2010. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles.

29. Sabella, S., Carney, R.P., Brunetti, V., Malvindi, M.A., Al-Juffali, N., Vecchio, G., Janes, S.M., Bakr, O.M., Cingolani, R., Stellacci, F., Pompa, P.P., 2014. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles

30. Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha
31. James E. Cleaver, Luzviminda Feeney & Ingrid Revet (2011) Phosphorylated H2Ax is not an unambiguous marker for DNA double-strand breaks
32. Mearl F. Stanton, Maxwell Layard, Andrew Tegeris, Eliza Miller, Margaret May, Elizabeth Morgan, Alroy Smith, Relation of Particle Dimension to Carcinogenicity in Amphibole Asbestos and Other Fibrous Minerals, JNCI: Journal of the National Cancer Institute, Volume 67, Issue 5, November 1981, Pages 965–975
33. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. J Periodontol. 1993 May
34. Vlahopoulos S, Boldogh I, Casola A, Brasier AR, *Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation*
35. Jose Zavala, Bridget O'Brien, Kim Lichtveld, Kenneth G. Sexton, Ivan Rusyn, Ilona Jaspers & William Vizuete (2016) Assessment of biological responses of EpiAirway 3-D cell constructs versus A549 cells for determining toxicity of ambient air pollution, Inhalation Toxicology
36. Dario Di Giuseppe, Alessandro Zoboli, Luca Nodari, Luca Pasquali, Orietta Sala, Paolo Ballirano, Daniele Malferrari, Simona Raneri, Miriam Hanuskova, Alessandro F. Gualtieri; Characterization and assessment of the potential toxicity/pathogenicity of Russian commercial chrysotile. American Mineralogist 2021
37. Mirabelli D, Calisti R, Barone-Adesi F, et al Excess of mesotheliomas after exposure to chrysotile in Balangero, Italy Occupational and Environmental Medicine
38. Biodurability and release of metals during the dissolution of chrysotile, crocidolite and fibrous erionite Alessandro F. Gualtieri, Gigliola Lusvardia, Alessandro Zobolia, Dario Di Giuseppe, Magdalena Lassnanti Gualtieri

39. Bridging the gap between toxicity and carcinogenicity of mineral fibres by connecting the fibre crystal-chemical and physical parameters to the key characteristics of cancer di Alessandro F. Gualtieri

40. Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to cigarette smoke at the air-liquid interface resemble bronchial epithelium from human smokers di Carole Mathis, Carine Poussin, Dirk Weisensee, Stephan Gebel, Arnd Hengstermann, Alain Sewer, Vincenzo Belcastro, Yang Xiang, Sam Ansari, Sandra Wagner, Julia Hoeng, and Manuel C. Peitsch

41. Ren D, Daines DA. Use of the EpiAirway model for characterizing long-term host-pathogen interactions

42. Ruihua Fang, Ann E. Aust, Induction of Ferritin Synthesis in Human Lung Epithelial Cells Treated with Crocidolite Asbestos, Archives of Biochemistry and Biophysics

43. Dario Di Giuseppe, Alessandro Zoboli, Luca Nodari, Luca Pasquali, Orietta Sala, Paolo Ballirano, Daniele Malferrari, Simona Raneri, Miriam Hanuskova, Alessandro F. Gualtieri; Characterization and assessment of the potential toxicity/pathogenicity of Russian commercial chrysotile. American Mineralogist 2021

44. Dario Di Giuseppe, Alessandro Zoboli, Luca Nodari, Luca Pasquali, Orietta Sala, Paolo Ballirano, Daniele Malferrari, Simona Raneri, Miriam Hanuskova, Alessandro F. Gualtieri; Characterization and assessment of the potential toxicity/pathogenicity of Russian commercial chrysotile. American Mineralogist 2021

45. Wolf, S. Rose-John; C. Garbers, Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system.

46. Lee A. Goodglick, Agnes B. Kane; Cytotoxicity of Long and Short Crocidolite Asbestos Fibers in Vitro and in Vivo

47. Alpert N, van Gerwen M, Taioli E. Epidemiology of mesothelioma in the 21st century in Europe and the United States, 40 years after restricted/banned asbestos use.

48. *Amianto Crisotilo: Fallito Tentativo di Inserirlo nella convenzione di rotterdam*. AIEA ODV. (2017, May 27). Retrieved August 31, 2022, da <https://associazioneitalianaespostiamianto.org/amianto-crisotilo-fallito-tentativo-di-inserirlo-nella-convenzione-di-rotterdam/>

