

PROGETTO PRIN 2017

FIBRES: a multidisciplinary mineralogical, crystal-chemical and biological project to amend the paradigm of toxicity and cancerogenicity of mineral fibres. [Prot. 20173X8WA4](#)

GIOVEDÌ 07/07/2022

**Unità Operativa Univpm
Ancona**

S. Di Valerio, S. Vaiasicca, F. Fazioli, A. D. Procopio, A. Pugnali



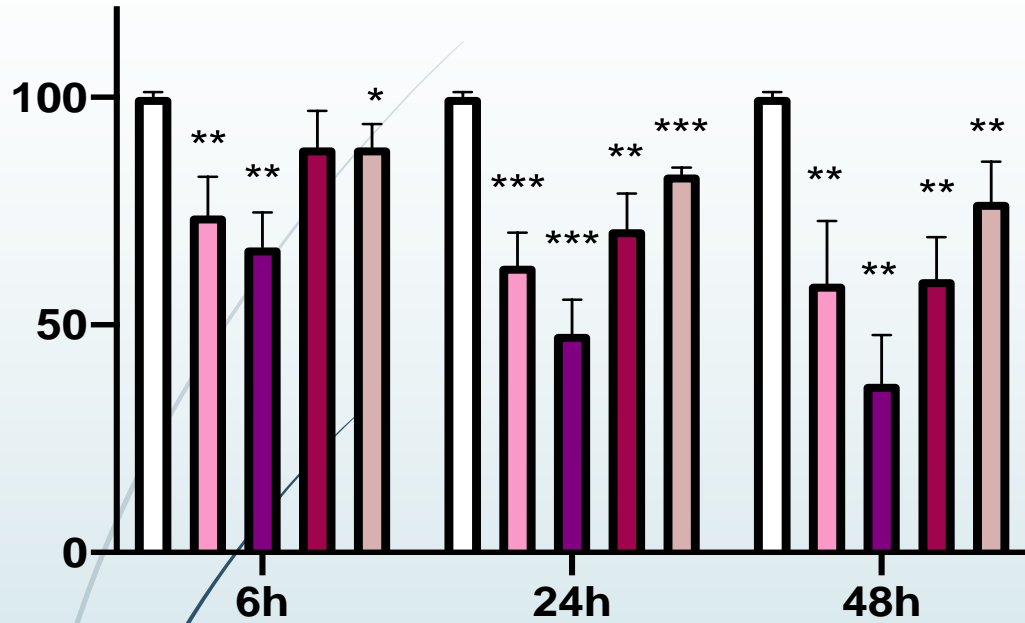
**UNIVERSITÀ
POLITECNICA
DELLE MARCHE**

Risultati esperimenti Chry-Ru: R1= <5µg, R2= >5µg

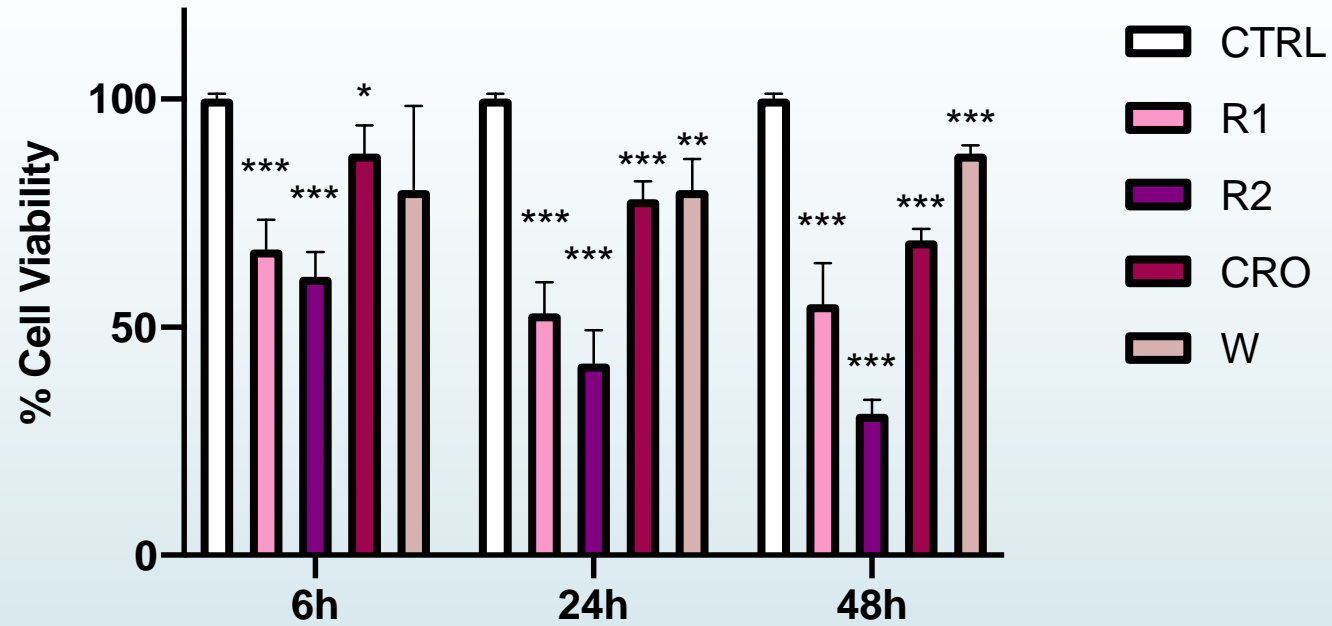
- ▶ Fibre analizzate: Cro-UICC, Chry-Ru <5µg, Chry-Ru > 5µg, W
- ▶ Concentrazione fibre: 50µg/ml
- ▶ Linee cellulari: MeT5a, A549, Thp1
- ▶ Time point esperimenti: 6, 24, 48h

Vitalità: MTT

MeT5A



A549



- CTRL
- R1
- R2
- CRO
- W

CTRL: 1 R1: 2 R2: 3 CRO: 4 W: 5

MeT5A	6h	24h	48h
T test P<0.05	1-2, 1-3, 1-5 3-4, 3-5	1-2, 1-3, 1-4, 1-5 2-5 3-4, 3-5	1-2, 1-3, 1-4, 1-5 2-3 3-4, 3-5

A549	6h	24h	48h
T test P<0.05	1-2, 1-3, 1-4 2-4 3-4	1-2, 1-3, 1-4, 1-5 2-4, 2-5 3-4, 3-5	1-2, 1-3, 1-4, 1-5 2-3, 2-5, 3-4, 3-5 4-5

