

RIASSUNTO

Noi presentiamo una breve rassegna dei meccanismi potenziali a livello molecolare e cellulare che possono essere implicati nella cancerogenesi dovuta all'asbesto. Viene discussa l'utilità di considerare questi meccanismi nello sviluppare adeguati modelli biologici rivolti alla valutazione del rischio di cancerogenicità a livelli ambientali di fibre di asbesto.

INTRODUZIONE

L'asbesto è un nome commerciale generale di un gruppo di fibre minerali di silicati idrati con diverse caratteristiche fisiche e varie composizioni di metalli. L'esposizione occupazionale a diversi tipi di fibre di asbesto è stata trovata responsabile dello sviluppo del cancro polmonare e dei mesoteliomi maligni della pleura. Tuttavia, ricerche su animali sperimentali hanno dimostrato che le differenze morfologiche e delle dimensioni possono stare alla base delle differenti capacità cancerogene. Inizialmente l'esposizione lavorativa alle fibre di asbesto fu la principale preoccupazione riguardo ai rischi per la salute umana: però, più recentemente, l'attenzione è stata rivolta ai rischi potenziali per il pubblico in generale esposto all'asbesto contenuto nei materiali da costruzione edile impiegati negli edifici scolastici e quelli commerciali e quelli pubblici. C'è un potenziale verosimile di rilascio di alti livelli di fibre nell'ambiente nel corso della rimozione dell'asbesto da questi edifici con lo scopo di ridurre le esposizioni ad asbesto per tempi lunghi. I costi per la rimozione sono stati stimati maggiori di 53 miliardi di dollari. Pertanto, è importante avere le più accurate valutazioni dei rischi cancerogeni al momento di formulare decisioni se la rimozione sia necessaria e possa comportare una reale riduzione dei rischi.

Le agenzie di regolamentazione sono tenute per legge a proteggere il pubblico da livelli di cancerogeni che potrebbero costituire un rischio insostenibile per la gente. Questo spesso implica l'impiego di ricerche epidemiologiche nelle quali i cancri sono stati trovati statisticamente più elevati in una popolazione esposta rispetto ad una popolazione corrispondente non esposta ed estrapolare ai livelli più bassi dove il rischio "accettabile" di cancro potrebbe essere di 1 su 10^5 o 10^6 . Sebbene la maggior parte degli studi epidemiologici siano inadeguati per estrapolazioni precise tuttavia, in carenza di alternative migliori, essi sono impiegati per stabilire limiti di esposizione ambientale degli agenti cancerogeni. Nel produrre queste definizioni, tuttavia, nessuna informazione è usata riguardante i meccanismi con cui i cancerogeni portano una cellula normale a divenire cellula tumorale. Supposizioni di tipo conservativo, forse non accurate, sono fatte quando si pensa che l'induzione del cancro sia il risultato di interazioni o di impatto sul DNA, e ci sia una relazione lineare tra l'esposizione esterna ed il numero di interazioni col DNA, e che non ci sia un livello di esposizione "sicura" a cui la probabilità di provocare cancro sia zero. Nel 1986, l'EPA impiegò ricerche epidemiologiche e queste assunzioni per stimare che l'esposizione a 0,0001 fibre di asbesto per ml di aria comporterebbe 2,4 morti per cancro polmonare e mesotelioma su 100.000 persone esposte. Tuttavia, l'accuratezza di usare tali modelli lineari per estrapolare ai livelli più bassi delle esposizioni ad asbesto non è stata controllata nelle ricerche epidemiologiche, né ci sono dati sperimentali che dimostrino che la cancerogenesi da asbesto corrisponda ad un meccanismo ad "un solo colpo".

Nei due ultimi decenni, numerose ricerche scientifiche hanno rivelato la natura complessa delle interazioni dell'asbesto con le macromolecole e le risposte cellulari alle esposizioni ad asbesto. Queste esposizioni possono portare ad un danneggiamento diretto od indiretto del DNA, e possono provocare fenomeni d'iniziazione (mutazioni) che sono in grado di causare la trasformazione cellulare ed eventualmente portare al cancro. L'iniziazione è solo una parte del processo della cancerogenesi; tuttavia, agenti quali l'asbesto possono agire come cocancerogeni o promotori quando riducono il tempo necessario ad una cellula iniziata o trasformata a svilupparsi in una cellula cancerosa. Qui, noi proponiamo diversi meccanismi biologici sul modo

