

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



GIF

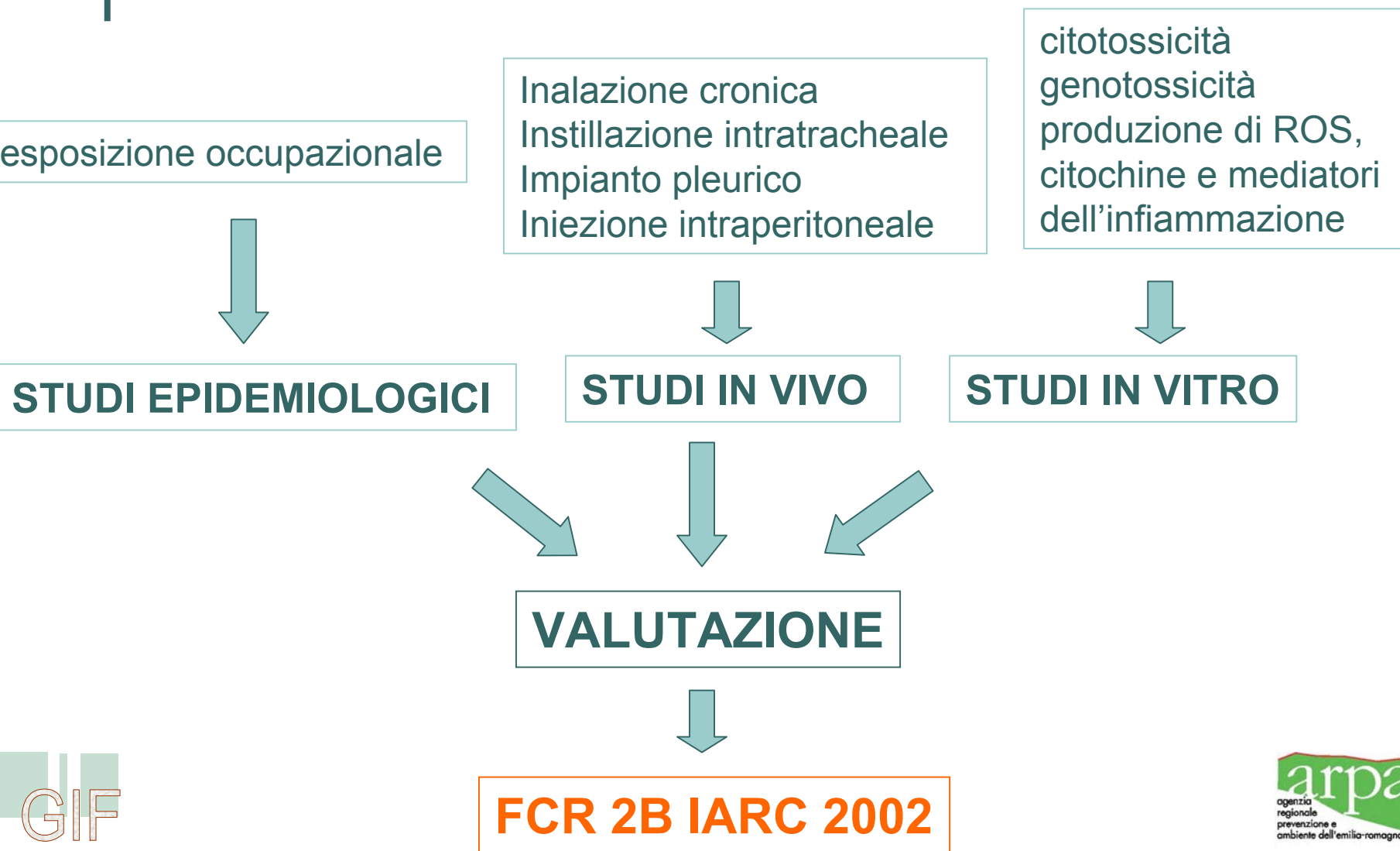
Gruppo Interregionale Fibre

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



arpa
agenzia
regionale
prevenzione e
ambiente dell'emilia-romagna

VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI BIOLOGICI DELLE FIBRE



MODELLI IN VITRO

● VANTAGGI

- Rapidità, economicità, riproducibilità
- Valutazione delle relazioni dose-risposta
- Identificazione di parametri critici per gli effetti avversi
 - Dose (Numero di fibre)
 - Dimensioni
 - Reattività di superficie
- Studio dei meccanismi molecolari alla base degli effetti biologici delle fibre
- Screening preliminare di nuovi materiali e comparazione con fibre naturali

● LIMITI

- Non sono valutabili parametri fondamentali nella azione biologica delle fibre e legate all'azione del microambiente polmonare
 - Durabilità
 - Biopersistenza
- Possibilità di falsi positivi nel caso di fibre lunghe e non biopersistenti
- Modelli non direttamente correlabili con l'organo target