MTT

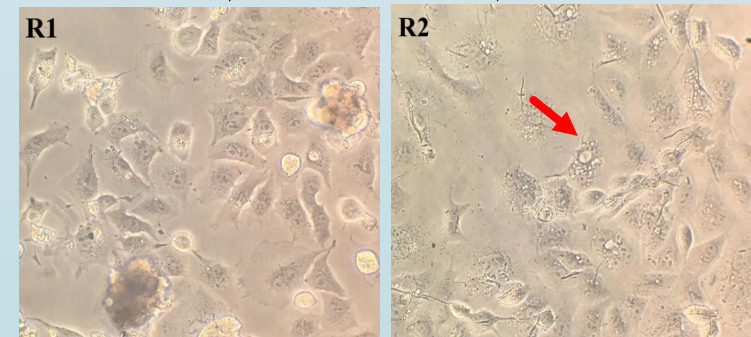
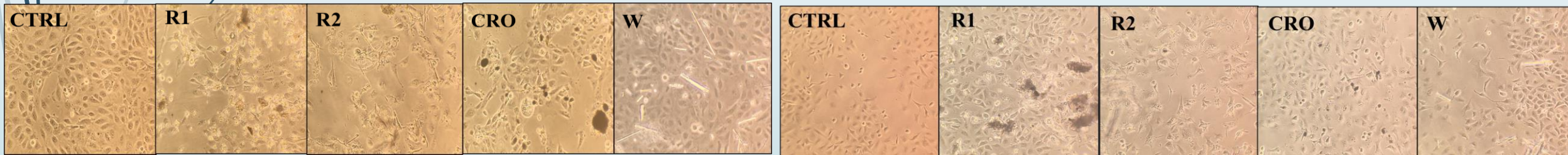
- Saggio colorimetrico MTT per comprendere in un primo step la citotossicità delle fibre sulle linee cellulari MeT5A e A549. Si osserva una citotossicità tempo dipendente (6, 24, 48h) per tutte le fibre, tuttavia principalmente dopo trattamento con R2

INDAGINE MICROSCOPIO OTTICO

- Da una prima osservazione al microscopio ottico, la fibra R2 presenta una maggiore vacuolizzazione all'interno delle cellule

MeT5A

A549



Punto 1 IARC: «*Is electrophilic or can be metabolically activated to electrophiles?*»

► EPR *spectroscopy* (DMPO adduct):

Chry-Ru <5µm; Chry-Ru> 5µm; Cro-UICC; W; Chry-UICC; Chry-VM; Eri-JN



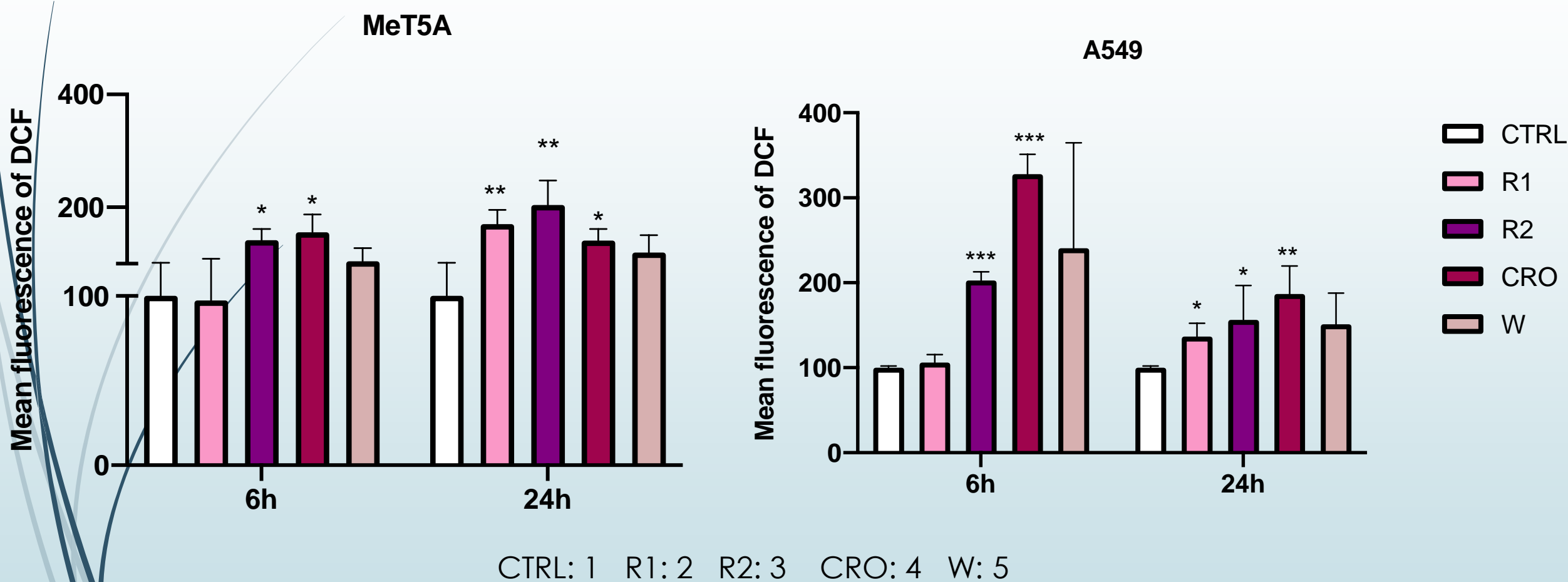
Segnale settaggio strumento di DMPO-OH dopo induzione con H₂O₂

ROS (*Reactive Oxygen Species*)

- ▶ La produzione di ROS, si ipotizza che sia dovuta alla reattività di superficie delle fibre di amianto, in quanto possiedono ioni. In particolare, hanno del ferro superficiale ed è riconosciuto che le stesse siano in grado di assorbire ferro *in vivo*. Questa situazione conduce a quella che viene definita reazione di Fenton coinvolta nella produzione di ROS e ad un alterato stato infiammatorio.
- ▶ Time point analizzati: 6, 24, 48h
- ▶ Risultato: sviluppo di stress ossidativo nell'ambiente cellulare

Punto 1 IARC: «Is electrophilic or can be metabolically activated to electrophiles?»

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI ROS (citofluorimetria con sonda DCFA)