con cui le fibre dell'asbesto possono iniziare e promuovere il cancro a livello molecolare. Però, un'informazione quantitativa sufficiente non è ancora disponibile per essere impiegata nella formulazione di modelli, basati soprattutto sulla biologia, per la valutazione dei rischi. Nostra intenzione è identificare e descrivere meccanismi molecolari derivati da ricerche sperimentali, e esprimere uno stimolo per produrre ulteriori dati utili per una valutazione più accurata della cancerogenicità dell'asbesto. Oltre ai meccanismi biologici, anche altri fattori sono importanti nello stabilire il rischio di cancerogenesi legato all'esposizione alle fibre di asbesto. Questi altri fattori comprendono le farmacocinetiche della deposizione dell'asbesto nel polmone e nel tessuto pleurico, dell'accumulo e dell'eliminazione, della specificità delle cellule bersaglio, e le proprietà fisicochimiche delle differenti fibre dell'asbesto. Qui noi ci focalizziamo solo sui meccanismi potenziali a livello molecolare e cellulare.

EVIDENZE A FAVORE DELL'ATTIVITA' GENOTOSSICA DIRETTA

I fenomeni di iniziazione sono il risultato delle alterazioni permanenti dell'espressione del DNA provocate dalle mutazioni geniche (alterazione di una base singola nella molecola del DNA oppure delezioni all'interno di un gene): alterazioni cromosomiche, come le delezioni di diversi geni o rimaneggiamenti di cromosomi dove una parte di un cromosoma è trasferita in un altro cromosoma; e le alterazioni numeriche che capitano durante la divisione cellulare in cui le cellule figlie ricevono ripartizioni disuguali di cromosomi. In dipendenza da quali geni sono interessati da questi fenomeni, la cellula portatrice delle aberrazioni può morire oppure sopravvivere come una cellula normale, oppure, se sono implicati gli oncogeni, la cellula può sopravvivere senza capacità di differenziarsi, di controllare la sua crescita, e di funzionare normalmente.

Ricerche sperimentali *in vivo* hanno dimostrato che le fibre dell'asbesto crocidolite di varie dimensioni possono essere inghiottite dalle cellule macrofagiche del peritoneo dopo un'iniezione endoperitoneale ed interagire fisicamente con le proteine del citoscheletro e, pertanto, avere accesso al materiale genetico entro la cellula. Brody *et al.* hanno anche riferito che fibre di asbesto crisotilo inalate sono assunte da cellule epiteliali del polmone di ratto e possono quindi associarsi con microfilamenti intracellulari contenenti actina, e pertanto hanno la capacità di legarsi ai polimeri proteici che partecipano alla separazione dei cromosomi nel corso della divisione cellulare. Sia le fibre di asbesto crocidolite sia quelle del crisotilo (nella maggioranza le fibre erano più corte di 5 μm e con un diametro tra 0,1 e 1,0 μm) iniettate nella cavità pleurica di cavie erano viste penetrare nelle cellule mesoteliali entro due settimane dopo l'esposizione. Questi risultati dimostrano che le fibre di asbesto possono entrare nelle cellule *in vivo* ed avere accesso alle macromolecole citoplasmatiche e potenzialmente interagire col DNA.

Molte ricerche sperimentali *in vitro* sono state eseguite sulle fibre di asbesto. Haugen *et al.* riferirono che le cellule epiteliali bronchiali umane erano in grado di ingurgitare fibre di asbesto amosite e che fibre all'interno del citoplasma apparivano libere oppure dentro a vacuoli di membrana. Essi riferirono che inclusioni endonucleari di amosite sono reperibili in cellule bronchiali umane. Cellule mesoteliali in coltura possono fagocitare fibre di asbesto crisotilo A lunghe meno di 4 μm , e fibre di asbesto sia crisotilo A sia crocidolite lunghe tra 10 μm a 1 μm e con diametro tra 1 μm e meno di 0,1 μm sono state viste aderire ai cromosomi in metafase e provocare poliploidia. Nelle cellule mesoteliali di ratto, fibre di asbesto crisotilo con una lunghezza media inferiore a 4 μm con l'86% delle fibre di diametro inferiore a 0,058 μm , provocavano aberrazioni cromosomiche che erano prevalentemente rotture di cromatidi come anche poliploidia. L'esposizione di cellule mesoteliali di pleura umana ad asbesto amosite causava la formazione di cellule aneuploidi che mostravano caratteristiche di accrescimento alterate, sebbene cloni aneuploidi isolati non fossero trovati essere tumorigeni dopo essere stati iniettati in topi nudi privi di timo. Hesterberg *et al.* riferirono che cellule embrionali di criceto siriano internalizzano fibre di asbesto crisotilo e, talvolta, i cromosomi appaiono avviluppati attorno a singole fibre di asbesto. In un'altra ricerca, cellule embrionali di criceto siriano, arrestate alla fase G₁/S ed esposte a fibre di asbesto manifestavano un incremento di 22 volte dei cromosomi spostati rispetto alle colture controllo. Hesterberg *et al.* postularono che la segregazione anomala potrebbe essere stata causata da un'interferenza fisica diretta coi cromosomi prevenendo o peggiorando la loro separazione durante la divisione cellulare. Risultati simili sono stati riferiti per cellule di criceto cinese. Tuttavia, Sincok *et al.* riferirono che nessun

