

Bric ID06 “Sviluppo di nuovi collanti a base organica e inorganica come sostitutivi delle resine contenenti formaldeide nei prodotti legnosi usati nell’edilizia e negli arredi- FREEFORES”



INAIL

Studio in vitro della eventuale tossicità di prodotti legnosi trattati con collanti sostitutivi delle resine UF mediante un modello sperimentale di simulazione dell’esposizione inalatoria durante le attività di segagione

Delia Cavallo

Dipartimento di Medicina, Epidemiologia, Igiene del Lavoro ed Ambientale (Dimeila)

Firenze, 12 novembre 2019

Bric ID06 “Sviluppo di nuovi collanti a base organica e inorganica come sostitutivi delle resine contenenti formaldeide nei prodotti legnosi usati nell’edilizia e negli arredi- FREEFORES”

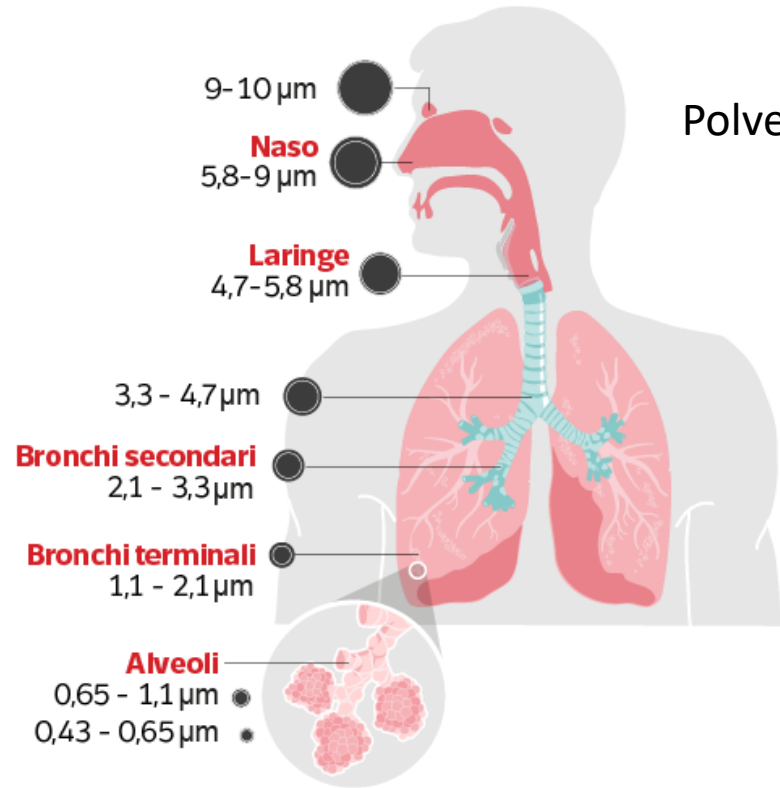
OBIETTIVO SPECIFICO 5

Valutazione dell’eventuale pericolosità dei prodotti finali ottenuti dallo studio mediante:

- a) Valutazione del rilascio di VOC tossici in collaborazione con CNR Montelibretti;
- b) Monitoraggio e caratterizzazione chimico-fisica del materiale rilasciato durante una simulazione dell’attività lavorativa di taglio e lavorazione del prodotto finale e raccolta su filtro per analisi off-line;
- c) **Studio su cellule polmonari umane dell’eventuale tossicità del materiale raccolto su filtro.**

Le polveri nell'apparato respiratorio

Dimensioni in micrometri (μm)



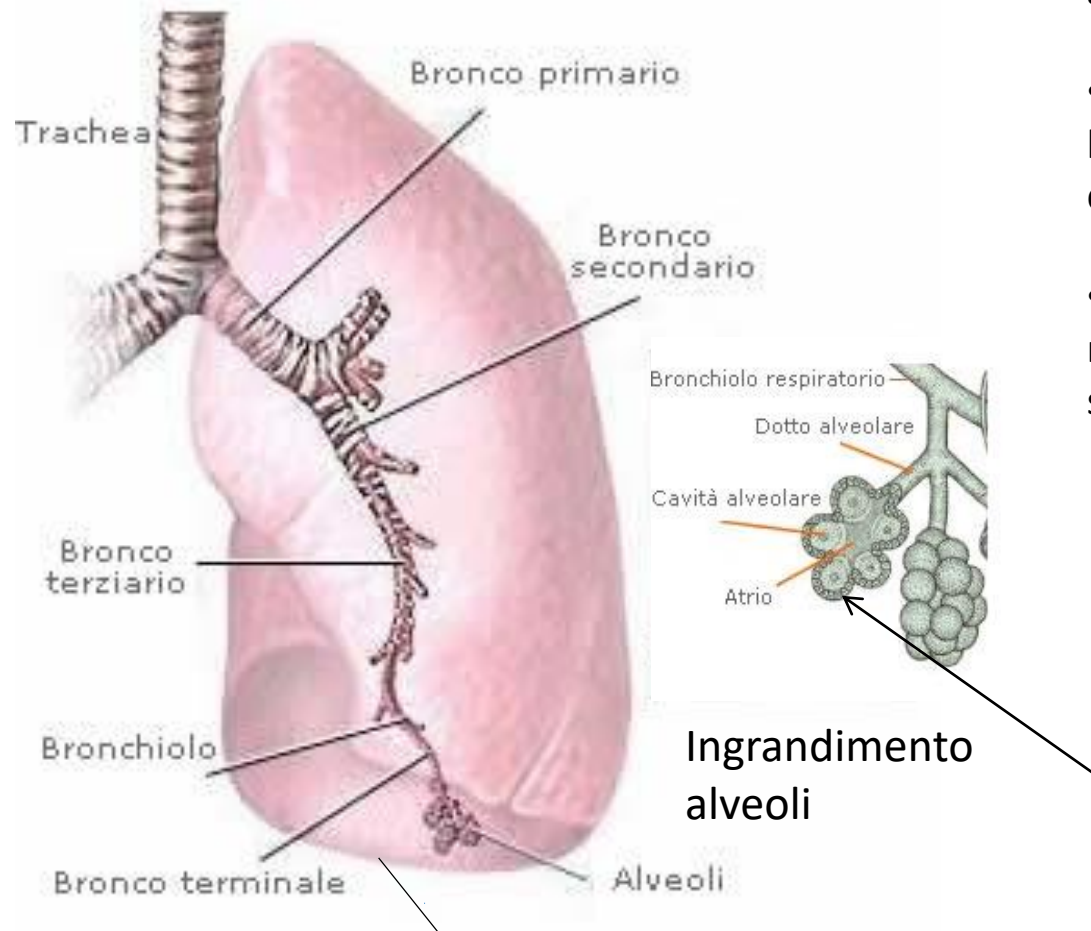
Polveri inalabili PM 10 (2.5-10 μm)

Polveri respirabili PM 2.5 (0.1-2.5 μm)

Polveri fini ed ultrafini incluse nano PM 0.1 (1-100 nm)

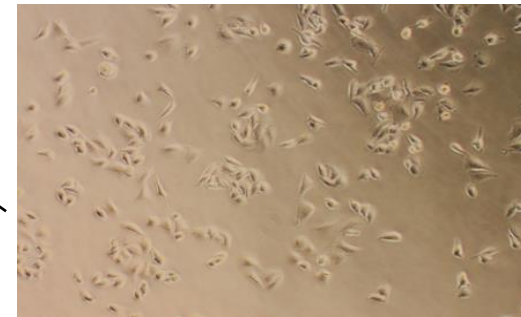
Modello sperimentale

- **Esposizione a xenobiotici:** estratti da matrici ambientali raccolte in ambiente lavorativo o outdoor (polveri e fibre, nanomateriali)
- **Linea cellulari umane:** epiteliali polmonari alveolari (A549) e bronchiali (BEAS-2B)
- **Valutazione citotossicità**
 - vitalità cellulare ed apoptosi: citofluorimetria
 - danno alla membrana: rilascio di lattato deidrogenasi (LDH)
- **Valutazione genotossicità**
 - danno diretto ed ossidativo al DNA : Fpg comet assay



Linea cellulare immortalizzata di epitelio polmonare alveolare (A549)

- Cellule con caratteristiche morfologiche e biochimiche degli pneumociti di tipo II inclusa la capacità di secernere il surfactante.
- Una delle linee cellulari maggiormente utilizzate negli studi di cancerogenesi polmonare indotta da sostanze inalabili.