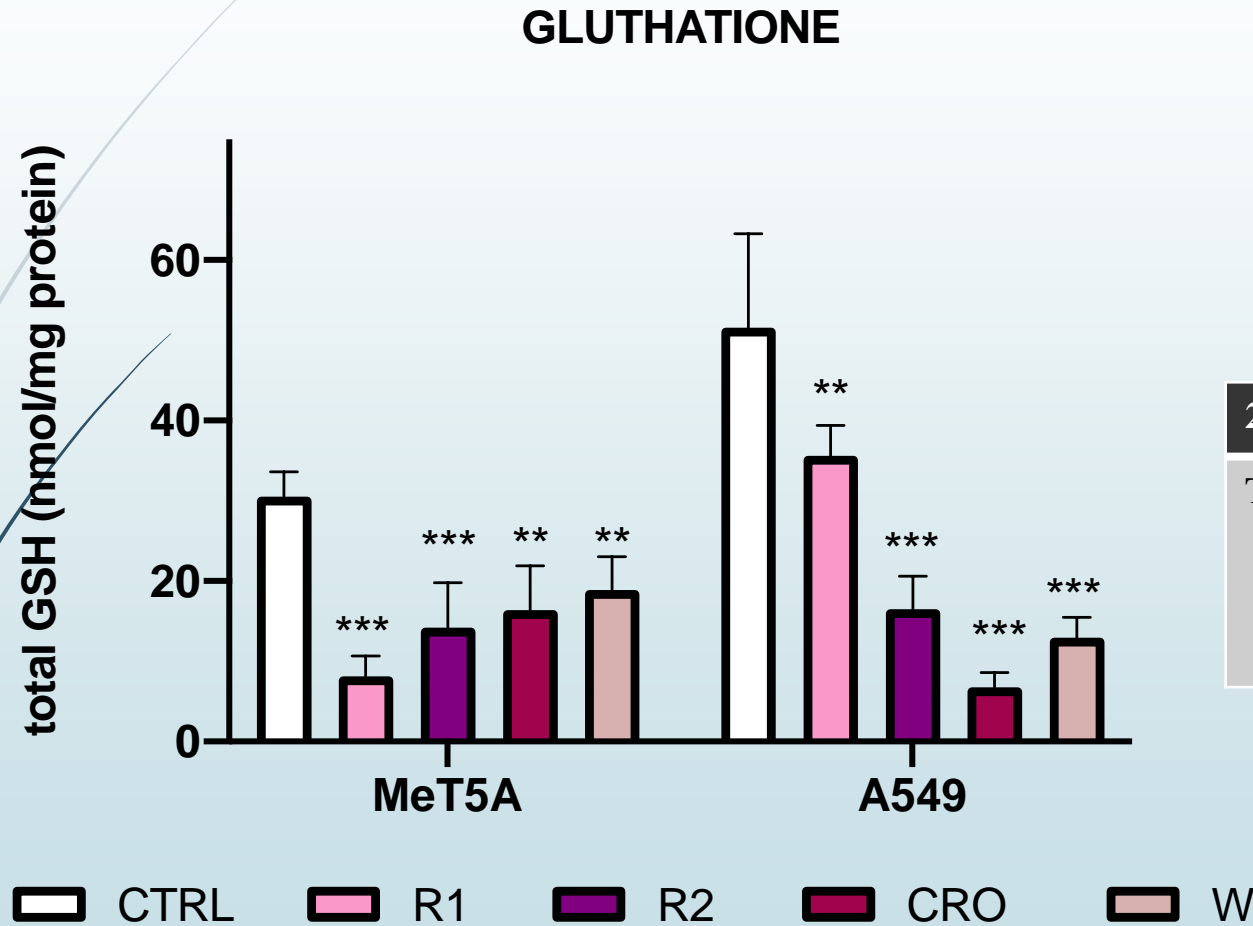
MeT5A	6h	24h
T TEST P<0.05	1-3, 1-4, 2-3, 2-4	1-2, 1-3, 1-4, 1-5

A549	6h	24h
T TEST P<0.05	1-3, 1-4, 2-3, 2-4 3-4	1-2, 1-3, 1-4, 1-5

Glutazione

- Il glutathione è uno dei maggiori antiossidanti prodotti nella cellula
- I suoi livelli sono stati analizzati successivamente alla valutazione dei livelli di produzione di ROS da parte delle due linee cellulari dopo esposizione alle varie fibre
- La deplezione dei livelli di glutathione è complementare ai livelli di produzione di ROS
- Time point analizzati: 6, 24, 48h

VALUTAZIONE LIVELLI DI DEPLEZIONE DEL GLUTATIONE TOTALE: 24h



CTRL: 1 R1: 2 R2: 3 CRO: 4 W: 5

24h	MET5A	A549
T TEST P<0.05	1-2, 1-3, 1-4 1-5 2-5 3-5	1-2, 1-3, 1-4, 1-5 2-3, 2-4, 2-5 3-4 4-5

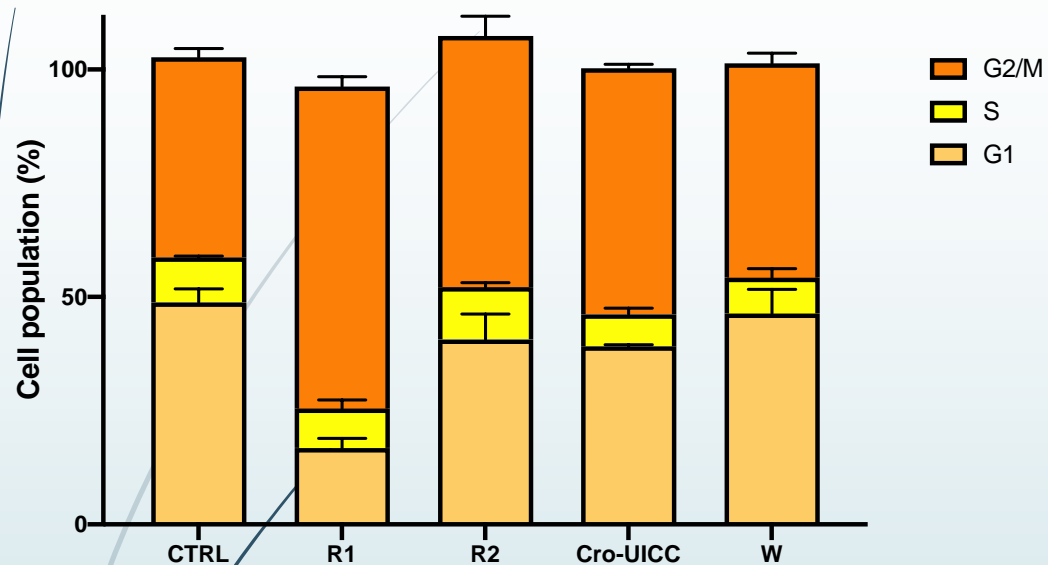
VALUTAZIONE DELLA PROGRESSIONE DEL CICLO CELLULARE

- ▶ Una maggiore percentuale di cellule nella fase G1 rispetto al controllo è interpretata come blocco proliferativo (come si può osservare nelle A549, maggiormente in seguito dopo contatto con R1 e W)
- ▶ Una maggiore percentuale di cellule nella fase G2/M rispetto al controllo è interpretata come presenza di danno al DNA (come si può osservare nelle MeT5A, maggiormente dopo trattamento con R1, R2 e Cro-UICC)
- ▶ Time point analizzati: 6, 24, 48h

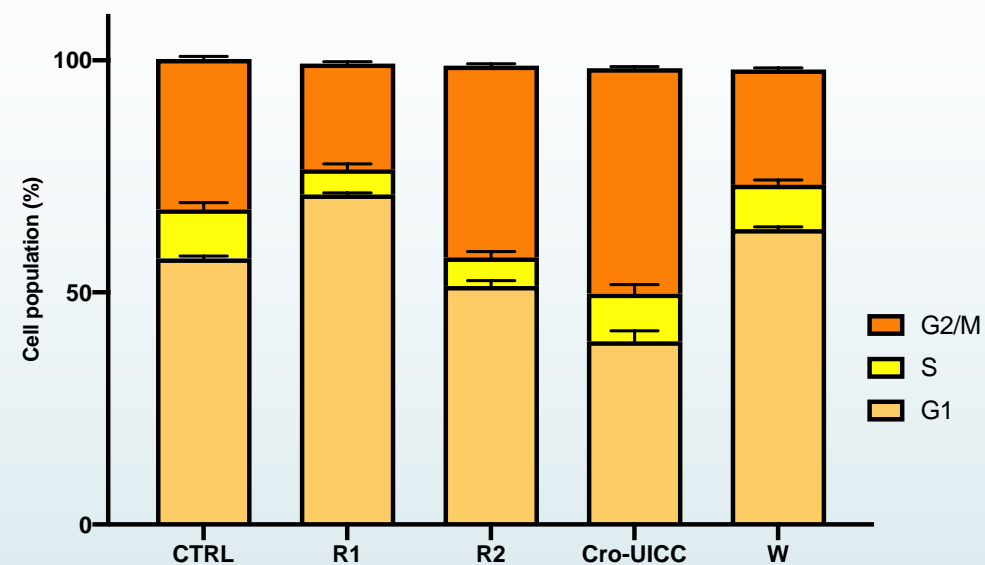
Punto 3 IARC: «Alters DNA repair or causes genomic instability?»