significativo danno cromosomale fu osservato in cellule di fibroblasti umani primari derivati da cute e polmoni oppure in linee cellulari linfoblastiche umane esposte a fibre di asbesto crocidolite o crisotilo con una lunghezza media tra 1,1 e 3,4 μm e un diametro tra 0,15 e 0,47 μm . Fornace non fu capace di trovare rotture di filamenti singoli di DNA in cellule fibroblastiche umane che erano state trattate con fibre di asbesto amosite alle dosi di bassa tossicità cellulare. Mossman *et al.* hanno anche dimostrato che fibre di crocidolite e di crisotilo a concentrazioni non tossiche non provocavano rotture di filamenti singoli di DNA di cellule epiteliali della trachea di criceto. Libbus *et al.* dimostrarono che fibre di asbesto crocidolite di lunghezza media e di diametro di 14,8 e 0,9 μm , rispettivamente, provocavano rottura di filamenti singoli di DNA in cellule embrionali di ratto coltivate *in vitro*. Questi ricercatori usarono una prova di traslazione al taglio piuttosto che l'eluizione alcalina per misurare le rotture. L'esame elettro-microscopico delle cellule trattate indicava che le rotture dei filamenti erano presenti sia nelle cellule contenenti fibre in modo manifesto sia nelle cellule dove non erano trovate fibre. Il danno del DNA appariva correlato con la dose ma non in modo lineare.

Questi studi dimostrano che le fibre di asbesto possono entrare nelle cellule, legarsi a componenti cellulari, e causare danno cromosomico ed aberrazioni numeriche dei cromosomi in certi tipi di cellule mediante interazione diretta o indiretta attraverso qualche intermedio che può portare a mutazione. L'asbesto apparentemente provoca un grave danno ai cromosomi piuttosto che alterazioni di singoli geni poiché le fibre dell'asbesto non sono state trovate causare mutazioni geniche nelle cellule dei mammiferi, o in sistemi di prova su cellule batteriche oppure stimolare la sintesi non programmata di DNA negli epatociti di ratto. Tuttavia, Yang *et al.* hanno dimostrato che linee cellulari di fibroblasti di xeroderma pigmentoso, difettose nella riparazione di certi tipi di danno del DNA prodotto da composti chimici o dai raggi UV, sono molto sensibili alle fibre di asbesto crisotilo, amosite e crocidolite rispetto ai fibroblasti umani normali. Questi risultati suggeriscono che alcuni tipi di danno del DNA provocato dall'asbesto possono implicare modeste lesioni che sono riparabili.

Le fibre di asbesto (amosite, antofillite, crocidolite, crisotilo A rodesiano, e crisotilo B canadese) sono state trovate capaci di facilitare la transfezione virale del DNA nelle cellule epiteliali epatiche derivate dal fegato di scimpanzé, nelle cellule renali di scimmia rhesus, nel carcinoma umano, e nelle cellule NIH 3T3 fibroblastiche di topo. Tuttavia, la concentrazione di fibre d'asbesto necessaria per provocare la transfezione fu elevata (3-10 mg/ml). Una relazione lineare dose-risposta fu osservata a dosi più elevate, ma a 0,1 mg/ml fu trovata transfezione nulla o lieve. Appel *et al.* furono capaci di indurre vettori di plasmidi di DNA in cellule cos-7 di scimmia impiegando fibre di campioni di asbesto crisotilo B canadese con diametro medio di 7 μm e lunghezze comprese nell'intervallo 130-3 μm come agente transfettante. Pertanto, in condizioni sperimentali che impiegano elevate concentrazioni di fibre di asbesto, acidi nucleinici possono essere inseriti nel genoma cellulare. Ke *et al.* hanno transfettato con successo cellule mesoteliali umane ed ottenuto cloni trasformati che erano morfologicamente indistinguibili dalle linee originarie trasformate. Di conseguenza, il DNA inserito può alterare l'espressione degli oncogeni e degli antioncogeni cellulari, in dipendenza dalle sedi dell'inserzione, oppure il DNA transfettato potrebbe possedere di per se stesso oncogeni che possono essere trasferiti dopo l'inserzione nel DNA genomico.

