

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE "AMEDEO AVOGADRO"



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE
Dipartimento di Scienze ed Innovazione Tecnologica

Corso di Laurea Magistrale in Biologia

Curriculum Biomedico-Biomolecolare

TESI DI LAUREA

PATOLOGIE ASBESTO INDOTTE IN TESSUTI EXTRAPOLMONARI:

Studio della presenza di fibre di amianto e di eventuali altri inquinanti ambientali nell'apparato gastrointestinale, attraverso l'utilizzo del microscopio ottico e del microscopio elettronico a scansione (SEM)

Relatore: Dott. CROCE Alessandro

Correlatore: Dott. CALISI Antonio

Tutor Esterno: Dott.ssa BELLIS Donata

(Medico-chirurgo, spec. Anatomia Patologica)

Candidata: SIGISMONDI Vanessa

Matricola: 20026676

Anno accademico 2022/2023

A me stessa.

Alla mia famiglia che mi ha supportata e sopportata.

Ai miei nonni che sarebbero fieri di me.

A tutte le persone che mi vogliono bene.

A chi ci ha creduto fin dall'inizio,

e fino alla fine.

Indice

1 SCOPO DEL LAVORO	4
2 INTRODUZIONE	6
2.1 AMIANTO	6
2.1.1 ANFIBOLI.....	6
2.1.2 SERPENTINI	9
2.2 L'AMIANTO NELLA STORIA	11
2.2.1 AMIANTO IN ITALIA E DIFFUSIONE.....	12
2.2.2 ETERNIT	15
2.2.3 SIN (SITO DI INTERESSE NAZIONALE).....	16
2.3 NORMATIVA ITALIANA	18
2.3.1 LA NORMATIVA A TUTELA DEI LAVORATORI.....	19
3 PATOLOGIE ASBESTO CORRELATE	20
3.1 MESOTELIOMA	23
3.1.1 VESICOLE EXTRACELLULARI	30
3.1.2 ESOSOMI	31
4 TESSUTI EXTRAPOLMONARI	32
4.1 APPARATO GASTROINTESTINALE	32
4.1.1 FARINGE.....	35
4.1.2 ESOFAGO	36
4.1.3 STOMACO	36
4.1.4 INTESTINO.....	40
4.1.5 PANCREAS.....	41
4.1.6 FEGATO E COLECISTI.....	45
4.2 LA RICERCA DI PATOLOGIE ASBESTO CORRELATE NEL TRATTO DIGERENTE	48
4.2.1 CANCRO DELLO STOMACO	49
4.2.2 CANCRO AL FEGATO.....	53
4.2.3 CANCRO AL PANCREAS.....	56
4.2.4 CANCRO DEL COLON	57
5 PREVENZIONE E PROSPETTIVE FUTURE	59
6 MATERIALI E METODI	61
6.1 PREPARAZIONE CAMPIONI PER IL MICROSCOPIO OTTICO	61
6.1.2 I MATERIALI	61
6.1.3 I METODI PER L'ALLESTIMENTO DEL CAMPIONE	62
6.2 MICROSCOPIO OTTICO	64
6.2.1 MICROSCOPIO OTTICO A LUCE TRASMESSA.....	65

6.2.2 MICROSCOPIO OTTICO A LUCE POLARIZZATA	67
6.3 DIGESTIONE CHIMICA DEI TESSUTI	69
6.3.1 I MATERIALI	69
6.3.2 METODI PER LA DIGESTIONE CHIMICA E PER L'ALLESTIMENTO DEL CAMPIONE	69
6.4 MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE	71
6.4.1 STRUMENTAZIONE SEM/EDS	72
6.4.2 INTERAZIONE FRA ELETTRONI E CAMPIONI	75
6.4.3 RIVELATORI	76
6.4.4 MODALITA' OPERATIVE DEL SEM/EDS	77
6.4.5 IMMAGINI SEM E SPETTRI EDS DELLE FASI PURE	78
7 RISULTATI	85
7.1 CASO 1	85
7.2 CASO 2	88
7.3 CASO 3	91
7.4 CASO 4	95
7.5 CASO 5	97
7.6 CASO 6	99
8 CONCLUSIONI	107
9 ALLEGATO 1: Microscopia ottica, Ematossilina-Eosina	114
10 ALLEGATO 2: Metodiche di colorazione istologiche per l'evidenziazione della sostanza amiloide	127
11 ALLEGATO 3: Sintesi delle conoscenze relative all'esposizione e al profilo tossicologico dell'amianto	131
12 BIBLIOGRAFIA	134
13 SITOGRAFIA	139
14 RINGRAZIAMENTI	141