PROGRESSIONE DEL CICLO CELLULARE: 48h

MeT5A



A549



	G1		S		G2/M	
CTRL	48.8	2.96984848	9.935	0.23334524	43.95	1.90918831
R1	16.8	2.12132034	8.65	1.90918831	70.8	2.12132034
R2	40.65	5.58614357	11.5	0.98994949	55.25	4.31335137
Cro-UICC	39.15	0.35355339	7.025	1.35057395	54.1	0.84852814
W	46.35	5.30330086	7.89	1.93747258	47.1	2.2627417

	G1		S		G2/M	
CTRL	57.35	0.49497475	10.56	1.4707821	32.4	0.56568542
R1	71.1	0.35875441	5.44	1.1338561	22.8	0.3674621
R2	51.4	1.13137085	6.14	1.27279221	41.35	0.35355339
Cro-UICC	39.5	2.2627417	10.26	1.89504617	48.55	0.35355339
W	63.65	0.49497475	9.55	1.06066017	24.85	0.35355339

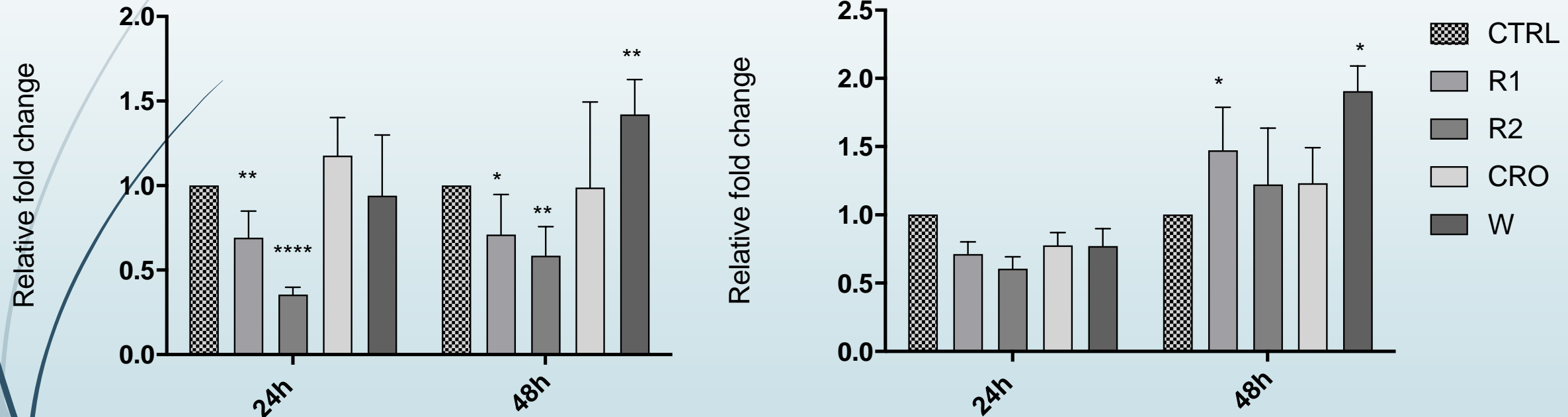
Punto 3 IARC: «Alters DNA repair or causes genomic instability?»

WB

MeT5A

Y-H2AX

RAD51



Yang,H.;Luo,J.;Liu,Z.;Zhou,R.;Luo,H.MicroRNA-138 Regulates DNA Damage Response in Small Cell Lung Cancer Cells by Directly Targeting H2AX. *Cancer Investig.* **2015**, 33, 126–136.

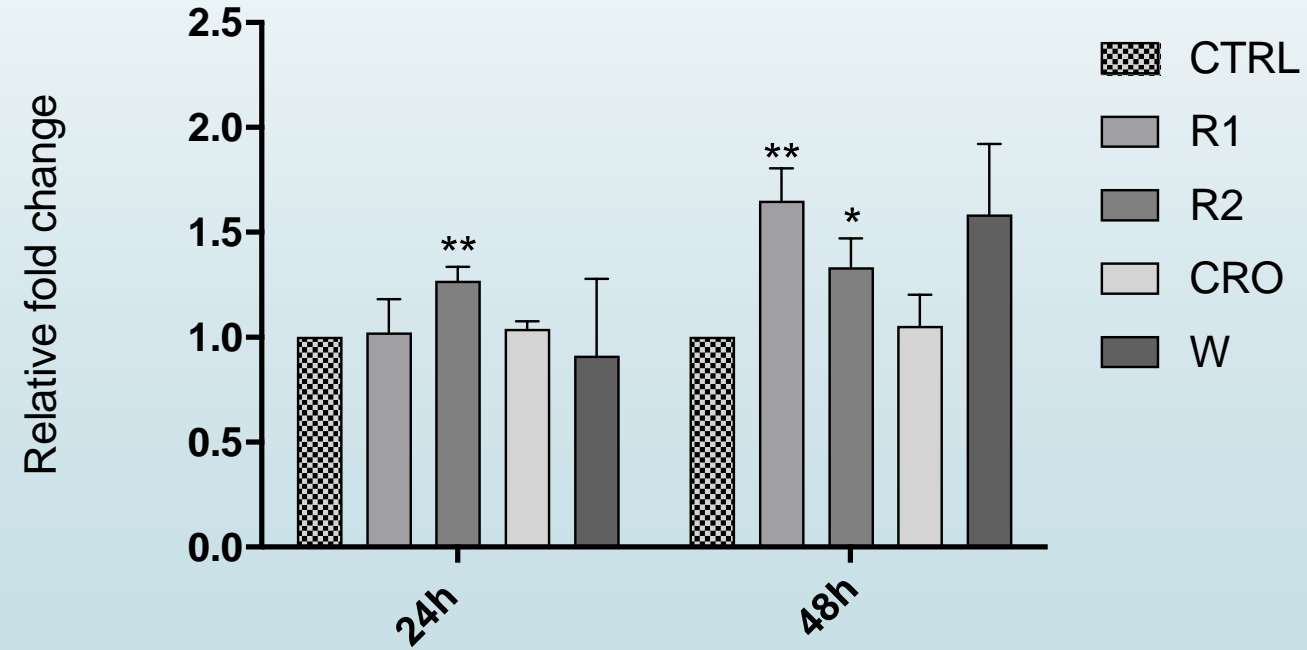
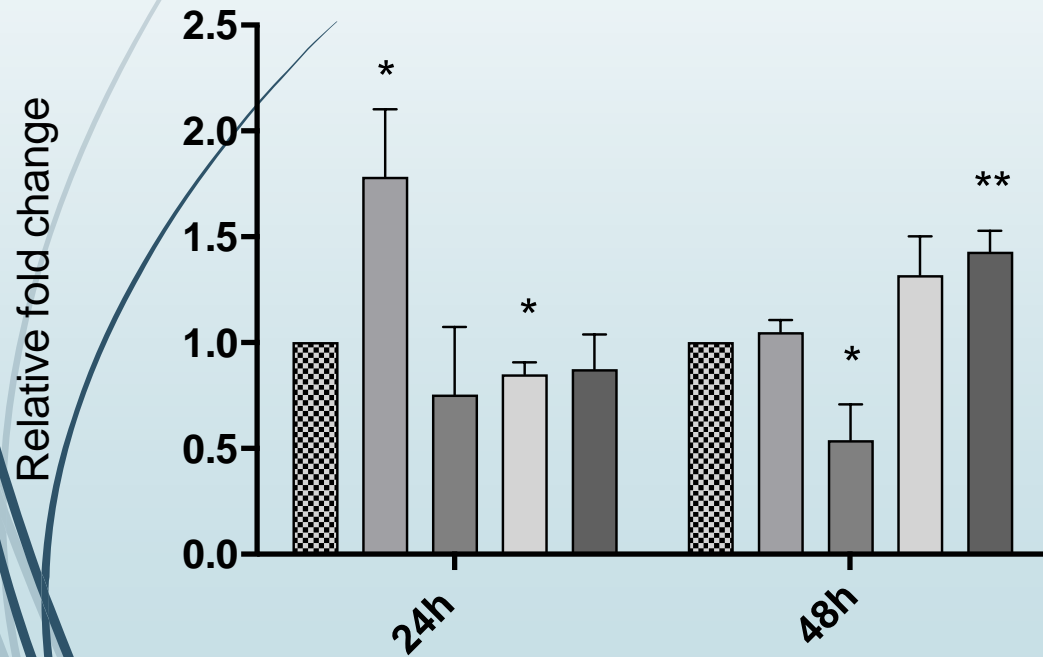
Punto 3 IARC: «Alters DNA repair or causes genomic instability?»