EVIDENZE A FAVORE DELLA GENOTOSSICITA' INDIRETTA

Ci sono due meccanismi potenziali in cui le fibre di asbesto possono provocare la formazione di specie reattive dell'ossigeno. A loro volta, queste specie reattive dell'ossigeno possono agire come messaggeri secondari nel provocare genotossicità. Un meccanismo implica il trasferimento di elettroni dalle fibre di asbesto (crisotilo con una lunghezza media della fibra di 6 μm) a molecole cellulari che, quindi, possono interagire col DNA. Il secondo meccanismo implica una risposta flogistica prodotta dall'asbesto che provoca l'accumulo di macrofagi e di leucociti polimorfonucleati, che libera specie reattive di ossigeno come i radicali liberi superossidi e perossido di idrogeno, i quali successivamente interagiscono col DNA causando mutazioni.

Wong *et al.* suggerirono che il ferro ferroso presente in certe fibre di asbesto può ridurre l'ossigeno per formare il radicale superossido. L'anione superossido può quindi portare alla

formazione di altre specie reattive dell'ossigeno, quali il perossido di idrogeno ed il radicale libero idrossile. Eberhardt *et al.* e Weitzman e Graceffa hanno dimostrato che le fibre di asbesto possono catalizzare la formazione sia del radicale superossido sia del radicale idrossilico dal perossido di idrogeno. Mossman *et al.* riportarono che l'asbestosi nel ratto provocata dall'inalazione di fibre di asbesto crocidolite può essere inibita se gli animali sono trattati con catalasi, la quale converte il perossido di idrogeno in acqua. La citotossicità per le cellule epiteliali di trachea di criceto indotta da fibre di asbesto crocidolite e crisotilo di lunghezze comprese tra $> 10 \mu\text{m}$ e $< 2 \mu\text{m}$ può essere inibita dalla perossido-dismutasi, la quale converte il radicale superossido ad H_2O_2 , e mediante gli *scavenger* del radicale idrossilico. La catalasi fu inefficace nel proteggere le cellule dalla tossicità dell'asbesto, ma il mannitolo e la dimetiltiourea, entrambi *scavenger* del radicale libero idrossile, erano molto efficaci nel diminuire la tossicità per la cellula. Il perossido di idrogeno è necessario per generare il radicale idrossilico; pertanto è sorprendente che la catalasi non abbia avuto un effetto protettivo. Similmente alla superossido dismutasi, verosimilmente la catalasi non penetra la parete cellulare. Una spiegazione può essere che il perossido di idrogeno non è formato sulla superficie della membrana esterna, ma lo sia invece l'anione superossido. A differenza della catalasi e della superossido-dismutasi, il mannitolo e la dimetiltiourea sono capaci di entrare nella cellula e di interagire coi radicali idrossilici. Quando il tempo di esposizione all'asbesto è aumentato, l'attività della superossido-dismutasi è indotta nelle cellule.

Fisher *et al.* riportarono che il riscaldamento delle fibre di asbesto crisotilo diminuiva il loro legame all'albumina sierica, ma che le radiazioni ionizzanti potrebbero ripristinare la capacità di legarsi alle proteine. Erano anche analizzati gli effetti dell'asbesto trattato o non trattato sulla citotossicità e sulla vitalità cellulare dei fibroblasti della cute della fronte e delle cellule macrofagiche bovine. Per entrambi i tipi cellulari, le fibre di asbesto riscaldato erano meno tossiche di quelle non trattate, trattate con radiazioni, e dell'asbesto trattato con calore e con radiazioni. Un possibile meccanismo coerente con questi risultati implica la liberazione o la fuga di elettroni metastabili all'interno del minerale con la riacquisizione degli elettroni attivati dopo la radiazione. La tossicità dell'asbesto può essere attribuita alle fibre che prendono contatto con la cellula e che trasferiscono elettroni alla superficie cellulare oppure, al momento di entrare nella cellula, il trasferimento degli elettroni potrebbe avvenire dalle fibre di asbesto su diverse biomolecole provocando danno genetico, causa di cancerogenesi.