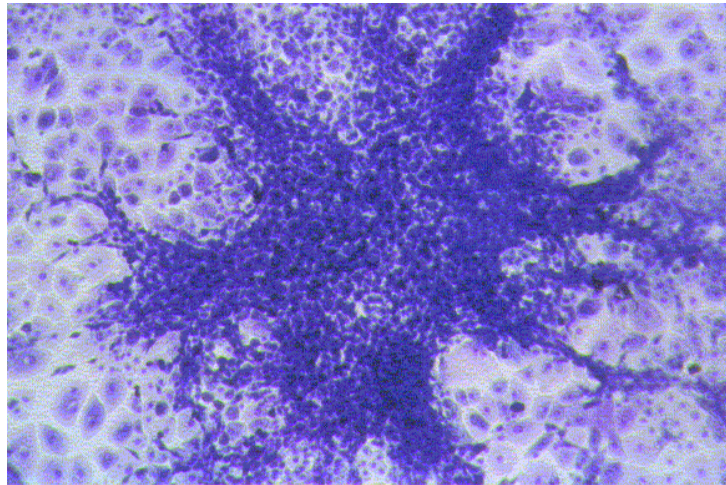
TRASFORMAZIONE CELLULARE

- modelli in vitro usati per lo studio della cancerogenesi
- mimano alcune tappe del processo di cancerogenesi multifasica
- permettono lo studio del potenziale cancerogeno di agenti fisici e chimici

TRASFORMAZIONE CELLULARE

alterazioni
morfologiche

alterazioni nel
ritmo
proliferativo



acquisizione della
capacità di
crescita
indipendente dal
substrato

acquisizione di
tumorigenicità

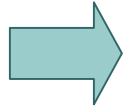


TRASFORMAZIONE CELLULARE

- screening test di secondo livello per cancerogenesi
- screening test per cancerogeni non genotossici
- sostituzione di test in vitro di mutagenesi con attività predittiva simile o inferiore

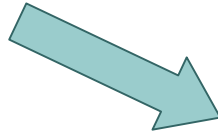
MODELLI IN VITRO DI TRASFORMAZIONE CELLULARE

SHE



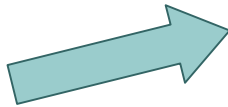
cellule con cariotipo normale
effetti su fasi precoci della
cancerogenesi

BALB/c 3T3



cellule immortalizzate
aneuploidi

C3H10T1/2



effetti su fasi più tardive
della cancerogenesi

MODELLO BALB/c 3T3

● Esperienza Internazionale

- Utilizzato per lo screening di cancerogeni e di promoventi (cancerogeni non mutageni con dose soglia stimabile)
- Concordanza con il test nell'animale (IARC/NCI/EPA Working Group 1989, 1993, OECD Working Group 2006)
- Il protocollo sperimentale è attualmente sottoposto a uno studio di pre-validazione coordinato dall'ECVAM, che dovrebbe terminare nella primavera 2007

● La nostra esperienza (dal 1989)

● composti singoli

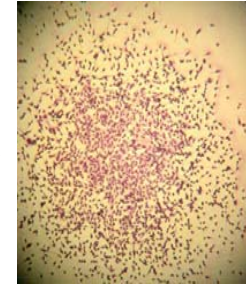
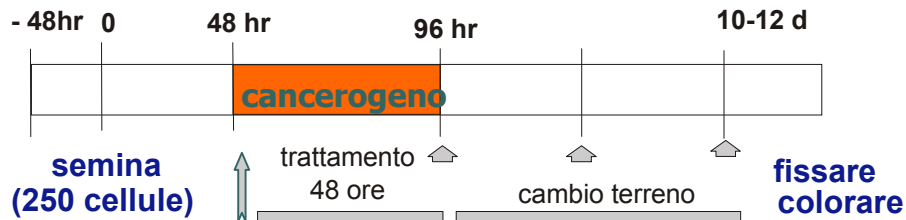
- Solventi
- Pesticidi
- Farmaci
- Biotossine algali

● miscele complesse

- Contaminanti in matrici ambientali (suolo, acqua, fanghi, aria)
- Miscele complesse da immettere nell'ambiente (carburanti)

MODELLO BALB/c 3T3

TEST DI CITOTOSSICITA'

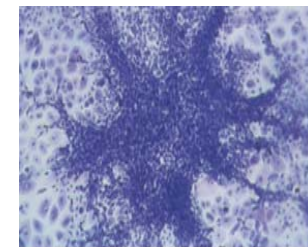
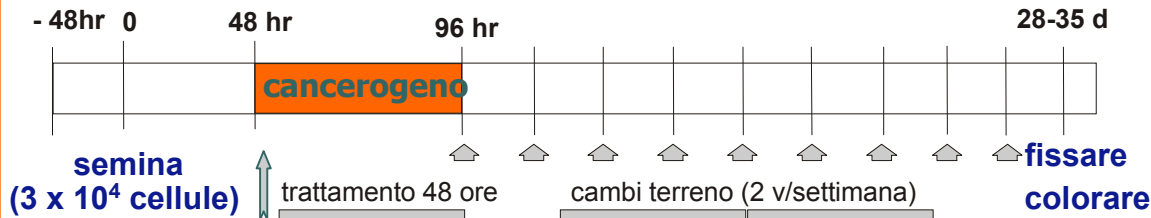