WB

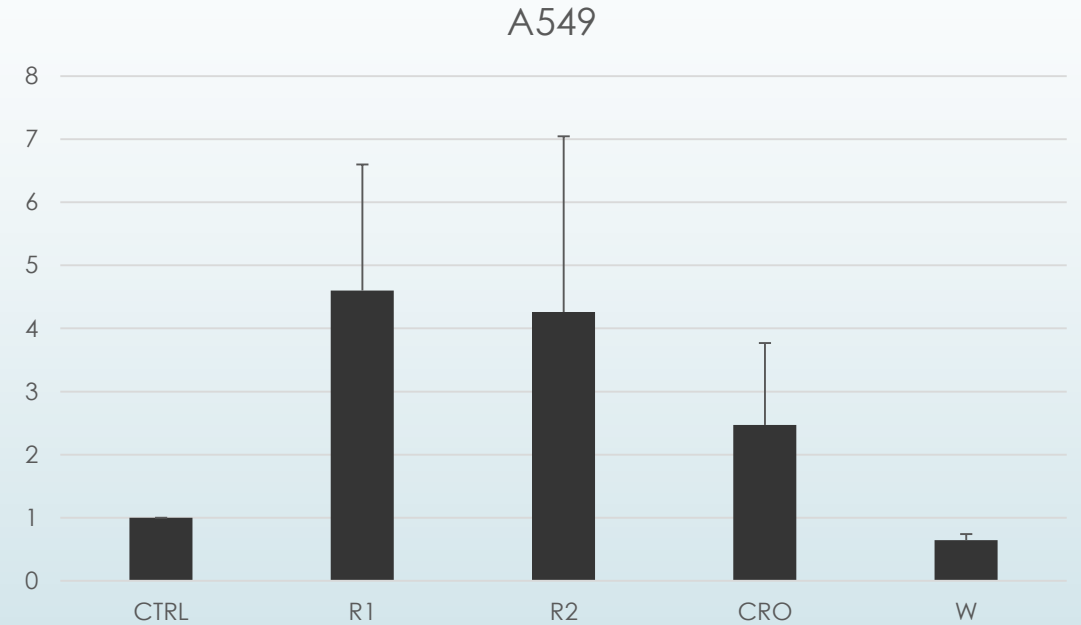
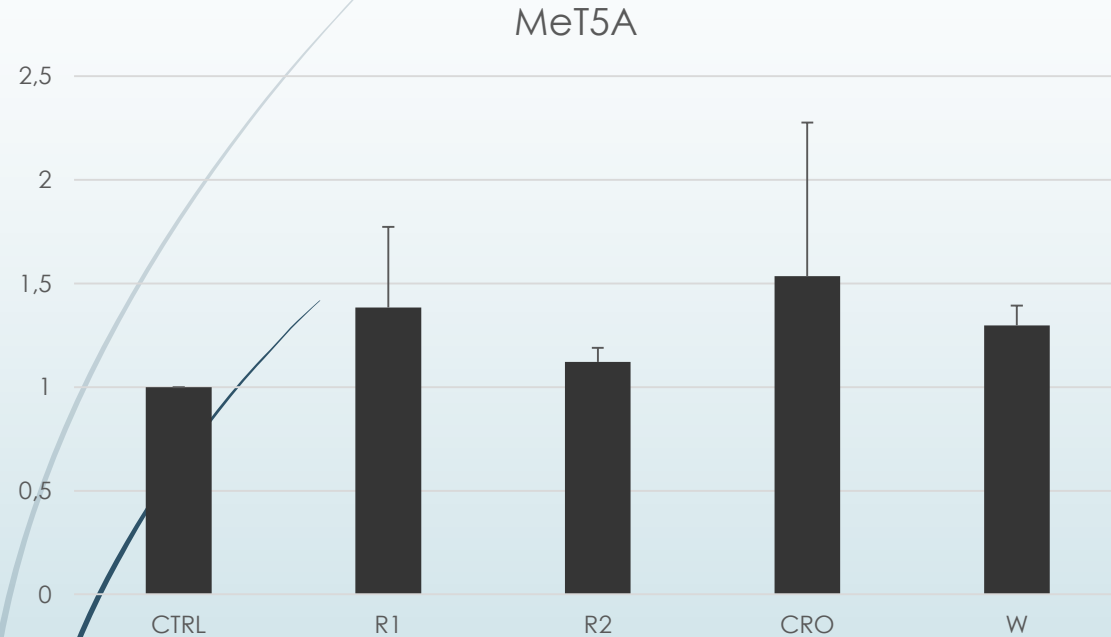
A549