Valentine *et al.* hanno anche dimostrato che il pretrattamento con calore di fibre di asbesto crisotilo con lunghezze di fibra di $6 \mu\text{m}$ riduceva la citotossicità nei confronti delle cellule fibroblastiche umane e dei macrofagi alveolari bovini e che la riattivazione degli effetti citotossici si verificava quando le fibre erano irradiate con radiazioni X. Leanderson *et al.* hanno dimostrato che l'incubazione di fibre di asbesto crisotilo con 2-deossiguanosina produceva 8-idrossideossiguanosina. Ciò dimostrò che, in certe condizioni di laboratorio, l'asbesto ha la capacità di modificare le basi del DNA attraverso una reazione mediata da radicali idrossilici. Se questa reazione avviene *in vivo*, la base alterata potrebbe portare ad un danno genetico ed a mutazioni.

Moalli *et al.* hanno dimostrato che le fibre di asbesto crocidolite iniettate nel cavo peritoneale del topo provocavano una risposta infiammatoria ed un danno delle cellule mesoteliali, con successiva rigenerazione. Le fibre di asbesto erano primariamente trovate aggregate presso gli orifici dei vasi linfatici sulla superficie peritoneale del diaframma. Le fibre si accumulavano in queste sedi durante i primi tre giorni successivi all'iniezione ed alcune vi rimanevano ancora dopo 6 mesi. Emorragia dalla superficie peritoneale del diaframma si manifestava e c'era un accumulo di neutrofili e di macrofagi attorno agli agglomerati di fibre. La risposta flogistica, come la presenza di macrofagi nei siti di deposizione, persisteva anche fino a sei mesi. Altre ricerche di Warheit *et al.* e Brody *et al.* hanno dimostrato che fibre di asbesto crisotilo possono depositarsi sulla biforcazione dei dotti alveolari nel polmone di ratto e che i macrofagi polmonari si accumulano in questi siti di deposizione. Altre ricerche di Warheit *et al.* hanno dimostrato che le fibre di asbesto incrementano le risposte polmonari chemiotattiche per i macrofagi e possono portare ad una migrazione aggiuntiva di cellule macrofagiche verso i siti di deposizione dell'asbesto. Goodglick e Kane hanno dimostrato che le fibre di asbesto crocidolite possono stimolare i macrofagi peritoneali del topo a produrre/liberare specie reattive dell'ossigeno *in vivo* e la rigenerazione continuativa di cellule "bersaglio" (per esempio cellule

mesoteliali) nelle stesse vicinanze potrebbe portare ad alterazioni genetiche causative per la trasformazione delle cellule mesoteliali.

L'ASBESTO COME UN PROMOTORE DEL CANCRO

Topping e Nettesheim dimostrarono che le fibre di asbesto crisotilo promuovono tumori nei trapianti tracheali nel ratto F344 nella regione retroscapolare in soggetti riceventi isogenici di otto settimane di età. Il dimetilbenzantracene (DMBA) fu impiegato per iniziare le cellule trapiantate che erano state esposte a fibre di asbesto nella sede del trapianto. Nessun carcinoma fu trovato negli animali trattati col solo DMBA oppure negli animali esposti al solo asbesto. Tuttavia, usando sia l'iniziatore (25 μg) sia il promotore (200 μg), l'incidenza del carcinoma crebbe a 9/40 (23%). Una ricerca precedente dimostrò che una concentrazione di asbesto di 2000 μg fu necessaria per ottenere un incremento del 5% dell'incidenza del carcinoma tracheale senza alcuna iniziazione.