Esposizione cellule A549 agli estratti di polveri da segagione (pioppo ed abete)



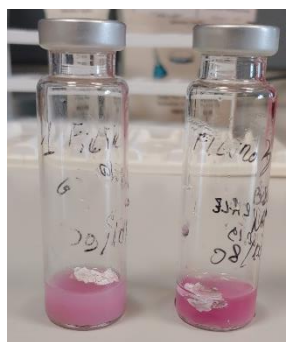
Raccolta PM_{2,5} polvere segagione mediante Silent



Pioppo naturale (**Nat**)
Pioppo trattato con colle UF commerciali (**Comm**)
Pioppo trattato con colla proteica + reticolante PAE (**Canapa**)



Abete naturale (**Nat**)
Abete trattato con colla a base inorganica (**Geopolimero**)



Metodo di estrazione secondo Hamad et al. (*Sci. Tot. Environ.* 543, 2016)

- Aggiunti 2 ml terreno coltura RPMI/antibiotici penicillina, streptomicina
- Vortex 1 min
- 15 min sonicata bagnetto ultrasuoni

Caratterizzazione dimensionale delle particelle nel terreno di coltura (DLS)



- 16 h agitazione su table shaker (200rpm)
- 15 min sonicata bagnetto ultrasuoni
- Vortex 1 min

Diluzione in terreno di coltura (RPMI 1640 con 10% FBS)

→ Stock 2mg/ml



- **Cellule A549**
- **24h Incubazione**
- **20 e 100µg/ml polvere di legno**
- **Controllo positivo H₂O₂ 100µM 30min (comet test)**



Analisi DLS dell'estratto di polveri di legno in terreno di coltura

Size Statistics Report by Number



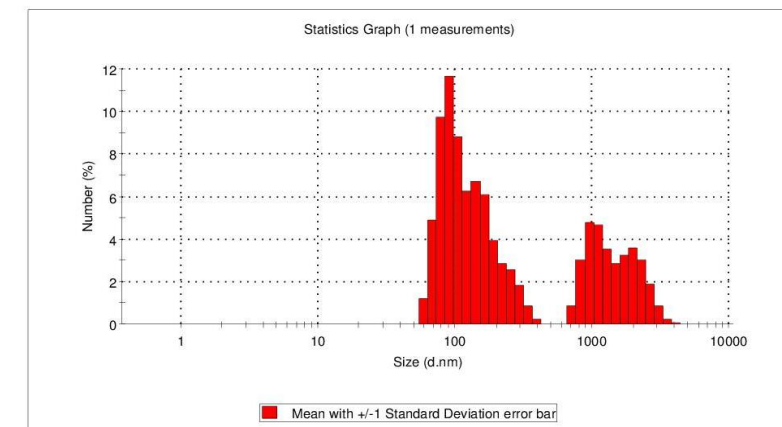
Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

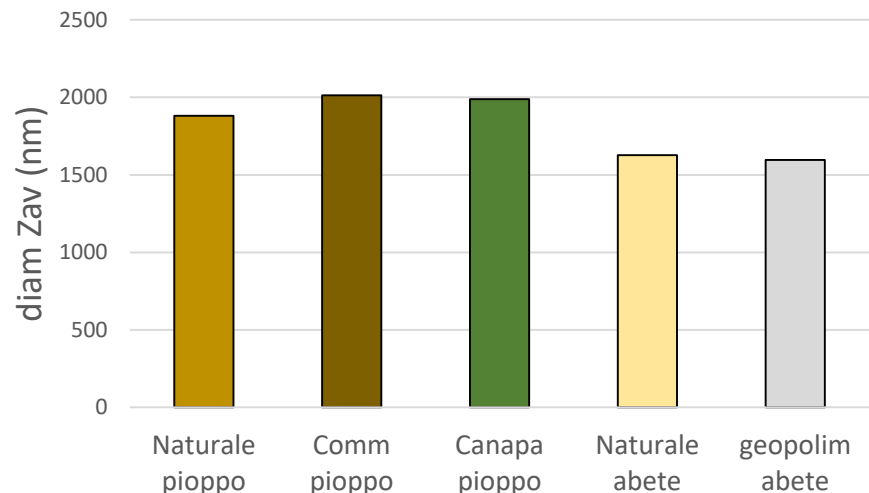
Sample Name: legno naturale abete SS 22-10-2019 media
 File Name: legno 16-07-2019.dts
 SOP Name: mansettings.nano
 Measurement Date and Time: martedì 22 ottobre 2019 10:45:56

Z-Average (nm): 1628,129 Derived Count Rate (kcps): 1504,0252766...
 Standard Deviation: 0 Standard Deviation: 0
 %Std Deviation: 0 %Std Deviation: 0
 Variance: 0 Variance: 0

Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %	Size d.nm	Mean Number %	Std Dev Number %
0.4000	0.0		5.615	0.0		78.82	9.7		1106	4.7	
0.4632	0.0		6.503	0.0		91.28	11.6		1281	3.5	
0.5365	0.0		7.531	0.0		105.7	8.8		1484	2.9	
0.6213	0.0		8.721	0.0		122.4	6.2		1718	3.2	
0.7195	0.0		10.10	0.0		141.8	6.7		1990	3.6	
0.8332	0.0		11.70	0.0		164.2	6.1		2305	3.0	
0.9649	0.0		13.54	0.0		190.1	3.9		2869	1.9	
1.117	0.0		15.69	0.0		220.2	2.8		3091	0.8	
1.294	0.0		18.17	0.0		255.0	2.5		3590	0.2	
1.499	0.0		21.04	0.0		295.3	1.8		4145	0.0	
1.736	0.0		24.36	0.0		342.0	0.9		4801	0.0	
2.010	0.0		28.21	0.0		396.1	0.2		5560	0.0	
2.328	0.0		32.67	0.0		458.7	0.0		6439	0.0	
2.696	0.0		37.84	0.0		531.2	0.0		7456	0.0	
3.122	0.0		43.82	0.0		615.1	0.0		8635	0.0	
3.615	0.0		50.75	0.0		712.4	0.8		1,000e4	0.0	
4.187	0.0		58.77	1.2		825.0	3.0				
4.849	0.0		68.06	4.9		955.4	4.8				