1 SCOPO DEL LAVORO

L'asbesto, o più comunemente chiamato amianto, è stato molto utilizzato fin dall'antichità per le sue varie proprietà. Attualmente in Italia l'impiego è proibito dalla Legge 257 del 27 marzo 1992 - "*Norme relative alla cessazione dell'impiego dell'amianto*" - ma è ancora possibile la dispersione di fibre di amianto da elementi strutturali preesistenti all'interno degli edifici, per il danneggiamento diretto o il lento deterioramento. La presenza di fibre di amianto comporta dei rischi a carico della salute per via della loro cancerogenicità. I rischi maggiori sono legati all'inalazione delle fibre, le quali possono depositarsi all'interno delle vie aeree comportando l'insorgenza di malattie come l'asbestosi, il mesotelioma e il carcinoma polmonare.

Recenti studi hanno cercato una correlazione fra l'esposizione all'amianto e l'insorgenza di altre patologie asbesto correlate nel tratto digerente. A tal proposito il Dott. Croce e la Dott.ssa Rinaudo hanno evidenziato la presenza di fibre di amianto nel colon e nelle vie biliari in soggetti affetti da neoplasie residenti a Casale Monferrato. Da questi lavori è nato l'interesse per lo studio, in una popolazione di soggetti residenti a Casale Monferrato, affetti da carcinomi dell'apparato gastroenterico (prevalentemente stomaco e colon), della distribuzione di fibre di amianto nelle porzioni di tessuto sano e malato.

La città di Casale Monferrato è conosciuta per la grande produzione, in passato, di cemento amianto nelle fabbriche Eternit. Il crisotilo, un minerale appartenente alla famiglia degli amianti, veniva estratto dalla miniera di Balangero (TO) per poi essere lavorato in tali fabbriche. Per il progetto di tesi, facente parte dello studio condotto dal Dipartimento delle Attività Integrate Ricerca e Innovazione affiliato all'Università del Piemonte Orientale (DAIRI-UPO), sono stati allestiti dei preparati istologici di tessuti sani e malati dei vari organi dell'apparato gastrointestinale, soprattutto di stomaco, fegato e colon. I campioni provenivano dal reparto di Anatomia Patologica dell'Ospedale di Casale Monferrato e appartenevano a soggetti residenti nel Sito Nazionale d'Interesse (SIN).

Lo scopo è stato:

- verificare in letteratura se c'erano studi precedenti che avessero in passato e recentemente identificato fibre di amianto ed altri inquinanti nel tratto digerente;
- identificare nei campioni da noi selezionati (stomaco, colon e fegato) la presenza di eventuali fibre di amianto o di altri inquinanti a conferma dei dati presenti in letteratura.

A tal fine sono state applicate le seguenti tecniche:

- microscopia ottica a luce diretta e a luce polarizzata per l'analisi di vetrini bianchi e vetrini colorati con la tecnica E-E delle sezioni di tessuto sano e malato per ricercare la presenza di corpuscoli dell'asbesto;
- microscopia elettronica a scansione (SEM) dopo digestione chimica di sezioni di tessuto sano, ponte, malato per l'identificazione di sostanze inorganiche ed eventuali fasi minerali.

Identificare una possibile eziologia da amianto e/o da altri inquinanti ambientali del carcinoma gastrico, colico ed epatico, può dare dei contributi, oltre che di prevenzione, anche per lo studio di nuove tecniche di screening nei soggetti esposti (professionalmente e/o ambientalmente).

2 INTRODUZIONE

2.1 AMIANTO

Il termine amianto e il termine asbesto derivano dal greco (ἀμίαντος e ἄσβεστος) e significano rispettivamente “incorruttibile” e “che non brucia”. Sono silicati fibrosi molto presenti in natura con proprietà fonoassorbenti, ignifughe, resistenti al calore e molto flessibili.