END POINT



efficienza clonale

TEST DI TRASFORMAZIONE

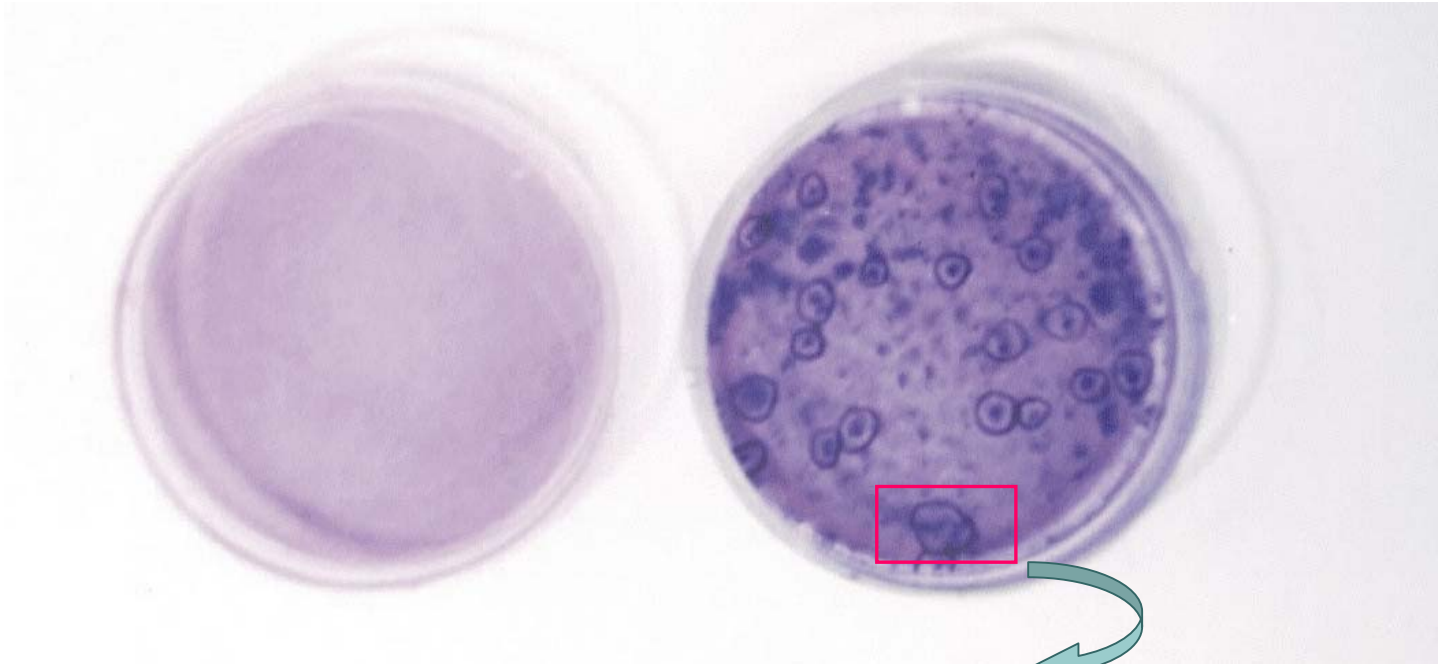


END POINT



frequenza di trasformazione

MODELLO BALB/c 3T3

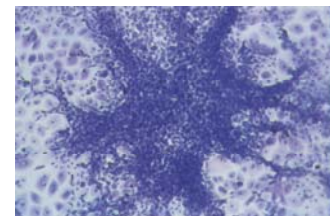


ENDPOINT FINALE



**FREQUENZA DI
TRASFORMAZIONE (TF)
numero foci/ efficienza
clonale**

**formazione di
foci**





DATI DI LETTERATURA

MODELLO BALB/c 3T3

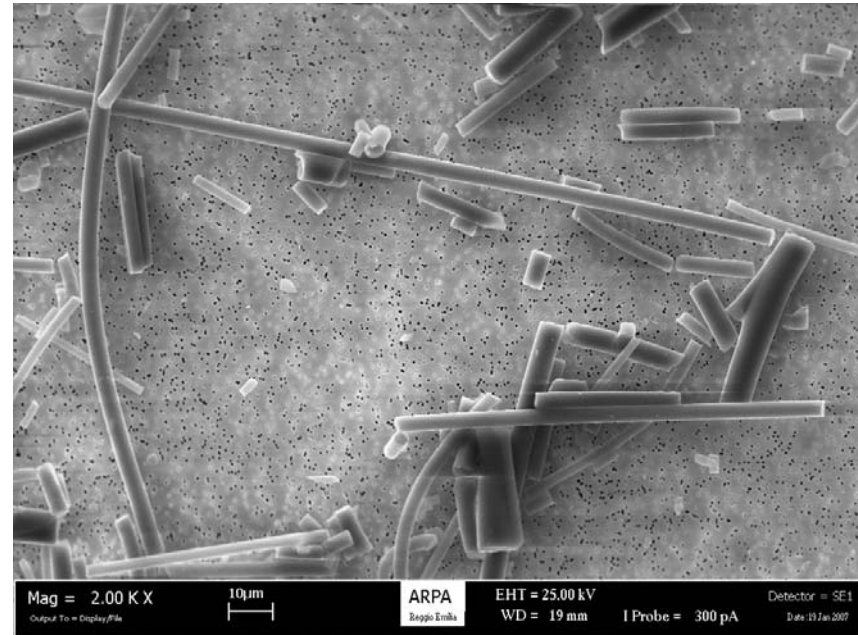
Tipo di fibra	Dose	Referenza
Crisotilo	10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Lu, 1988
Crocidolite	> 1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Lin, 2000
Code 100	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Gao, 1995
AAA-10	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Gao, 1995