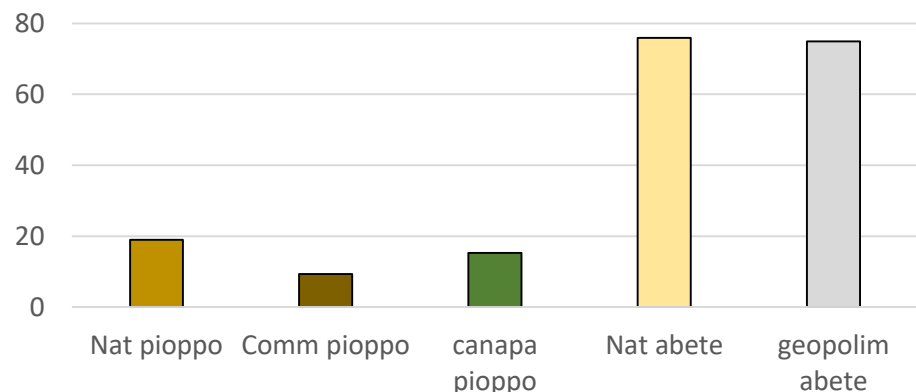


Diametro idrodinamico



Il diametro idrodinamico è più elevato per il pioppo rispetto all'abete

% n. particelle <1µm



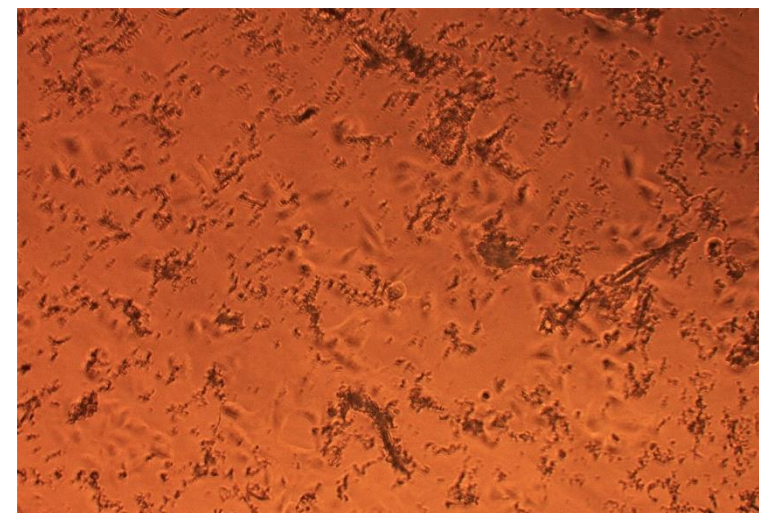
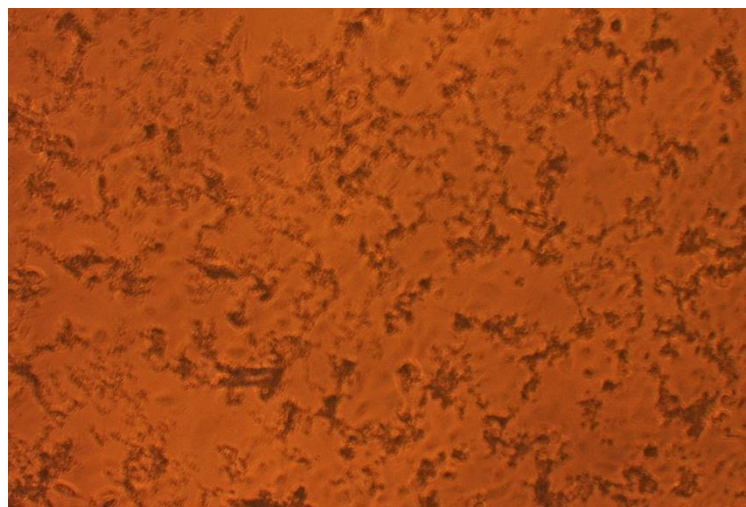
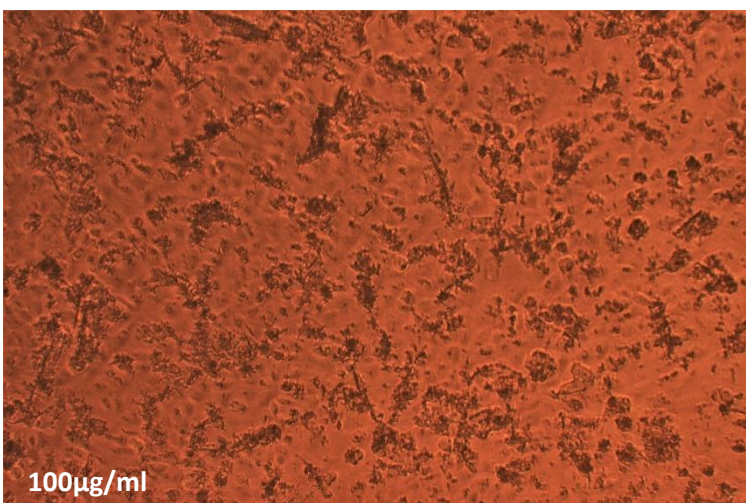
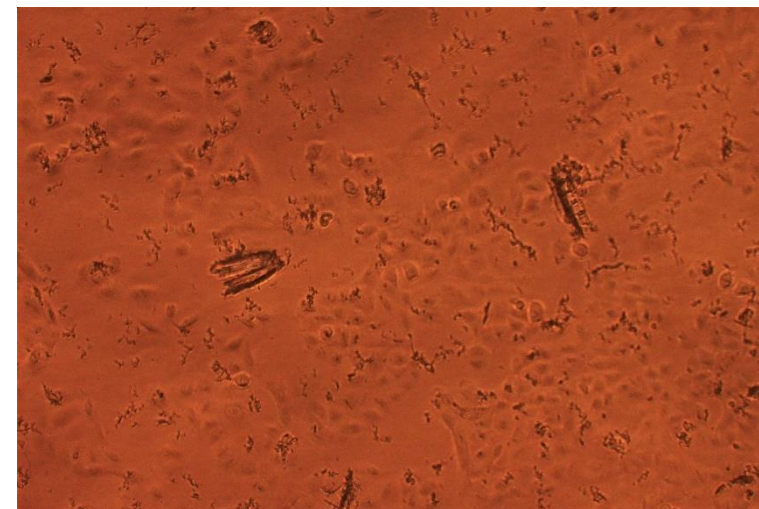
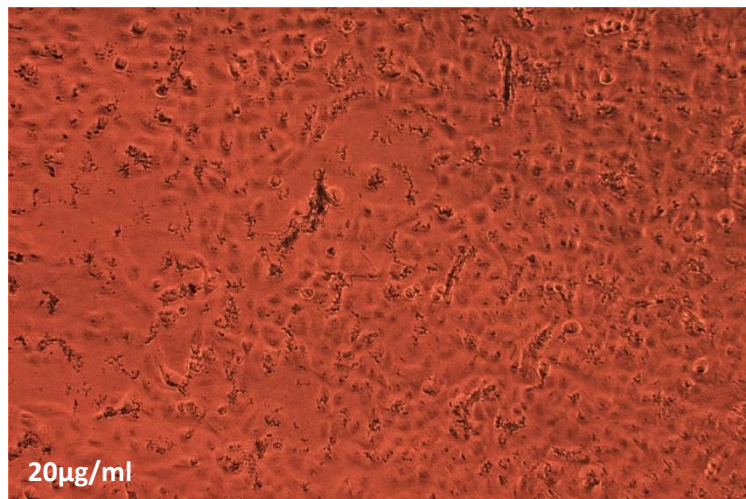
Il n. di particelle di dimensioni < 1µm sono per l'abete ca 75% e per il pioppo ≤ 20%

Cellule A549 esposte a di polvere di pioppo

Naturale

Commerciale (colla UF)