Quando ci riferiamo agli amianti o asbesti, si fa riferimento a sei differenti silicati naturali caratterizzati da fibre sottilissime e si distinguono in due gruppi come mostrato nella tabella seguente:

	GRUPPO DI MINERALI	TIPO DI SILICATO	COMPOSIZIONE	N. DI CAS
AMIANTO	Serpentino	Crisotilo o «amianto bianco»	$Mg_3 [Si_2O_5](OH)_4$ Silicato idrato di magnesio	12001-29-5
		Crocidolite o «amianto blu»	$Na_2Fe_2(FeMg)_3Si_8O_{22}(OH)_2$ Silicato idrato di ferro e sodio	12001-28-4
	Anfiboli	Amosite o «amianto bruno»	$(FeMg)_7Si_8O_{22}(OH)_2$ Silicato di ferro e magnesio	12172-73-5
		Tremolite	$Ca_2Mg_5Si_8O_{22}(OH)_2$ Silicato idrato di calcio e magnesio	77536-68-6
		Actinolite	$Ca_2(MgFe)_5Si_8O_{22}(OH)_2$ Silicato idrato di calcio e magnesio	77536-66-4
		Antofillite	$Mg_7Si_8O_{22}(OH)_2$ Silicato di magnesio e ferro	77536-67-5

Tabella 1: Classificazione amianti. (<https://www.infobuildenergia.it/approfondimenti/amianto-asbesto-storia-proprietà-diffusione/#Le-patologie-sanitarie-derivanti-dall-esposizione-all-amianto>).

Della famiglia dei Serpentine troviamo anche antigorite e lizardite ma, l'unico rappresentante degli amianti è il crisotilo che comprende circa il 98% dell'amianto estratto in natura.

2.1.1 ANFIBOLI

Gli anfiboli sono una famiglia di minerali appartenenti al gruppo degli inosilicati e sono stati utilizzati molto nella creazione di gemme come la giada ma soprattutto impiegati nel mondo industriale dell'amianto. Il nome venne assegnato dal cristallografo francese René-Just Haüy.

“Il termine deriva dal greco, “ἀμφίβολος”, “amphibolos” che significa “doppio senso” o “ambiguità”. Cosa che sottintende la complessità e molteplicità di caratteristiche del minerale, spesso confuso con altre pietre. “(<https://onotiziarioamianto.it/anfiboli-amianto/>)

I minerali del gruppo degli anfiboli sono costituenti di rocce sia ignee che metamorfiche. Gli anfiboli sono inosilicati a catena doppia con periodo pari a due tetraedri che hanno una struttura cristallina formata da doppie catene di tetraedri, dette anche “nastri anfibolici”, con una unità ripetitiva $[\text{Si}_4\text{O}_{11}(\text{OH})]^{7-}$. Le doppie catene possono anche essere considerate come una successione di anelli di 6 tetraedri, nella stessa doppia catena tutti orientati nella stessa direzione (o verso l’alto o verso il basso) e in posizione centrale dell’anello esagonale si trova un ossidrilico (OH)⁻ o uno ione F⁻. (Rinaudo & Croce, 2020).

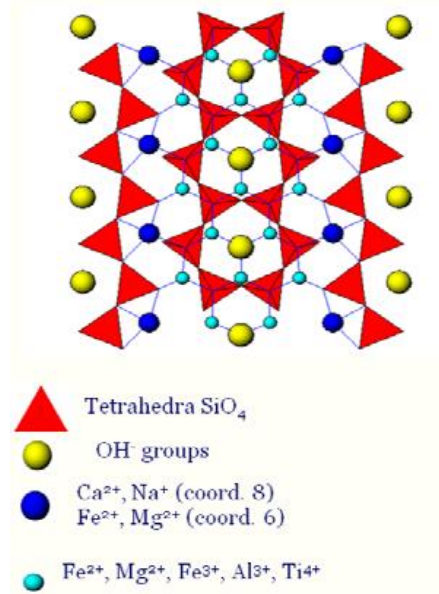


Figura 1: Schema della struttura cristallina degli anfiboli. (Rinaudo & Croce, 2020).