Topping e Nettesheim riportarono che la cancerogenesi tracheale nel ratto fu aumentata dal 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA), il ben noto promotore del tumore cutaneo, ma quando somministrato da solo non fu capace di iniziare una risposta cancerosa. Similmente alle fibre di asbesto, gli esteri del forbolo stimolano la produzione di specie reattive dell'ossigeno e inducono la rottura dei filamenti del DNA e, come con l'asbesto, le risposte di tossicità, come l'attività promozionale del TPA, possono essere inibite dagli antiossidanti. Gli esteri del forbolo sono stati ampiamente studiati rispetto alla loro attività di promozione cancerogenetica ed è stato dimostrato che essi provocano alterazioni nelle membrane cellulari, generano specie reattive dell'ossigeno, aumentano la perossidazione lipidica, incrementano certe attività enzimatiche, aumentano la sintesi dei fosfolipidi, alterano la metilazione delle macromolecole, e provocano un danno cromosomico. La promozione può agire all'inizio attraverso interazioni con le membrane cellulari e stimolare la perossidazione lipidica la quale, a sua volta, con tappe intermittenti, produce specie di radicali liberi che raggiungono e danneggiano il materiale genetico. Yano ha dimostrato che le fibre di asbesto crisotilo e crocidolite possono portare alla formazione di malonildialdeide, un prodotto della perossidazione lipidica stimolata dai radicali liberi, nelle cellule polimorfonucleari neutrofile umane, nei macrofagi peritoneali della cavia e nelle cellule del liquido di lavaggio alveolare.

Weinstein ha passato in rassegna lo stato attuale degli effetti del TPA sulla chinasi proteica C (PKC). La PKC svolge un ruolo cardine nella trasduzione del segnale nella cellula che implica l'attivazione degli oncogeni, la crescita cellulare, e la promozione del tumore. La PKC è il recettore primario del TPA e l'estere del forbolo si lega ad un sito allosterico dell'enzima, aumentando la sua capacità di fosforilare il substrato proteico. Cox *et al.* hanno riferito che la PKC fosforila un'ossidasi NADPH sulla membrana plasmatica che catalizza la riduzione dell'ossigeno ad anione superossido. La stimolazione da PKC incrementa inoltre le concentrazioni di ornitina decarbossilasi (ODC), che è il fattore limitante nella biosintesi delle poliamine necessarie nell'iniziare la divisione cellulare. Marsh e Mossman hanno dimostrato anche che le fibre di asbesto crisotilo e crocidolite inducono l'ornitina decarbossilasi (ODC) nelle cellule epiteliali di trachea di criceto coltivate in vitro, ma che l'attività dell'ODC è significativamente ridotta quando gli antagonisti dell'ingresso del calcio (verapamil o nifedipina) sono aggiunti alla coltura. Essi trovarono che le fibre più lunghe erano più efficaci nella stimolazione dell'attività enzimatica. Inoltre, la palmitoilcarnitina e la 1-(5-isochinolinilsulfonil)-2-metilpiperazina, inibitori della PKC, erano anche efficaci nel bloccare l'attività della ODC che era stimolata dalle fibre di asbesto. Pare non verosimile che le fibre di asbesto promuovano le cellule, creino specie reattive dell'ossigeno, e stimolino enzimi simili alla ODC in modo paragonabile alla TPA. La TPA può legarsi direttamente alla PKC ed attivare l'enzima. Tuttavia, verosimilmente le fibre di asbesto interagiscono con la membrana plasmatica, provocando l'entrata di calcio nella cellula, il quale attiva la PKC e può stimolare le fosfolipasi di membrana. Le fosfolipasi idrolizzano i fosfatidilinositoli di membrana e formano diacilglicerolo ed inositolo 1.4.5-trifosfato. Il diacilglicerolo è un attivatore della PKC e l'inositolo 1.4.5-trifosfato provoca il rilascio delle scorte intracellulari di calcio. Sia il diacilglicerolo sia il calcio si legano al sito regolatorio della PKC ed inducono un cambiamento conformazionale che incrementa l'attività catalitica dell'enzima. Roney e Holian hanno esaminato gli effetti degli inibitori della PKC

(flufenazina o staurosporina) nel bloccare la produzione di anione superossido da parte delle fibre di asbesto ed il promotore, forbolo 12,13-dibutirrato, nei macrofagi alveolari di cavia. Tutti questi inibitori della PKC riducono l'entità della produzione dell'anione superossido. Gli autori postularono che verosimilmente l'asbesto stimoli la fosfolipasi C della membrana per produrre diacilglicerolo e inositolo 1.4.5-trifosfato, che porta all'aumento della concentrazione intracellulare di calcio che, a sua volta, incrementa l'attività della PKC. La PKC quindi è responsabile dell'induzione dell'ossidasi NADPH di membrana per produrre anione superossido che porta ad altre specie reattive dell'ossigeno ed attiva gli oncogeni che influenzano la crescita e la differenziazione della cellula. Tuttavia, la crocidolite, l'antofillite e l'amosite non stimolano la produzione di anione superossido tanto efficacemente come le fibre di crisotilo.