DATI DI LETTERATURA

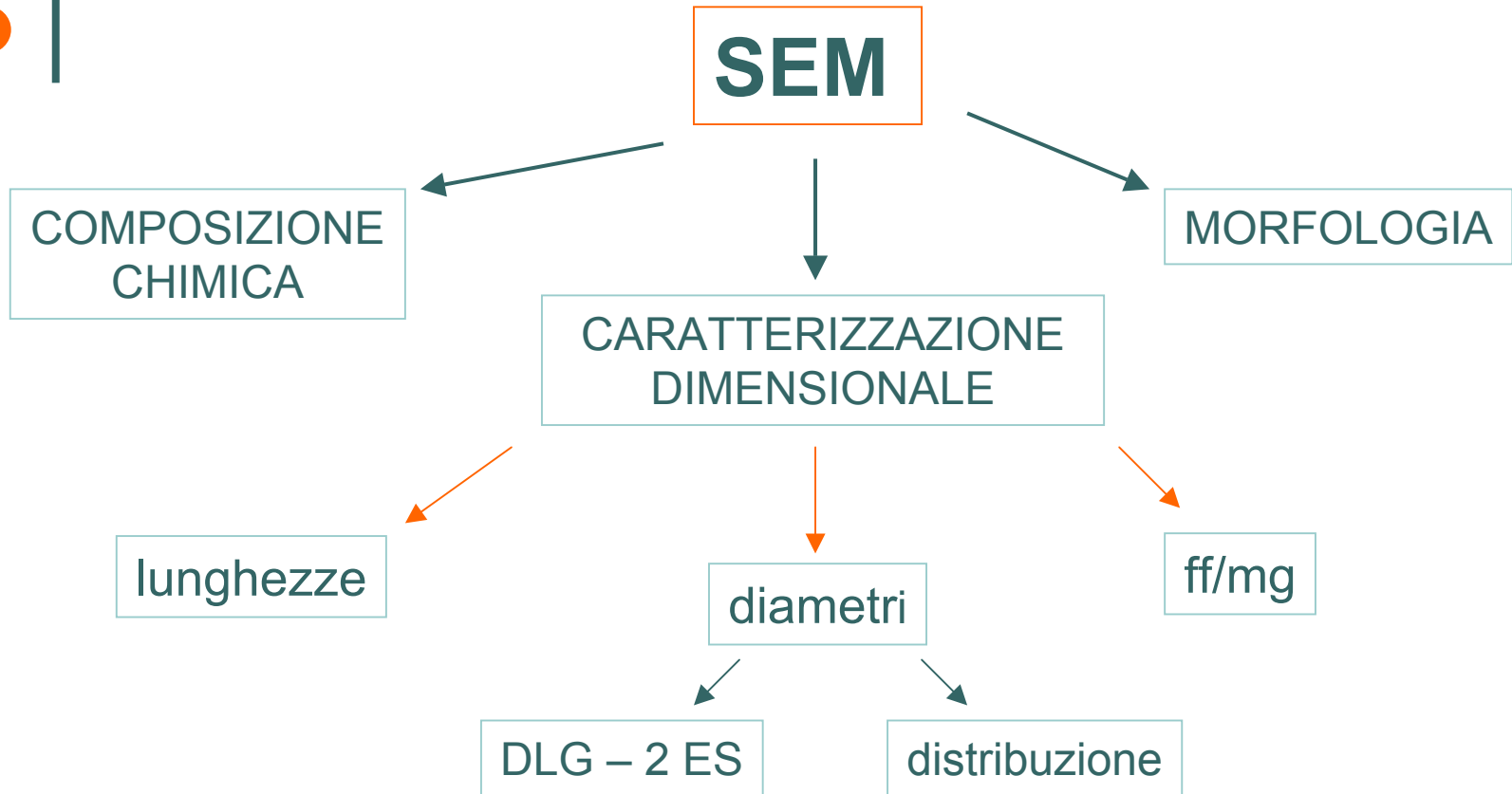
MODELLO SHE		
Tipo di fibra	Dose	Referenza
Crisotilo		Mikalsen, 1988
Amosite		Mikalsen, 1988
Antofillite		Mikalsen, 1988
crocidolite		Mikalsen, 1988
Code 100	0.5-2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Hesterberger, 1984, 1986
FCR1	6.80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Elias, 2002
FCR3	3.80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Elias, 2002
FCR4	>15.24 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	Elias, 2002

FIBRE POLICRISTALLINE

- classificate nel 2002 dalla IARC nella categoria B2 possibili cancerogeni per l'uomo insieme alle FCR
- non incluse nella Direttiva UE 97/69/EC