Colla con canapa

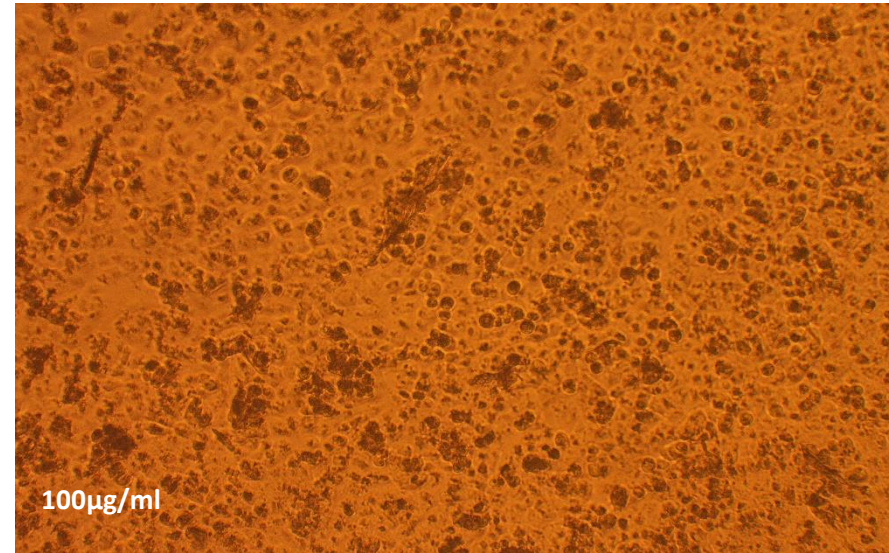
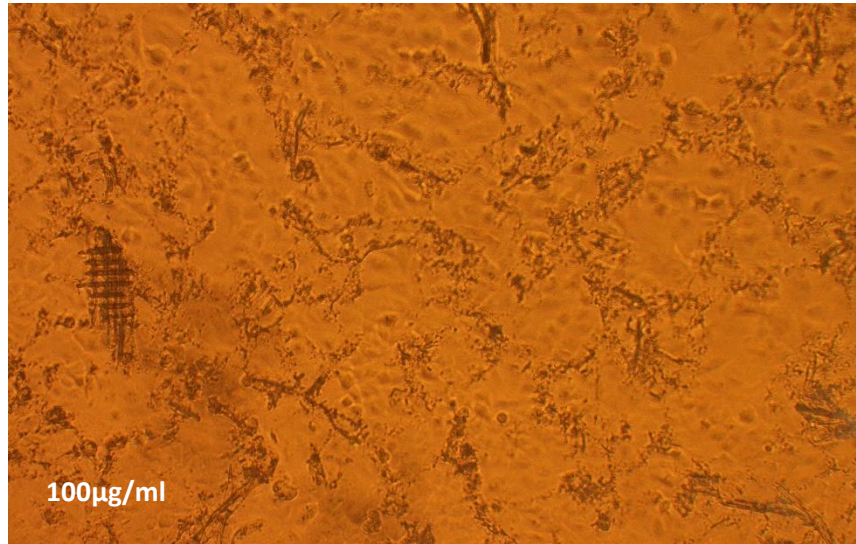
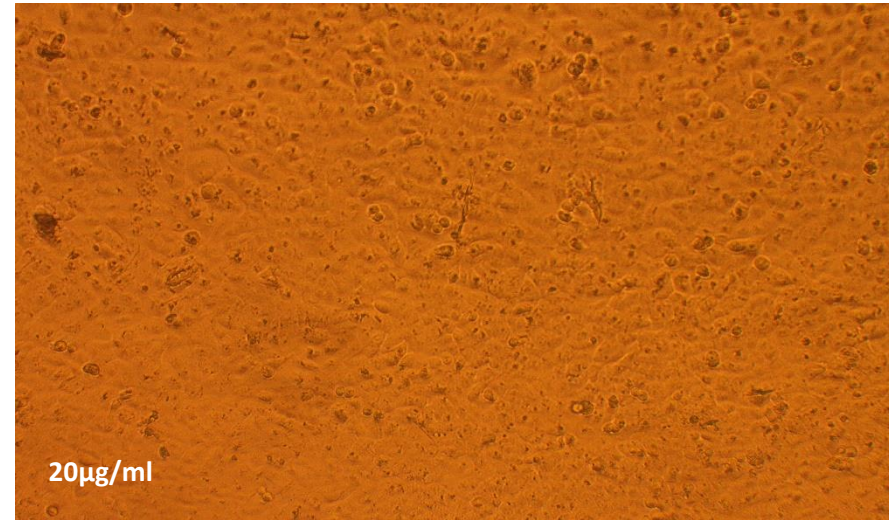


Cellule A549 esposte a polvere di abete

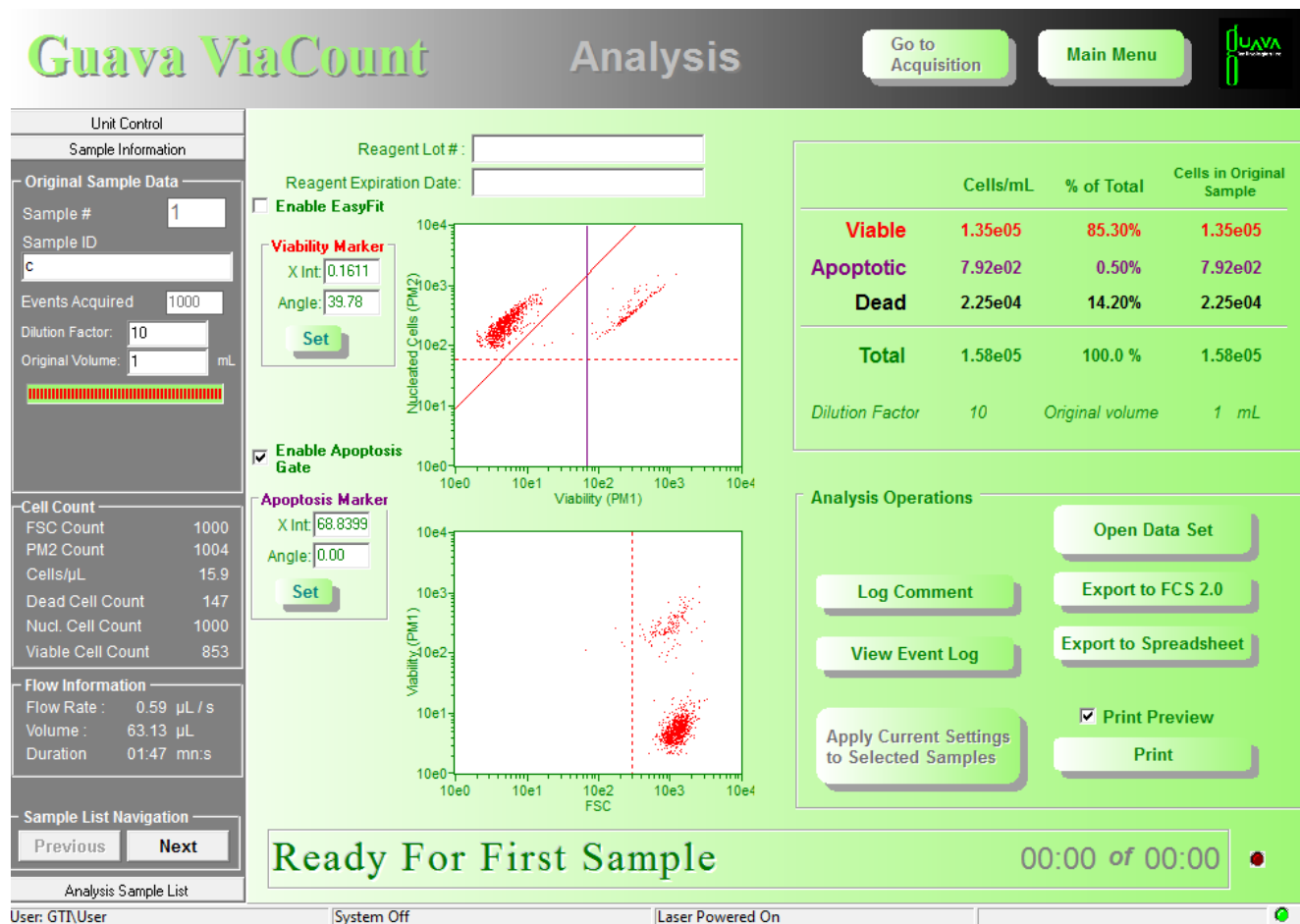
Naturale



Colla con Geopolimero



Test di vitalità cellulare



VIVE

APOPTOTICHE

MORTE

Analisi citofluorimetrica delle cellule esposte a concentrazioni crescenti di estratto di polveri di legno. L'analisi consente di discriminare le cellule vive dalle morte e dalle apoptotiche effettuando anche una conta cellulare.