49. Tamura A et al. Potential asbestos exposure among patients with primary lung cancer in Japan. *J Occup Health* 2018; 60: 236-245
50. Sharma A, Singh K, Almasan A. Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol Biol.* 2012;920:613-26. doi: 10.1007/978-1-61779-998-3_40. PMID: 22941631.
51. Gerckens, M., Alsafadi, H. N., Wagner, D. E., Lindner, M., Burgstaller, G., & Königshoff, M. (2019). Generation of human 3D lung tissue cultures (3D-ltcs) for disease modeling. *Journal of Visualized Experiments*, (144)
52. Gordon, S. (2015). Non-animal models of epithelial barriers (skin, intestine and lung) in research, industrial applications and regulatory toxicology. *ALTEX*, 32(4), 327–378.
53. Driscoll, K. E., Carter, J. M., Hassenbein, D. G., & Howard, B. (1997). Cytokines and particle-induced inflammatory cell recruitment. *Environmental Health Perspectives*, 105, 1159. <https://doi.org/10.2307/3433526>
54. Cytotoxicity of Long and Short Crocidolite Asbestos Fibers in Vitro and in Vivo, by Lee A. Goodglick and Agnes B. Kane²
55. Schüz J, Bukhtiyarov I, Olsson A, Moissonnier M, Ostroumova E, Feletto E, Schonfeld SJ, Byrnes G, Tskhomariia I, McCormack V, Straif K, Kashanskiy S, Morozova T, Kromhout H, Kovalevskiy E. Occupational cohort study of current and former workers exposed to chrysotile in mine and processing facilities in Asbest, the Russian Federation: Cohort profile of the Asbest Chrysotile Cohort study. *PLoS One.* 2020 Jul 29;15(7):e0236475. doi: 10.1371/journal.pone.0236475. PMID: 32726334; PMCID: PMC7390538.
56. Olsson A, Kovalevskiy EV, Talibov M, Moissonnier M, Byrnes G, Bouaoun L, Schonfeld SJ, Feletto E, Kashanskiy SV, Ostroumova E, Kromhout H, Bukhtiyarov IV, Schüz J. Tobacco smoking among chrysotile asbestos workers in Asbest in the Russian Federation. *Occup Environ Med.* 2020 Sep;77(9):623-627. doi: 10.1136/oemed-2019-106263. Epub 2020 May 12. PMID: 32398292; PMCID: PMC7476310.
57. Schüz J, Kovalevskiy E, Moissonnier M, Olsson A, Hashim D, Kromhout H, Kashanskiy S, Chernov O, Bukhtiyarov I, Ostroumova E. Comparison of Two Information Sources for Cause-of-Death Follow-up in the Russian Federation: The Asbest Chrysotile Cohort Study.

Methods Inf Med. 2020 Feb;59(1):9-17. doi: 10.1055/s-0040-1710381. Epub 2020 Jun 14. PMID: 32535878; PMCID: PMC7446113.

58. Editor. (2021, September 10). *L'offensiva Autunnale dell'amianto in Russia* . Diario Prevenzione. Retrieved September 1, 2022, from <https://www.diario-prevenzione.it/?p=20539>
59. Patwa A, Shah A. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. Vol. 59, Indian Journal of Anaesthesia. 2015. p. 533–41
60. Lavrov rassicura i partner stranieri sulla questione dell'amianto crisotilo. 2settembre 2021. <https://rossaprimavera.ru/news/674c671c>
61. Kuroda, A. (2021). Recent progress and perspectives on the mechanisms underlying asbestos toxicity. *Genes and Environment*, 43(1). <https://doi.org/10.1186/s41021-021-00215-0>
62. Muhle, H., Bellmann, B., & Pott, F. (1994). Comparative investigations of the biodurability of mineral fibers in the Rat Lung. *Environmental Health Perspectives*, 102, 163. <https://doi.org/10.2307/3432078>
63. Solbes, E. and Harper, R. W. (2018). Biological responses to asbestos inhalation and pathogenesis of asbestos-related benign and malignant disease. *J. Investig. Med.*, 66, 721–727. <https://doi.org/10.1136/jim-2017-000628>
64. Wright, J. L., Cagle, P., Churg, A., et al. (1992). Diseases of the small airways. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 146, 240–62. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/146.1.240>
65. Aremu, S. O., & Zephaniah, H. S. (2019). Asbestos: A silent potent killer. *European Journal of Environment and Public Health*, 3(2). <https://doi.org/10.29333/ejeph/5906>
66. Entrez Gene. (2020). *Definitions*. <https://doi.org/10.32388/4hll0n>
67. Ren, K., & Torres, R. (2009). Role of interleukin-1 β during pain and inflammation. *Brain Research Reviews*, 60(1), 57–64. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2008.12.020>
68. Moossavi M, Parsamanesh N, Bahrami A, Atkin SL, Sahebkar A (November 2018). "Role of the NLRP3 inflammasome in cancer". *Molecular Cancer*.

69. *Amianto Crisotilo: C'è Chi Ancora lo difende e chi lo Vuole Bandire*. AIEA ODV. (2015, May 14). Retrieved September 5, 2022, from <https://associazioneitalianaespostiamianto.org/amianto-crisotilo-ce-chi-ancora-lo-difende-e-chi-lo-vuole-bandire/>
70. Blasio, N. D. (2019, February 25). *L'amianto nei paesi in Via di Sviluppo*. Salute Internazionale. Retrieved September 5, 2022, from <https://www.saluteinternazionale.info/2011/04/lamianto-nei-paesi-in-via-di-sviluppo/>
71. Science 328, 1662, 2010
72. Proc. Natl. Acad. Sci. 104, 18886, 2007
73. Nat. Methods 13, 151, 2015
74. Knudsen L, Ochs M. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochem Cell Biol* [Internet]. 2018;150(6):661–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00418-018-1747-9>
75. Ochs M, Nyengaard JR, Jung A, Knudsen L, Voigt M, Wahlers T, et al. The Number of Alveoli in the Human Lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;169(1):120–4.
76. Nova Z, Skovierova H, Calkovska A. Alveolar-capillary membrane-related pulmonary cells as a target in endotoxin-induced acute lung injury. *Int J Mol Sci*. 2019;20(4).
77. Direttiva 2010/63/UE dell'Unione Europea, D.LGS. del 4 marzo 2014, n. 26

78. Pijuan J, Barceló C, Moreno DF, Maiques O, Sisó P, Marti RM, et al. In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: From cell imaging to data analysis. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7(JUN):1–16.
79. Giusti S, Sbrana T, La Marca M, Di Patria V, Martinucci V, Tirella A, et al. A novel dual-flow bioreactor simulates increased fluorescein permeability in epithelial tissue barriers. *Biotechnol J.* 2014;9(9):1175–84.
80. 124. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* (80-). 1993;260(5110):920–6.