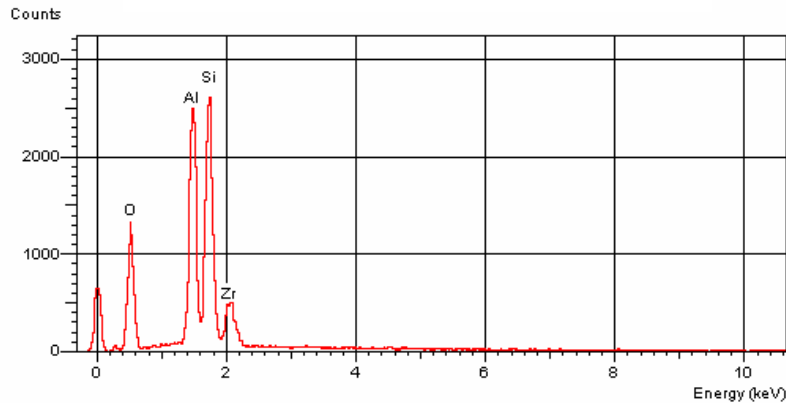
CARATTERIZZAZIONE DELLE FIBRE



E' stato utilizzato il metodo di comminuzione per compressione relativo alla determinazione del diametro ponderato sulla lunghezza, DLG - 2 ES, previsto dal Draft 4, rev. 2 del metodo ECB, 2004

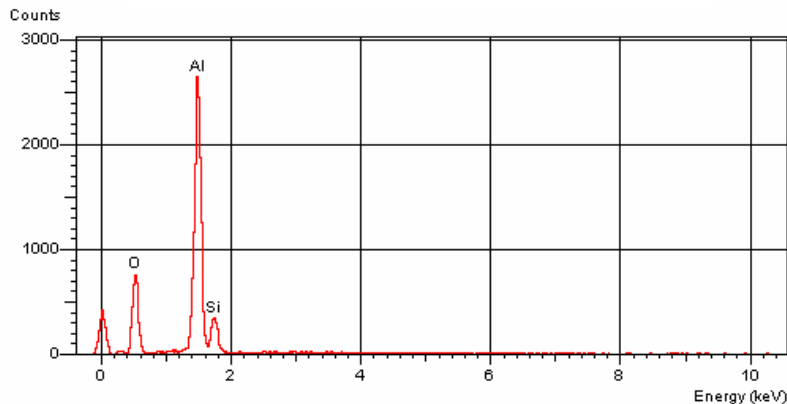
COMPOSIZIONE CHIMICA

A – Fibra ceramica refrattaria



%	FCR
SiO₂	48-60
Al₂O₃	25-55
ZrO₂	<16
Cr₂O₃	>3

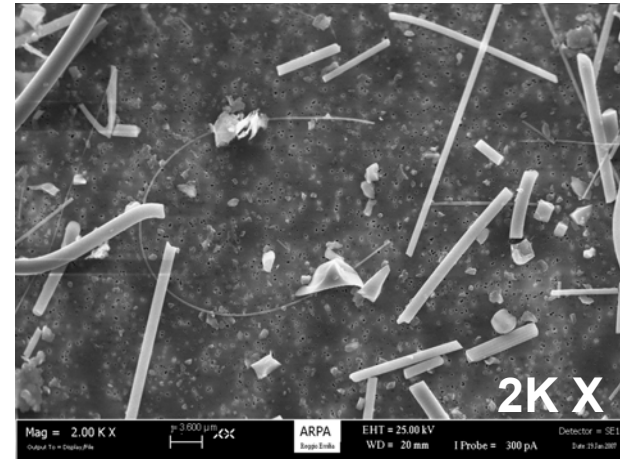
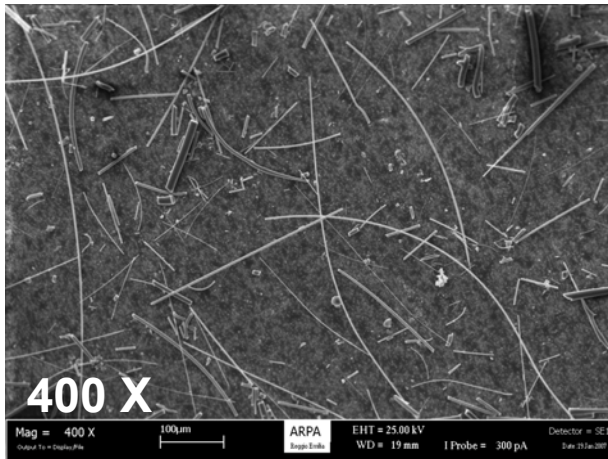
B – Fibra policristallina



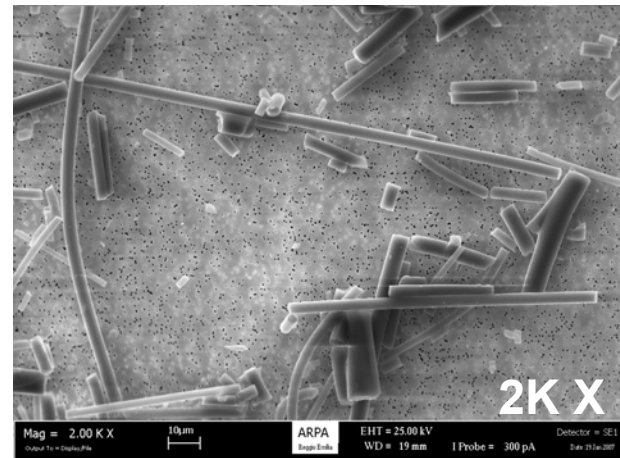
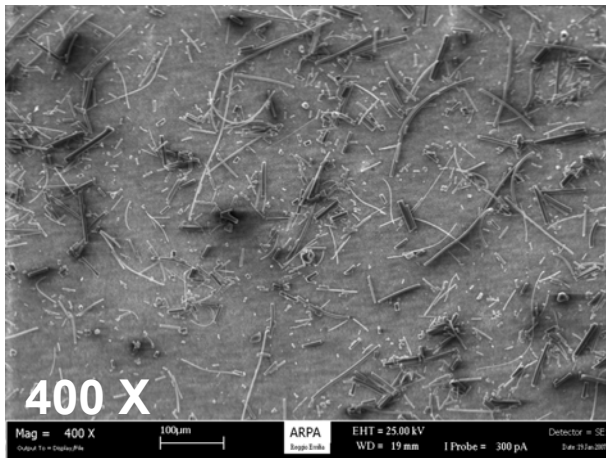
%	FPC
SiO₂	~ 20
Al₂O₃	~ 80
ZrO₂	-
Cr₂O₃	-