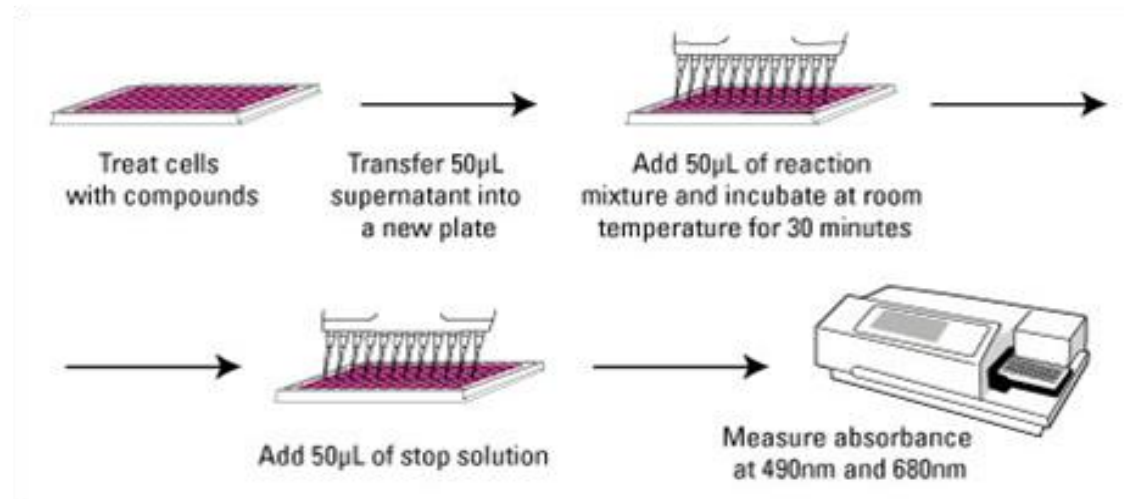
Test di valutazione del danno di membrana LDH

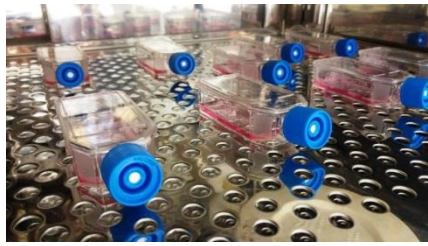


LDH - Test colorimetrico per quantificare la morte e la lisi cellulare. Si basa sulla misura dell'attività della lattato deidrogenasi rilasciata nel soprannatante dal citoplasma di cellule con membrana danneggiata.

L'aumento dell'attività dell'enzima LDH è direttamente proporzionale alla quantità di formazano prodotto.

+ formazano → + intensità di colore → + danno alla membrana

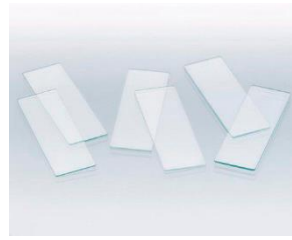




Colture A 549



Centrifugazione



Vetrini



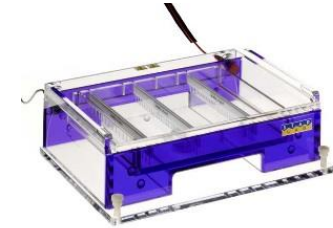
Lisi



Enzima



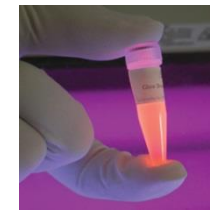
**Trattamento
alcalino
(unwinding)
(pH >13, 40 min)**



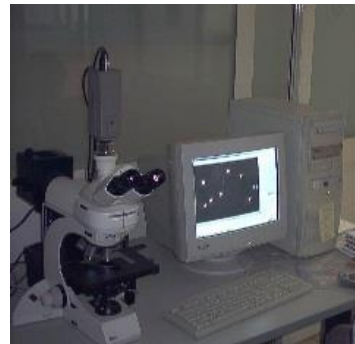
**Elettroforesi
(25 V, 300 mA, 30 min)**



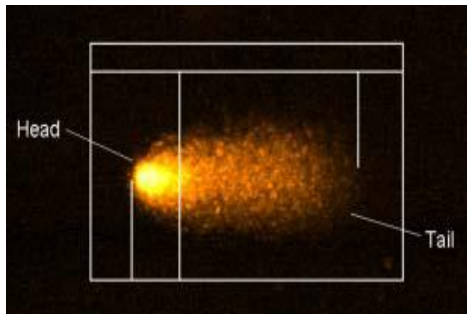
**Neutralizzazione
(pH 7)**



**Colorazione
con
bromuro di
etidio**



**Acquisizione ed
elaborazione
immagini**



**La cellula con DNA frammentato
appare come una cometa con
intensità e lunghezza della coda
proporzionale al danno**

Test di valutazione del danno diretto ed ossidativo al DNA FPG-COMET TEST

Fpg-comet test

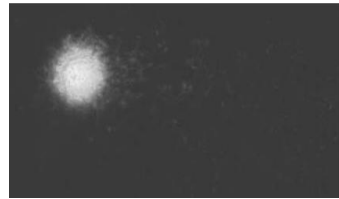
Il test consente di valutare il danno precoce, ancora riparabile, al DNA di tipo diretto (rottura singola e doppia elica) ed ossidativo, poichè l'enzima formamido-pirimidin glicosilasi (Fpg) riconosce e taglia le basi ossidate del DNA generando ulteriori rotture che si aggiungono a quelle direttamente indotte dall'agente genotossico.

Per ciascun punto sperimentale vengono preparati due vetrini: 1) cellule non trattate con Fpg (solo danno diretto) e 2) cellule trattate con Fpg (danno diretto + ossidativo).

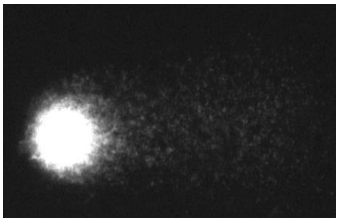
Immagini di 100 comete sia dal vetrino trattato con Fpg che non trattato, sono acquisite ed analizzate con specifico software di analisi che calcola la % di DNA nella coda di cellule trattate con Fpg (% tail DNA enz) e non trattate con l'enzima (% tail DNA) e altri parametri come lunghezza della coda (TL) e Tail moment.

Il **danno ossidativo al DNA** è calcolato sottraendo % tail DNA da % tail DNA enz.

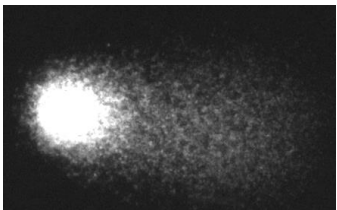
Fpg-comet test consente di valutare anche la **% di comete** (% cellule con DNA danneggiato) e la **% di cellule apoptotiche** (nuvole di DNA completamente frammentato)



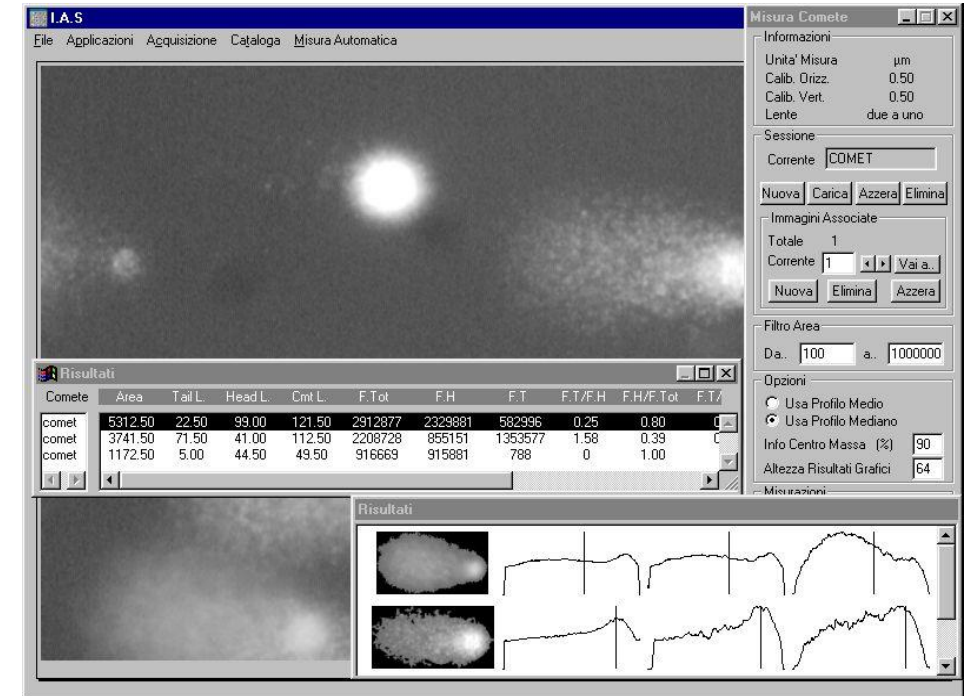
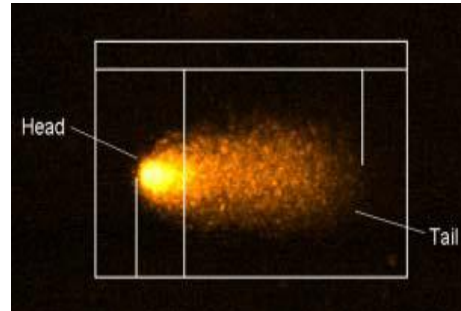
Cellula non danneggiata