Y-H2AX

RAD51



Mir138



Time point: 6h

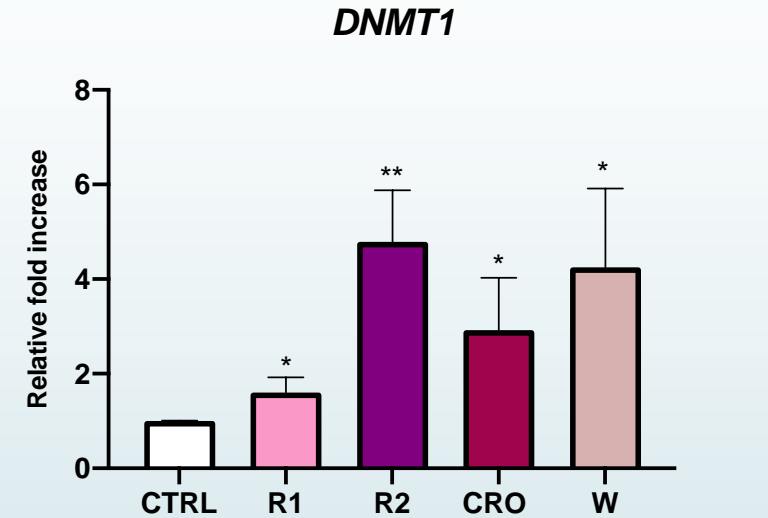
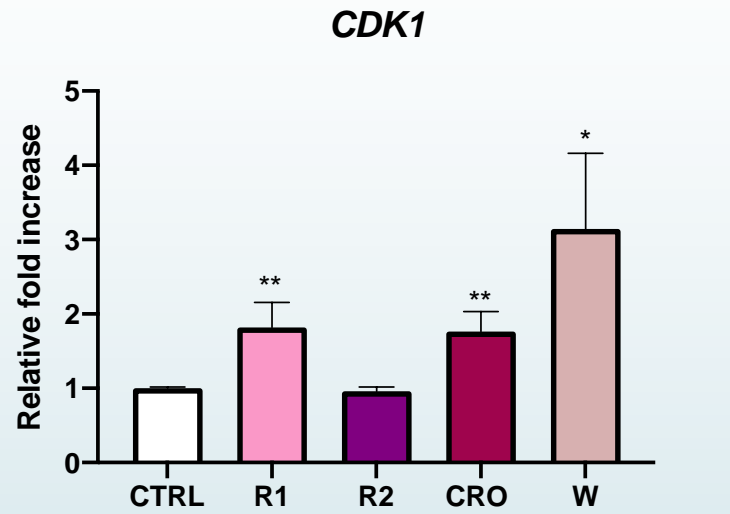
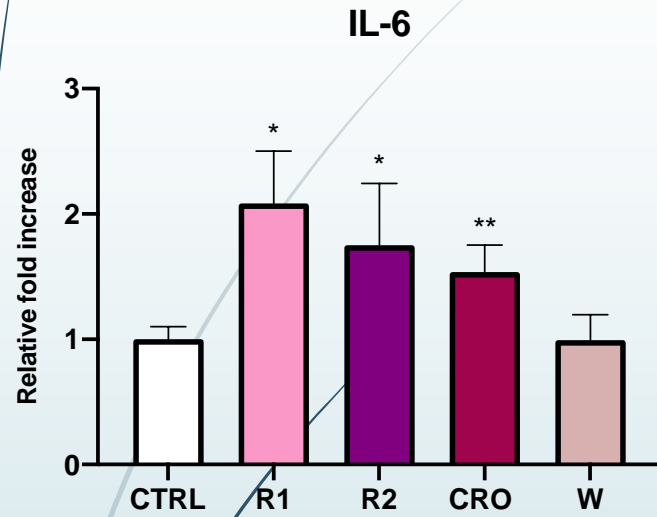
- Il knockdown di questo miR facilita il riparo del danno al DNA, con un decrement nei livelli di espressione H2AX.
- Una over espressione del miR138 ha come conseguenza: riduzione della crescita cellulare ed inibizione nella progressione del ciclo cellulare

Punto 3 IARC: «Alters DNA repair or causes genomic instability?»

Espressione genica

- ***Il-6***: analizzata per la sua attività pro-infiammatoria. Inoltre, lo stato infiammatorio può essere interpretato come una delle ulteriori fonti nella produzione di ROS. La presenza di un ambiente infiammatorio si presenta a livello cellulare, non solo per la presenza in sé delle fibre di asbesto, ma soprattutto per la reazione che queste esercitano sulle cellule definita fagocitosi frustrata. La fagocitosi frustrata conduce poi al rilascio nell'ambiente cellulare di citochine, chemochine e fattori di crescita che contribuiscono anche loro allo sviluppo di un ambiente infiammatorio
- ***Cdk1* (*Cyclin Dependent Kinase 1*)**: checkpoint fase G2/M
- ***Dnmt1* (*DNA methyltransferase 1*)**: gene coinvolto nel processo di metilazione

Real time 24h, MeT5A



CTRL R1 R2 CRO W
CTRL R1 R2 CRO W
CTRL R1 R2 CRO W

CTRL: 1 R1: 2 R2: 3 CRO: 4 W: 5

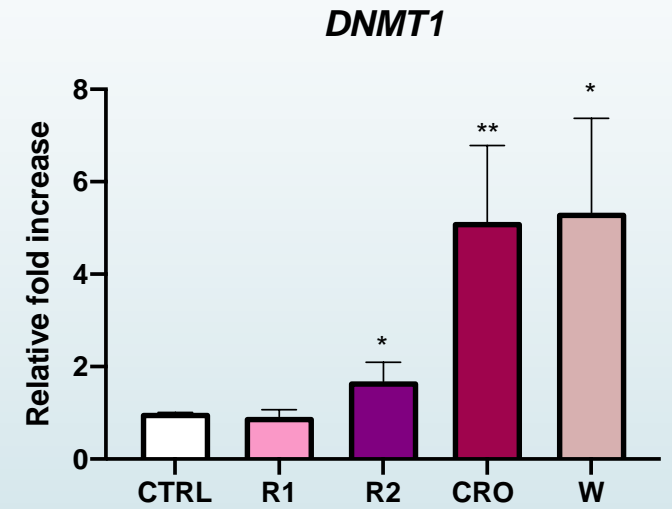
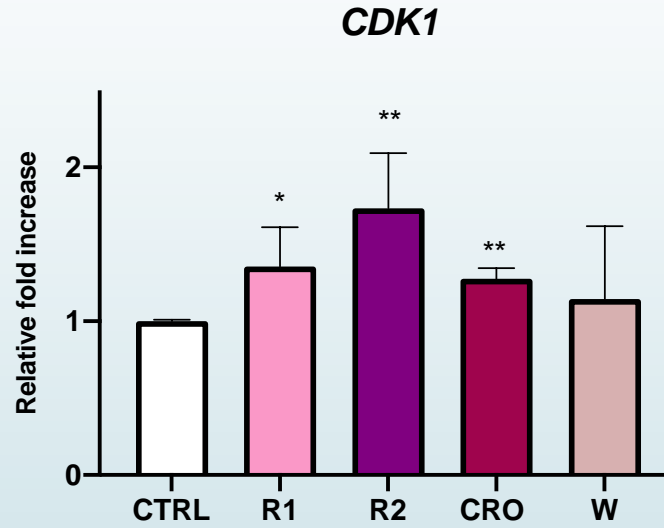
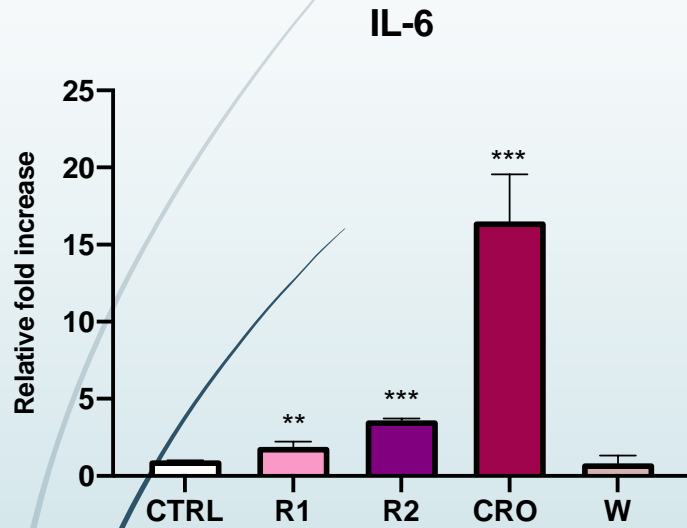
MeT5A	24h
T TEST P<0.05	1-2, 1-3, 1-4 2-5 4-5