- Gli spettri EDX confermano il contenuto percentuale di Al e Si riportato nella scheda di sicurezza

FIBRA CERAMICA REFRATTARIA



FIBRA POLICRISTALLINA



PARAMETRI DESCRITTIVI

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

- Il DLG – 2 ES misurato per FCR è circa la metà di quello ottenuto per FPC
- Sulla base di questo dato, entrambi i campioni si pongono nell'ambito delle fibre respirabili per l'uomo e cancerogene secondo la Nota R (CM 4 del 15/03/00)



PARAMETRI DESCRITTIVI

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

- Nella FPC non sono presenti fibre con diametro $< 1 \mu\text{m}$, che nella FCR rappresentano invece il 23% del totale
- In entrambe i tipi di fibre la classe più rappresentata è quella con diametro compreso tra 1 e 3 μm
- Il campione di crocidolite è invece costituito nella sua totalità da fibre con diametro $< 3 \mu\text{m}$



PROFILO TOSSICOLOGICO

- **TEST DI CITOTOSSICITÀ**

- Profilo tossico della fibra policristallina
- Confronto con la tossicità indotta da FCR e crocidolite
- Scelta delle dosi da utilizzare nel saggio di trasformazione

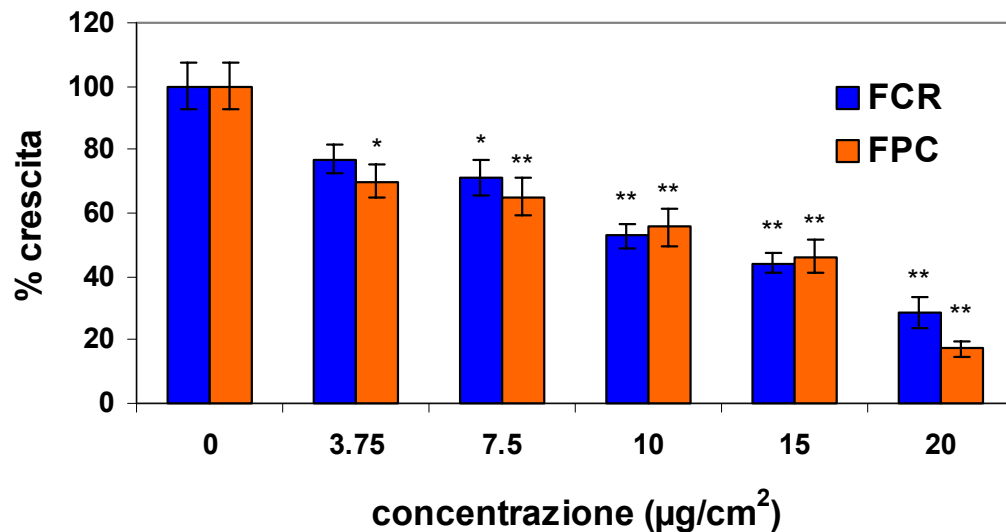
- **TEST DI TRASFORMAZIONE**

- Valutazione della potenziale cancerogenicità
- Comparazione degli effetti trasformanti delle fibre policristalline e delle FCR con un controllo positivo (crocidolite)

- **RELAZIONI DOSE-RISPOSTA**

EFFETTI CITOTOSSICI: confronto su base gravimetrica

- Sia FCR che FPC inducono citotossicità nel modello 3T3, con una netta relazione dose-risposta
- Quando il confronto è condotto su base gravimetrica, non sembrano emergere differenze significative nella tossicità indotta dai due tipi di fibra
- Il potenziale citotossico rispetto alla crocidolite è inferiore di 2 ordini di grandezza