Cellula non trattata con l'enzima Fpg danno diretto al DNA (% DNA coda della cometa)



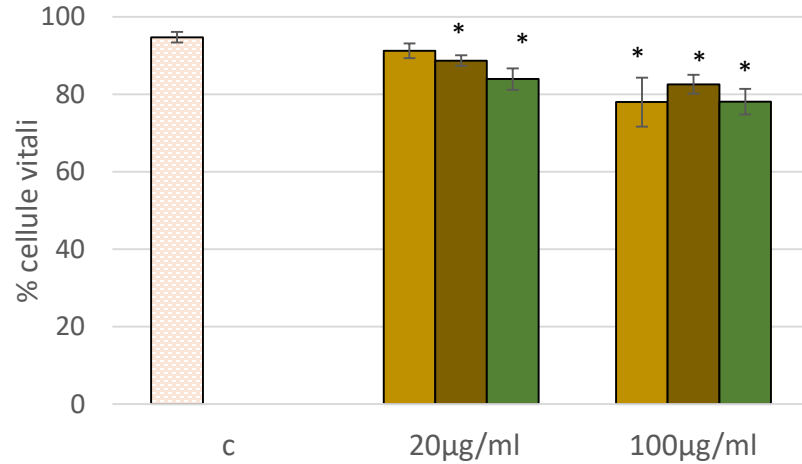
Cellula trattata con enzima Fpg danno diretto+ossidativo al DNA (più elevata intensità e lunghezza coda cometa)



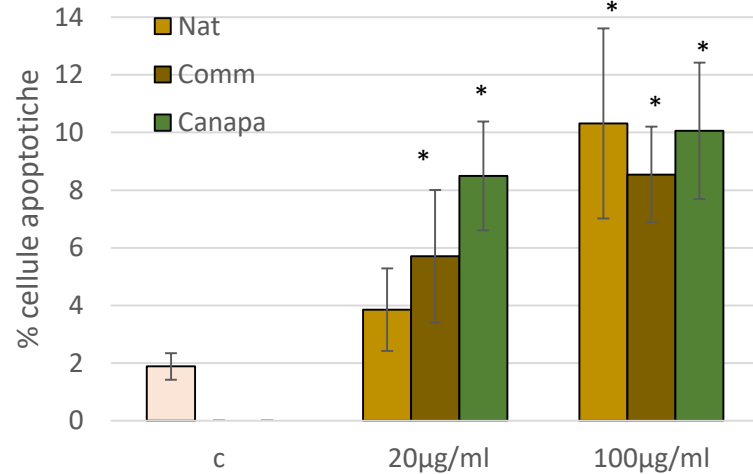
RISULTATI

Citotossicità (vitalità cellulare ed apoptosi)

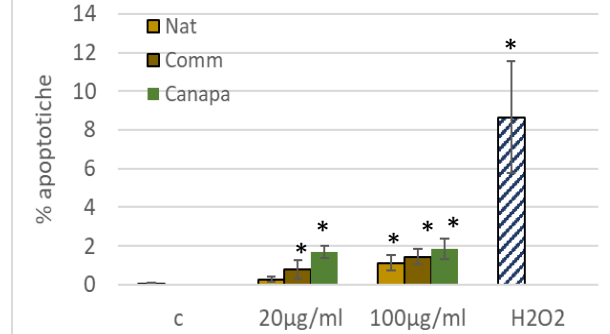
Vitalità polveri legno pioppo



Apoptosi polveri pioppo (citofluorimetro)



Apoptosi pioppo (comet test)



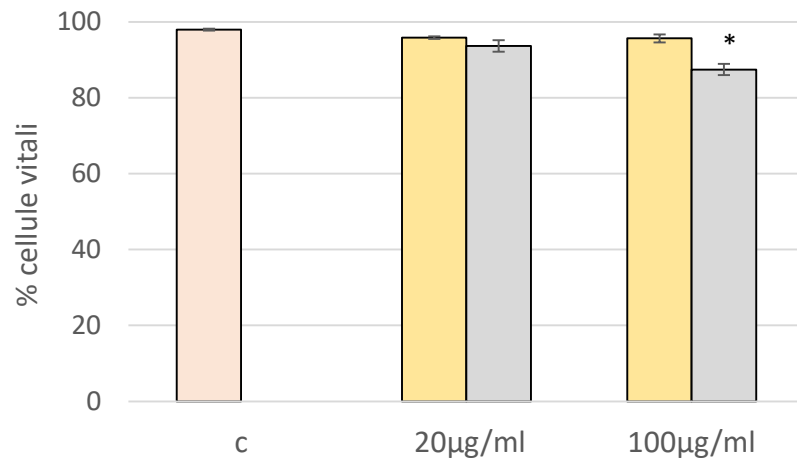
Legno naturale: lieve riduzione della vitalità cellulare solo per il pioppo.

Le colle non influiscono sulla riduzione di vitalità per entrambi i tipi di legno.

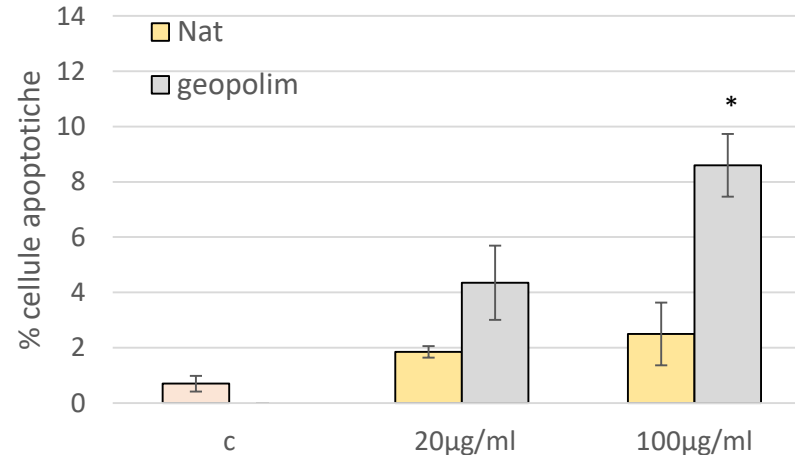
Pioppo: le colle incrementano l'effetto apoptotico a 20µg/ml.

Abete: il trattamento con geopolimero induce un lieve effetto apoptotico dose dipendente.