Gabrielson *et al.* esposero cellule mesoteliali di polmone umano in coltura a fibre di asbesto amosite e non riuscirono a rilevare alcuna produzione di radicali, né *scavenger* di radicali liberi (glutazione, n-acetil-cisteina, D-alfa-tocoferolo, o superossido dismutasi) modificarono gli effetti citotossici dell'asbesto. Questi risultati sono in contrasto con altre ricerche descritte in precedenza. Le differenze possono esser dovute in parte alle differenze dei tipi cellulari e delle condizioni sperimentali, così come alle differenze nelle caratteristiche delle fibre dell'asbesto.

DISCUSSIONE

Sei sono i meccanismi potenziali della iniziazione e della promozione del cancro causato dalle fibre di asbesto. Essi sono riassunti in figura 5.

Il *meccanismo [I]* implica che le fibre di asbesto penetrino nelle cellule bersaglio, che interagiscano con il DNA, e provochino aberrazioni cromosomiche (mutazioni). A seconda della gravità e della localizzazione della mutazione, alcune cellule non sopravvivranno, altre cellule possono sopravvivere e continuare a funzionare normalmente, mentre altre ancora possono avere un'espressione abnorme del DNA che potrebbe costituire la tappa d'iniziazione nel processo della cancerogenesi. Le fibre di asbesto interagiscono prontamente con le proteine sia all'esterno sia all'interno delle cellule. Questi tipi di interazioni possono competere effettivamente col DNA genomico per le fibre di asbesto e di conseguenza possono servire a proteggere la cellula dalle mutazioni provocate dall'asbesto. Poiché esistono molte macromolecole disponibili a legarsi alle fibre di asbesto, pare che a basse concentrazioni di fibre, poche, se non nessuna, possano entrare nel nucleo ed interagire col DNA.

Il *meccanismo [II]* illustra la capacità delle fibre di asbesto di interagire con i frammenti di DNA e di agire come veicolo per i frammenti verso l'interno della cellula per l'inserimento nel DNA del genoma. Sono stati eseguiti esperimenti *in vitro* con fibre di asbesto a concentrazioni sia di frammenti di DNA sia di fibre tali da rendere massima la trasformazione; è opinabile se esistano *in vivo* condizioni ottimali in cui possa verificarsi la mutagenesi per inserzione secondo questo processo. Tuttavia, recenti risultati sperimentali hanno dimostrato che frammenti di DNA sono presenti all'esterno della membrana cellulare e possono costituire circa l'1% del DNA cellulare totale. Inoltre, le risposte infiammatorie provocate dalle fibre di asbesto portano alla distruzione di macrofagi e cellule mesoteliali (*meccanismo [VI]*), che possono rilasciare frammenti degradati di DNA genomico. Pertanto, *in vivo*, frammenti di DNA sono disponibili a legare fibre di asbesto che possono essere inserite nel DNA di cellule normali. La verosimiglianza che questo meccanismo si verifichi *in vivo* e contribuisca alla cancerogenicità dell'asbesto a bassi livelli di esposizione è opinabile dal momento che le concentrazioni sia del veicolo sia dei frammenti degli acidi nucleinici nelle sedi di deposizione dell'asbesto possono non essere sufficienti a provocare la transfezione del DNA frammentato nel DNA genomico. Le fibre di asbesto sono state viste interagire coi cromosomi e sono state proposte capaci di interagire con le proteine strutturali del citoscheletro e sono state viste indurre aneuploidia e poliploidia. Le cellule sbilanciate nel patrimonio cromosomico sono abnormi e possono essere implicate nel processo della cancerogenesi da asbesto. Gibas *et al.*, Popescu *et al.* e Tiainen *et al.* riportarono che alte incidenze di anomalie numeriche dei cromosomi sono presenti nelle cellule mesoteliali umane, e che le frequenze di certe anomalie possono essere non casuali. Oshimura *et al.* riferirono che l'esposizione di cellule embrionali di criceto siriano a fibre di asbesto

portavano ad un incremento dose dipendente in modo non lineare di cellule aneuploidi, tetraploidi, e binucleate, e che le modificazioni citogenetiche, per primo l'aneuploidia, erano in accordo con la trasformazione cellulare.