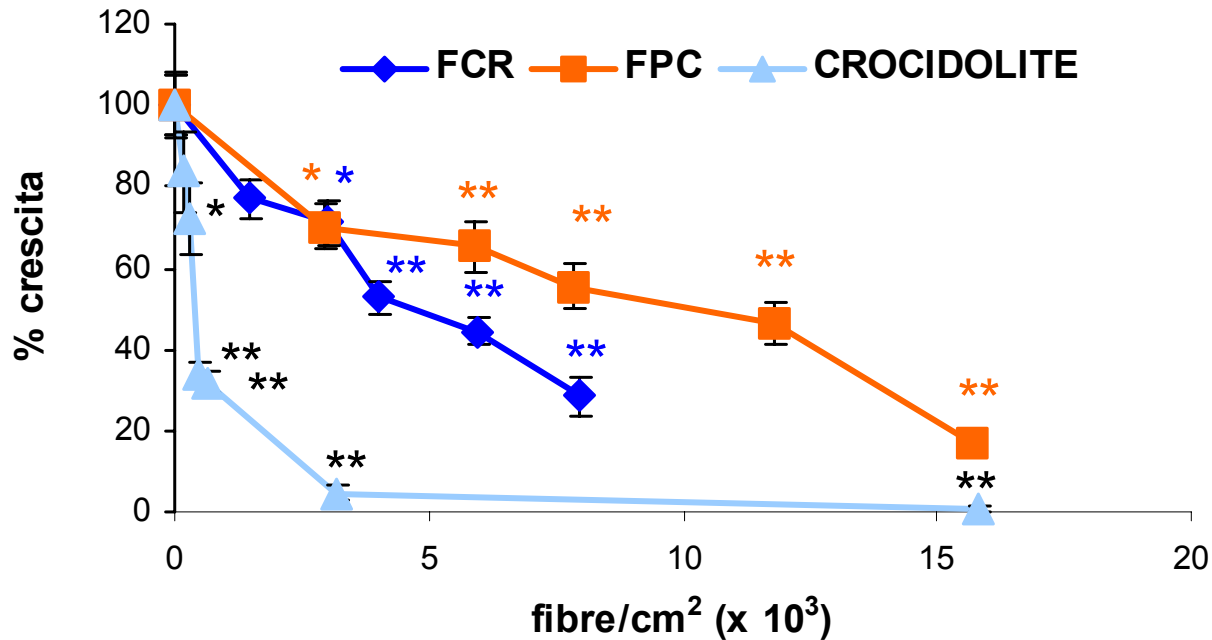
IC₅₀ ± ES (µg/cm²)