MeT5A	24h
T TEST P<0.05	1-2, 1-4, 1-5 2-3 3-4, 3-5

MeT5A	24h
T TEST P<0.05	1-2, 1-3, 1-4, 1-5 2-3

Real time 24h, A549

CTRL: 1 R1: 2 R2: 3 CRO: 4 W: 5



CTRL
 R1
 R2
 CRO
 W
 CTRL
 R1
 R2
 CRO
 W
 CTRL
 R1
 R2
 CRO
 W

A549	24h
T TEST P<0.05	1-2, 1-3, 1-4 2-3, 2-4, 2-5 3-4, 3-5 4-5

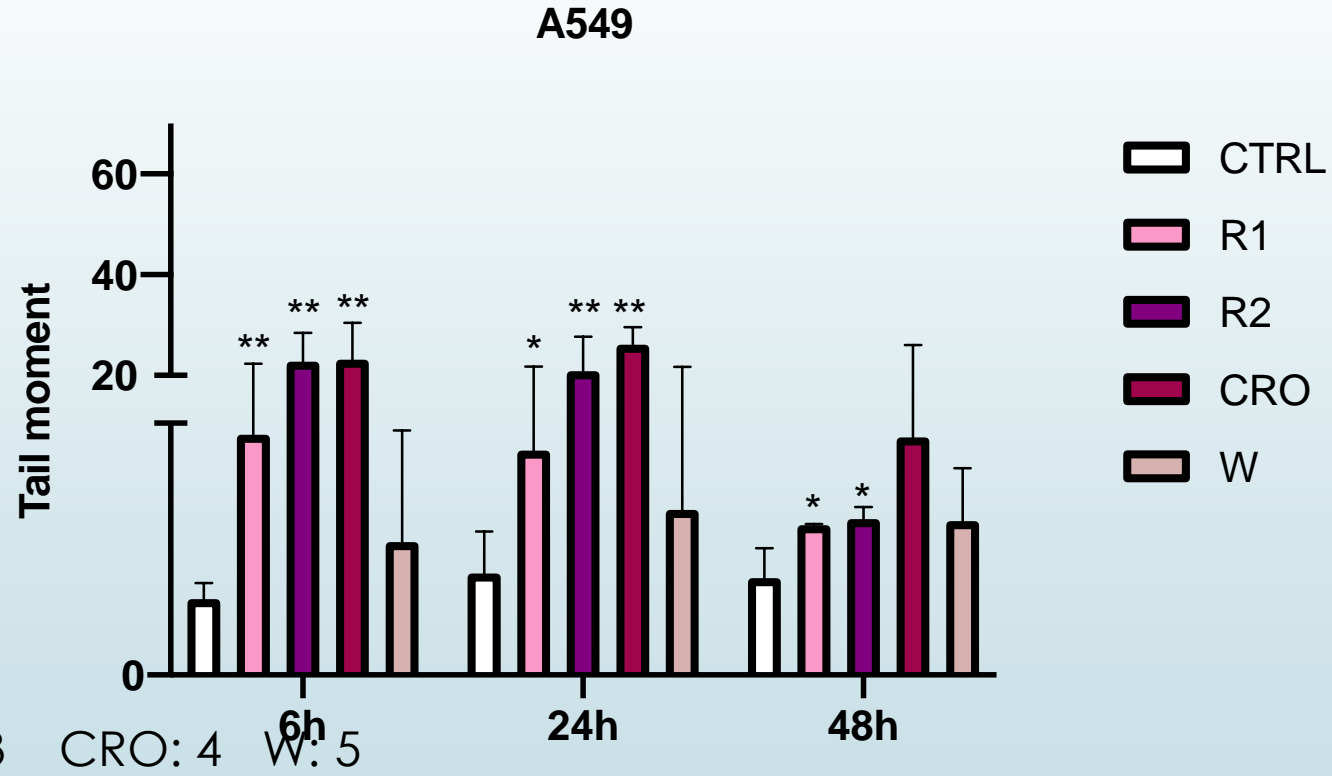
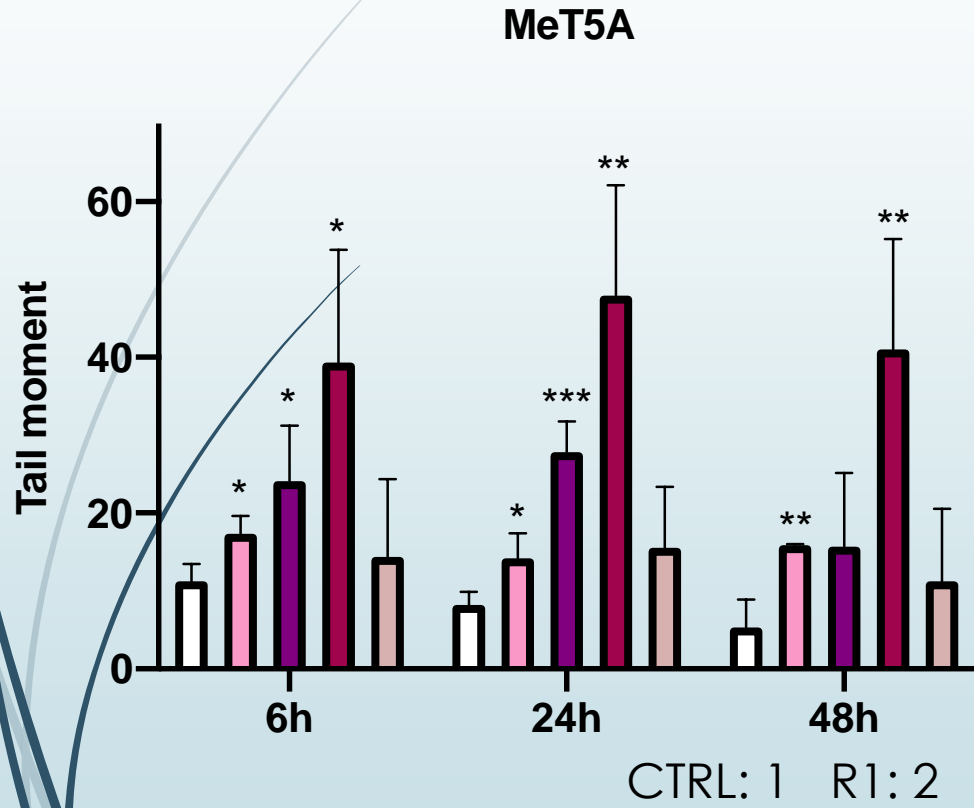
A549	24h
T TEST P<0.05	1-2, 1-3, 1-4

A549	24h
T TEST P<0.05	1-3, 1-4, 1-5 2-3, 2-4, 2-5 3-4, 3-5

Punto 2 IARC: «Is genotoxic?»