Il *meccanismo* [III] illustra il legame delle fibre di asbesto alla tubulina, una proteina che costituisce l'apparato del fuso necessario alla separazione dei cromosomi durante la divisione cellulare. E' ancora sconosciuto se le abnormalità cromosomiche siano parte del processo di induzione della cancerogenesi dovuta all'asbesto oppure se esse possano essere alterazioni secondarie non specifiche che evolvono nel corso della progressione della crescita delle cellule maligne.

Il *meccanismo* [IV] illustra che le fibre di asbesto possono trasferire elettroni verso molecole cellulari dopo essere entrate nella cellula oppure interagendo alla superficie di membrana; le molecole cellulari a loro volta interagiscono col DNA genomico e provocano mutazioni.

Il *meccanismo* [V] dimostra l'attività promozionale dell'asbesto in cui l'asbesto si lega ai siti di membrana e causa effetti epigenetici che all'inizio alterano l'accrescimento e le funzioni della cellula. Queste alterazioni cellulari nell'espressione del DNA in una cellula già iniziata (cellula trasformata) possono provocare il suo progredire verso una cellula cancerosa e, stimolando le specie reattive dell'ossigeno, provocare una seconda mutazione (trasformazione) che può essere necessaria per la formazione di una cellula cancerosa. L'entità della risposta promozionale dipende dal numero delle interazioni dell'asbesto con i siti "recettori" (se esistono siti recettoriali specifici) sulla superficie della membrana cellulare. Le cinetiche del legame dell'asbesto ai siti "recettori" di membrana e l'entità dell'attività promozionale non sono disponibili, ma le cinetiche potrebbero essere verosimilmente non lineari, e può esistere un livello soglia necessario per stimolare l'attività promozionale sufficiente.

Il *meccanismo* infiammatorio indotto dall'asbesto [VI] è sfaccettato in quanto le fibre dell'asbesto attraggono i macrofagi, alcuni dei quali sono distrutti e rilasciano specie reattive dell'ossigeno e frammenti di DNA e provocano il rilascio di fattori stimolanti la crescita dei macrofagi che porta alla rigenerazione cellulare nei siti di deposito. La liberazione di specie reattive dell'ossigeno può indurre mutazioni nelle cellule vicine in via di divisione; i frammenti di DNA derivati dai macrofagi distrutti possono legarsi alle fibre di asbesto, e venire trapiantati in cellule confinanti in cui frammenti di DNA possono essere inseriti nel DNA genomico (*meccanismo* [II]). Le linee tratteggiate nella figura 1 rappresentano gli effetti di contributo che la risposta infiammatoria può avere sugli altri meccanismi ipotizzati nello stimolare la divisione cellulare e nel rendere un maggior numero di cellule bersaglio disponibili ad essere trasformate e rilasciando frammenti di DNA che potrebbero essere inseriti nel DNA genomico.

Tutti i sei *meccanismi* presentati qui potrebbero essere implicati nel mesotelioma causato da asbesto e nel cancro polmonare, e possono variare rispetto al tipo cellulare. Certi possono verificarsi realisticamente solo con molto elevate concentrazioni di fibre di asbesto ed è verosimile che si verifichino *in vitro* in condizioni di laboratorio. Tuttavia i *meccanismi* [V] e [VI] sono stati dimostrati *in vivo*, ma un adeguato rapporto dose-risposta per l'impiego nella valutazione quantitativa del rischio non è ancora disponibile. Questa ha sempre sofferto della carenza di informazioni sui meccanismi d'azione dei cancerogeni, rendendo necessario estrapolare a livelli ambientali accettabili ed assumere conservativamente che un'interazione col DNA risulterebbe nello sviluppo di un tumore e che l'incidenza del tumore è direttamente proporzionale alla concentrazione. Dati sufficienti stanno ora divenendo disponibili per dimostrare i diversi aspetti molecolari della cancerogenicità dell'asbesto al fine di programmare esperimenti per determinare i meccanismi molecolari pertinenti e le relazioni dose-risposta che si verificano in vivo ai livelli ambientali di esposizione. Queste nuove informazioni possono essere impiegate per determinare i rischi di cancro da asbesto più accuratamente per finalità regolatorie rispetto a quanto sono ora capaci di fare i modelli basati sull'estrapolazione matematica.