FCR 12.09 ± 0.56

FPC 11.65 ± 1.58

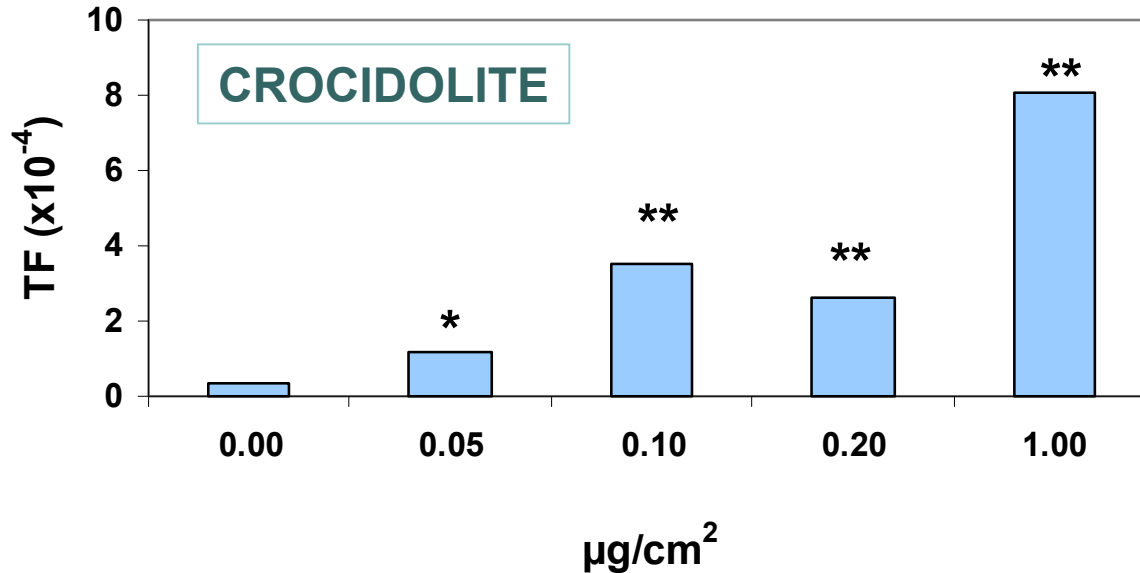
crocidolite 0.16 ± 0.03

EFFETTI CITOTOSSICI: confronto in base al n° fibre/mg



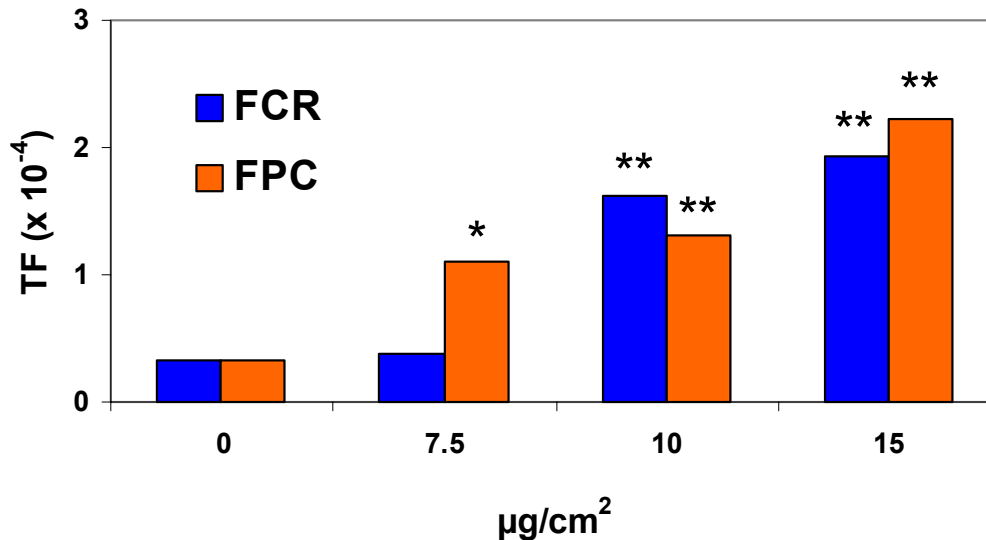
RANKING DI POTENZA CITOTOSSICA
crocidolite >> FCR > FCP

TRASFORMAZIONE: controllo positivo



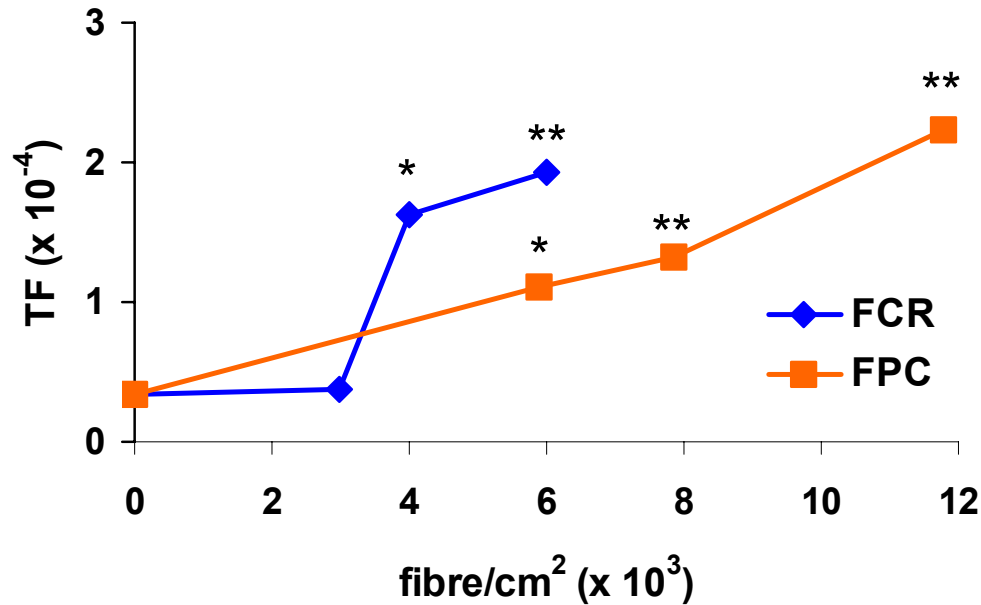
- I dati presenti in letteratura, ottenuti in cellule BALB/c 3T3, dimostrano per la crocidolite una attività trasformatrice dose-dipendente a concentrazioni comprese tra 0.2 e 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Lin et al, 2000)
- Concentrazioni superiori, che determinano una inibizione della crescita molto elevata, hanno impedito la formazione di un monostrato cellulare completo e uniforme.

TRASFORMAZIONE: confronto su base gravimetrica



- L'attività trasformante delle FCR, già in precedenza dimostrata nel modello SHE, è stata confermata anche nel modello di trasformazione *in vitro* in cellule BALB/c 3T3
- Anche le FPC sembrano capaci di indurre la comparsa di foci di trasformazione
- La frequenza di trasformazione aumenta in modo dose-relato

TRASFORMAZIONE: confronto in base al n° fibre/mg



- Le differenze nell'attività trasformante potrebbero essere messe in relazione a
 - lunghezza (FCR > PC)
 - struttura cristallina
 - composizione chimica
 - reattività



CONCLUSIONI

- I dati presentati in questo studio hanno messo in luce la capacità delle FPC di indurre effetti citotossici e trasformazione morfologica in vitro nel modello BALB/c 3T3
- Il ranking di potenza per entrambi gli endpoint valutati sembra essere crocidolite >> FCR > FPC
- Anche il nostro studio sembra confermare la dipendenza degli effetti biologici dalla lunghezza delle fibre



CONCLUSIONI

- L'approccio sperimentale illustrato può essere proposto per una valutazione preliminare di materiali fibrosi di nuova introduzione e/o per cui non esistono ancora dati in vivo
- Nonostante le ovvie limitazioni, i modelli in vitro di trasformazione cellulare sembrano porsi come validi approcci alternativi ai bioassay a lungo termine nell'animale per la valutazione dell'attività cancerogena di fibre e per lo studio dei meccanismi di azione a livello cellulare e molecolare
- La dimostrazione dell'attività citotossica e trasformante di FPC nel modello 3T3 potrebbe quindi costituire un punto di partenza per studi ulteriori che possano condurre all'estrapolazione del rischio legato all'esposizione e ad una categorizzazione delle FPC da parte degli Enti regolatori preposti