COMET:

Tail moment: Tail length x Tail intensity x f



MeT5A	6h	24h	48h
T TEST P<0.05	1-2, 1-3, 1-4	1-2, 1-3, 1-4, 2-3, 2-4, 3-5	1-2, 1-4, 2-4, 4-5

A549	6h	24h	48h
T TEST P<0.05	1-2, 1-3, 1-4	1-2, 1-3, 1-4	1-2, 1-3

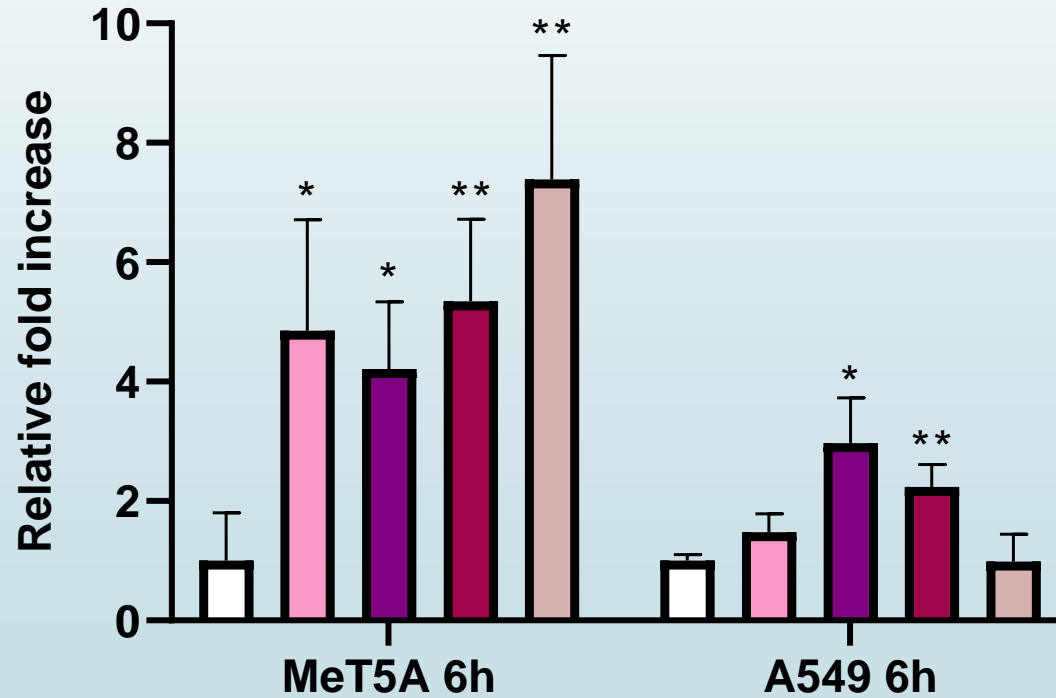
Punto 4 IARC: «Induces epigenetic alterations?»

miRNA 126: 6h

miRNA 126 attivazione angiogenesi

miR 126

CTRL: 1 R1: 2 R2: 3 CRO: 4 W: 5



MeT5A	6h
T TEST P<0.05	1-2, 1-3, 1-4, 1-5

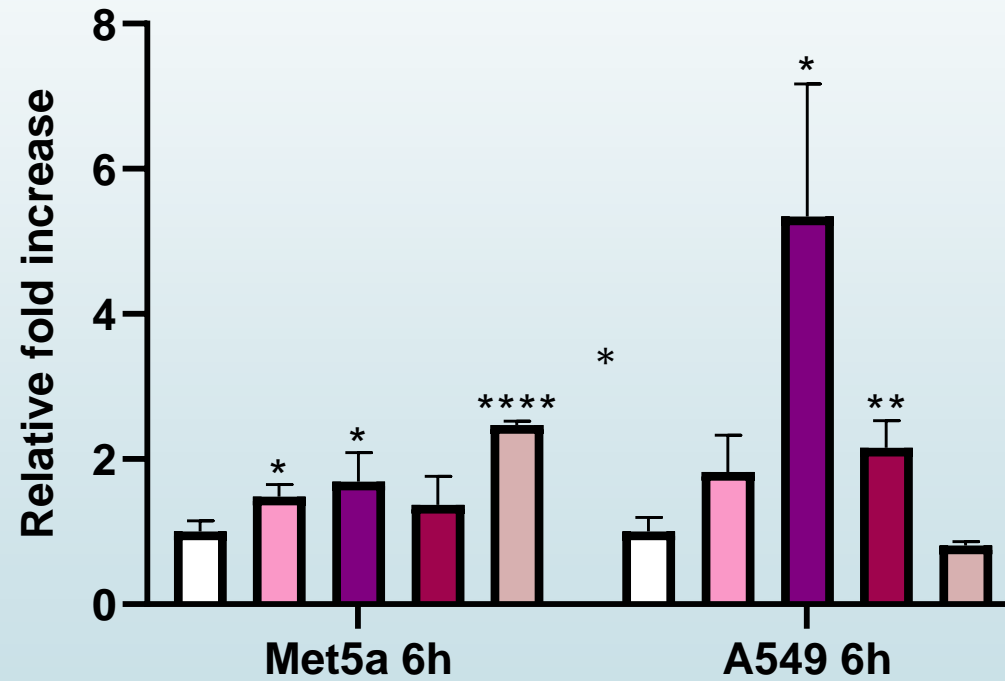
A549	6h
T TEST P<0.05	1-3, 1-4 2-3 3-5 4-5

CTRL R1 R2 CRO W

miRNA 222: time point 6h

Controlla la progression del ciclo cellulare in G1

miR: 222



MeT5A	6h
T TEST P<0.05	1-2, 1-3, 1-5 2-5, 3-5 4-5

CTRL R1 R2 CRO W

A549	6h
T TEST P<0.05	1-3, 1-4 2-3, 2-5 3-4, 3-5 4-5

miRNA 34c: time point 6h

La famiglia dei miRNAs 34, svolge un ruolo soppressivo nei confronti del tumore, mediante down-regolazione, ed un effetto sinergico con **p53**



Punto 7 IARC: «Is immunosuppressive?»

Bio-Plex assay
Panel di citochine testate

- IL-1 β
- IL-4
- IL-6
- IL-8
- IL-10
- IL-12
- IL-18
- MCP-1
- RANTES
- TNF- α
- TRAIL

Work in progress...

Work in progress...

- Immagini di Immunofluorescenza per Istone H2 fosforilato e per il RAD51:
foto da completare
- EPR *spectroscopy* (DMPO adduct): Chry-Ru <5μm; Chry-Ru> 5μm; Cro-UICC; W; Chry-UICC; Chry-VM; Eri-JN