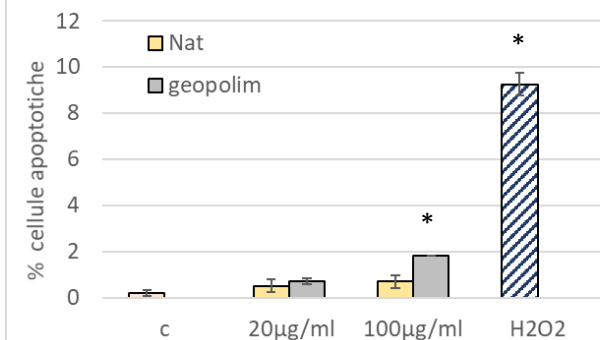
Vitalità polveri di legno abete



Apoptosi polveri abete (citofluorimetro)



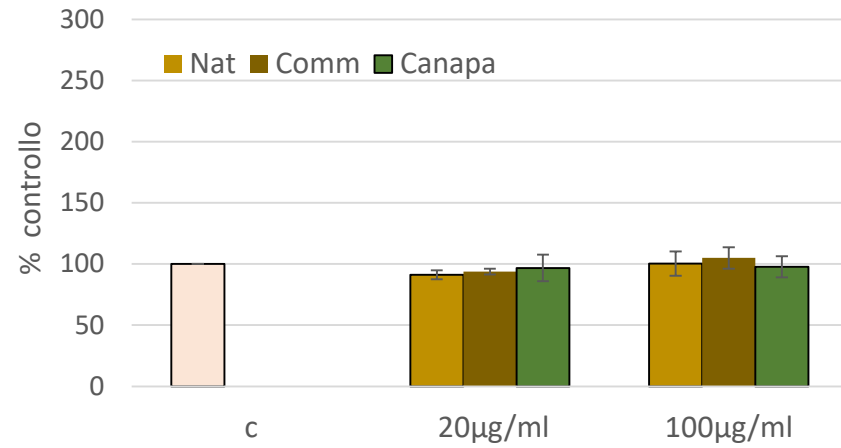
Apoptosi abete (comet test)



Risultati

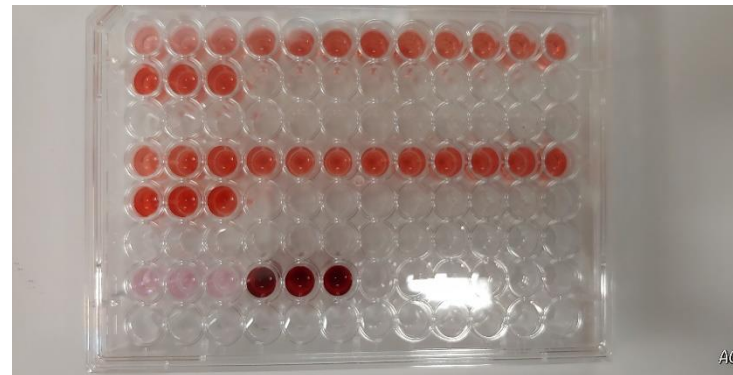
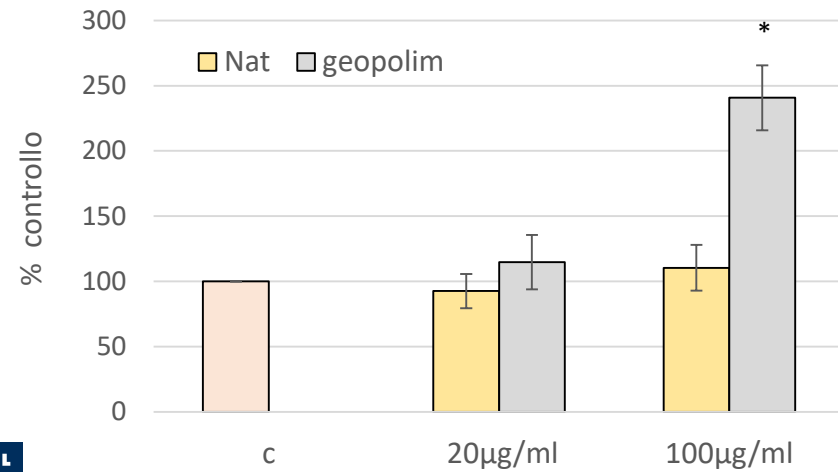
Citotossicità (danno alla membrana mediante LDH assay)

Rilascio LDH (polveri di legno pioppo)



Solo il trattamento con geopolimero induce danno alla membrana alla concentrazione più elevata

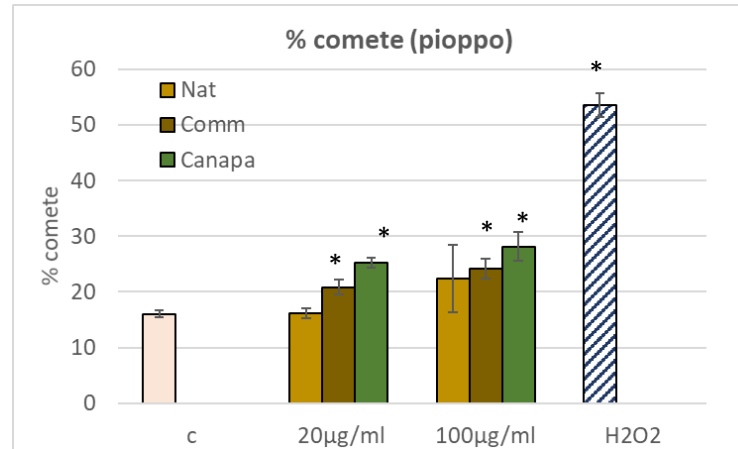
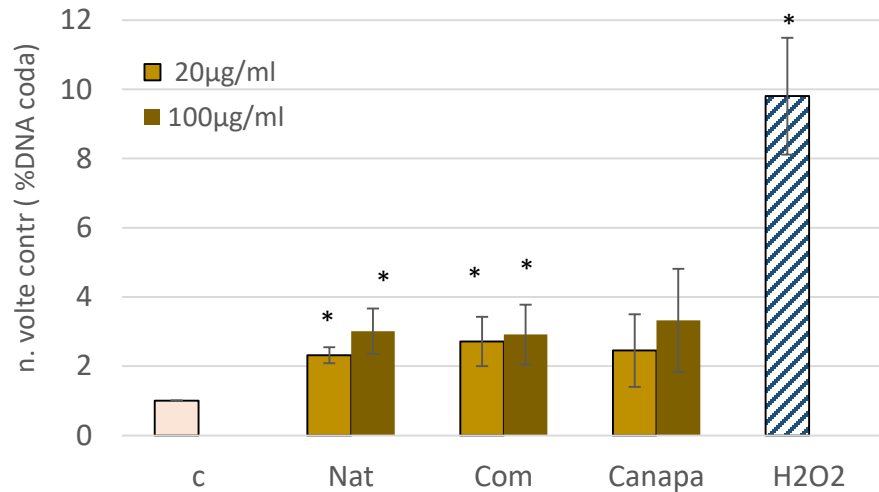
Rilascio LDH (polveri di legno abete)



Risultati

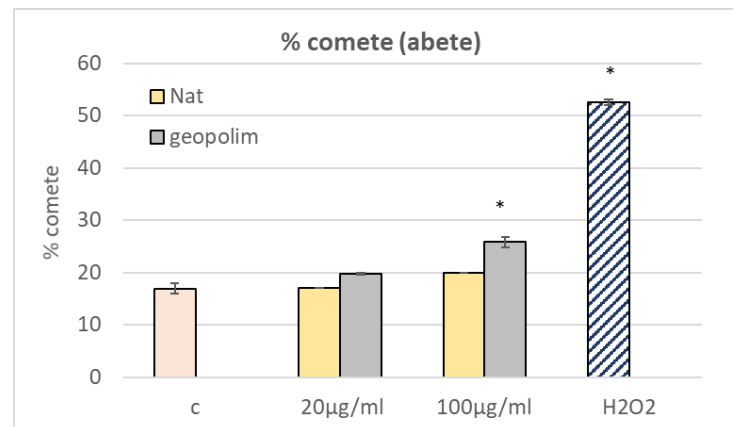
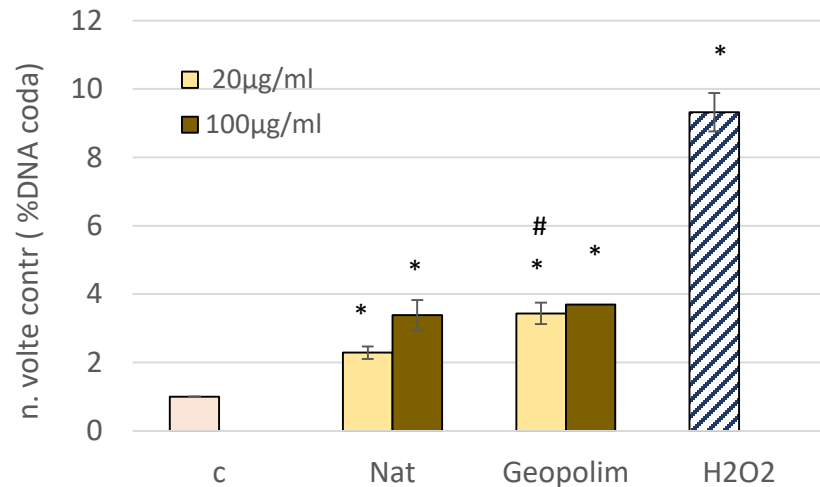
Genotossicità danno diretto al DNA (Fpg comet test)

Danno diretto al DNA (pioppo)



La polvere di pioppo induce danno diretto al DNA dose-dipendente. Il trattamento con entrambi i tipi di colla utilizzati non incrementa l'entità del danno espresso come % di DNA nella coda sebbene induca un lieve incremento della % di cellule danneggiate (comete).

Danno diretto DNA (abete)



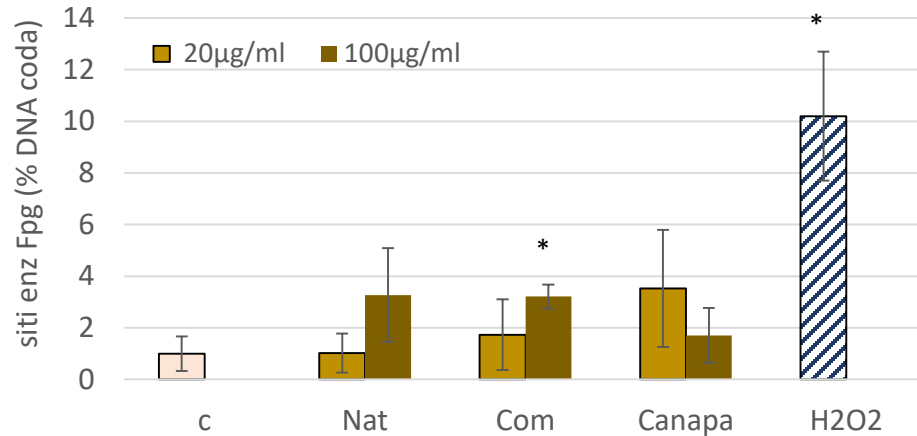
La polvere di abete induce danno diretto al DNA dose-dipendente. Il trattamento con colla geopolimerica induce alla concentrazione più bassa un lieve (anche se statisticamente significativo) incremento del danno rispetto al legno naturale e alla concentrazione più alta un lieve incremento della % di comete rispetto al naturale.

* $p \leq 0.05$ Test t di Student (esposto vs controllo); # $p \leq 0.05$ Test t di Student (Geopolim vs Nat)

Risultati

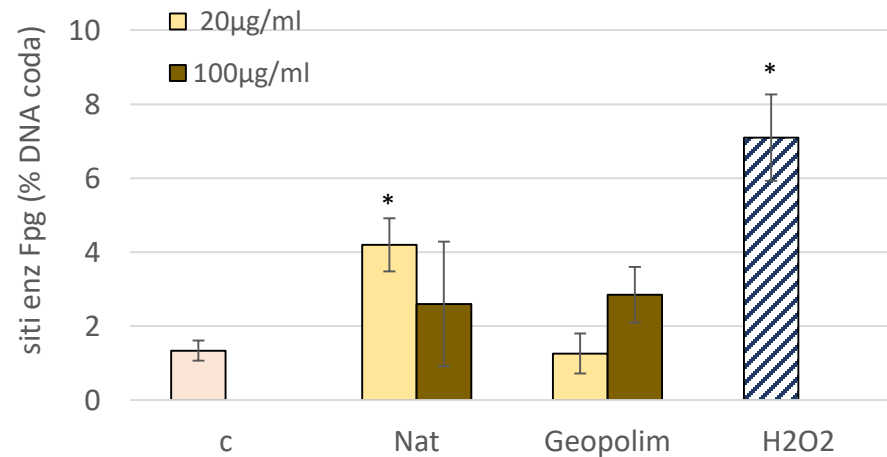
Genotossicità danno ossidativo al DNA (Fpg comet test)

Danno ossidativo al DNA (pioppo)



Lieve, ma statisticamente significativo, effetto ossidativo per il pioppo trattato con la colla commerciale alla più alta concentrazione.

Danno ossidativo al DNA (abete)



Induzione di effetto ossidativo al DNA solo per l'abete naturale.

Il trattamento con colla geopolimerica induce un lieve, non significativo, effetto ossidativo solo alla concentrazione più alta.

Risultati

Caratterizzazione dimensionale

Le dimensioni delle particelle di estratto di polvere di abete nel terreno risultano inferiori rispetto alla polvere di pioppo.

Citotossicità

Legno naturale

Pioppo (legno duro): lieve riduzione vitalità e induzione di apoptosi dose-dipendente.

Abete (legno tenero): assenza di riduzione vitalità e minore effetto apoptotico rispetto al pioppo.

Legno trattato

Le colle non influiscono sulla riduzione di vitalità per entrambi i tipi di legno.

Pioppo: entrambi le colle (comm e canapa) incrementano l'effetto apoptotico a 20µg/ml senza differenza significativa tra loro e non danneggiano la membrana cellulare.

Abete: il trattamento con la colla geopolimerica induce un lieve effetto apoptotico dose dipendente e danno alla membrana alla concentrazione più elevata.

Genotossicità

Legno naturale

Entrambi i tipi di legno inducono un modesto danno diretto al DNA dose-dipendente. Solo la polvere di abete induce lieve danno ossidativo al DNA.

Legno trattato

Pioppo: entrambi le colle non incrementano l'entità del danno espresso come % di DNA nella coda sebbene inducano un lieve incremento della % di comete. Il trattamento con colla commerciale induce danno ossidativo a 100µg/ml.

Abete: la colla geopolimerica incrementa, alla concentrazione più bassa, l'entità del danno al DNA e, alla più alta, la % di comete rispetto al legno naturale.

Il trattamento con colla geopolimerica mostra, alla concentrazione più bassa, un effetto ossidativo minore di quello indotto dal legno naturale.

Conclusioni

Le due nuove colle testate (canapa e geopolimero) sembrano indurre un lieve incremento di effetto apoptotico rispetto al legno naturale più evidente per la colla a base di canapa alla concentrazione più bassa.

La colla con canapa, diversamente dalla colla commerciale, non induce danno ossidativo al DNA alla concentrazione più elevata.

La colla geopolimerica induce anche un danno alla membrana che potrebbe essere dovuto alla particolare composizione chimica e alle ridotte dimensioni che ne consentono l'entrata attraverso la membrana e il conseguente effetto diretto sul DNA. Tale colla non induce danno ossidativo al DNA diversamente dal legno naturale.

Tali risultati preliminari evidenziano che le colle messe a punto nel progetto potrebbero costituire una valida alternativa alle colle tradizionali, sebbene necessitino di ulteriori studi su altri tipi cellulari del sistema respiratorio (es. bronchiali, co-culture etc.) e su modelli cellulari più complessi.

Grazie per l'attenzione

UO INAIL
Gruppo di ricerca
Monte Porzio Catone (RM)

Delia Cavallo
d.cavallo@inail.it

- Aureliano Ciervo
- Anna Maria Freseigna
- Raffaele Maiello
- Cinzia Lucia Ursini
- Valentina Del Frate