Questi minerali hanno come formula chimica generale $\text{W}_{0-1}\text{X}_2\text{Y}_5\text{Z}_8\text{O}_{22}(\text{OH},\text{F})_2$. Le lettere maiuscole rappresentano le cavità, all’interno delle quali si inseriscono diversi ioni a seconda della loro coordinazione:

- negli spazi W, si possono inserire ioni grandi, con coordinazione 10-12. Questo spazio può rimanere vuoto in quanto negli anfiboli possono esserci fenomeni di vicarianza Si-Al; per ogni Si^{4+} sostituito con un Al^{3+} deve entrare nella struttura uno ione monovalente, che occuperà la posizione W;
- nello spazio X possiamo trovare ioni a coordinazione cubica (Ca^{2+} , K^{+}) o a coordinazione ottaedrica (Mg^{2+} , Fe^{2+});

- nella cavità Y entrano ioni a coordinazione ottaedrica (Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Al^{3+});
- Z è la cavità tetraedrica (Si^{4+} , Al^{3+}).

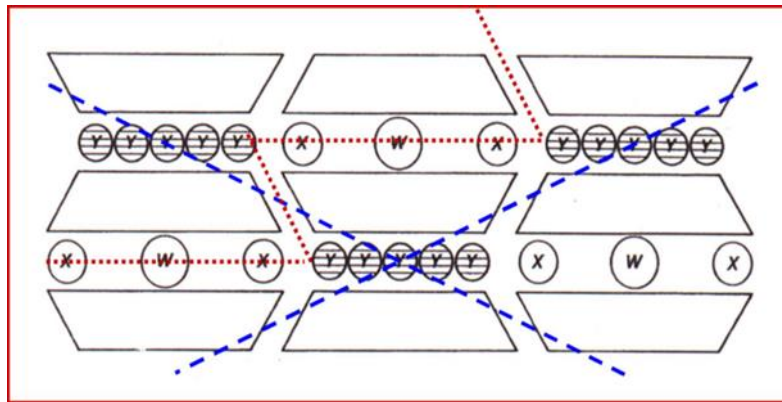


Figura 2: in cui si possono osservare le cavità X e Y e le lacune W; (Rinaudo & Croce, 2020).

La struttura, quindi, presenta legami chimici forti lungo l'asse delle catene e legami più deboli tra i cationi e gli ossigeni tetraedrici. Il gruppo degli anfiboli comprende 5 delle 6 fasi minerali riconosciute dalla legislazione italiana come "amianti":

- Actinolite $\rightarrow Ca_2(Mg,Fe^{2+})_5Si_8O_{22}(OH)_2$
- Amosite $\rightarrow (Fe^{2+},Mg)_7Si_8O_{22}(OH)_2$
- Antofillite $\rightarrow (Mg,Fe^{2+})Si_8O_{22}(OH)_2$
- Crocidolite $\rightarrow Na_2Fe_2^{3+}(Fe^{2+},Mg)_3[Si_8O_{22}(OH)_2]$
- Tremolite $\rightarrow Ca_2Mg_5Si_8O_{22}(OH)_2$
- Crisotilo $\rightarrow Mg_3(Si_2O_5)(OH)_4$

I siti cubici dell'actinolite e della tremolite sono occupati da Ca; i siti ottaedrici da Mg nella tremolite e da Mg e Fe^{2+} nell'actinolite. Nell'amosite e nell'antofillite, Fe^{2+} e Mg, occupano sia i siti cubici sia quelli ottaedrici; nell'amosite predomina il Fe^{2+} e nell'antofillite il Mg. Infine, nella crocidolite, il Na occupa i siti cubici, mentre Fe^{2+} e Mg occupano i siti ottaedrici. (Rinaudo & Croce, 2020).

2.1.2 SERPENTINI

I serpentini sono una classe di minerali appartenenti alla famiglia dei fillosilicati, caratterizzati da una struttura a doppio strato T-O; infatti, la parola fillosilicati deriva dal greco “phyllon”, che significa appunto, foglia.

“Nei fillosilicati i tetraedri SiO_4 condividono tre ossigeni con tetraedri adiacenti e formano fogli, che si estendono indefinitamente in due dimensioni. L'ossigeno non condiviso punta in tutti i tetraedri nella stessa direzione; al centro degli anelli formati da sei tetraedri e alla stessa altezza dell'ossigeno non condiviso si trova un ossidrile OH. L'unità ripetitiva è quindi: $[\text{Si}_4\text{O}_{10}(\text{OH})_2]^{6-}$. Gli strati bidimensionali dei tetraedri SiO_4 hanno quindi simmetria pseudo-esagonale.” (Rinaudo & Croce, 2020).

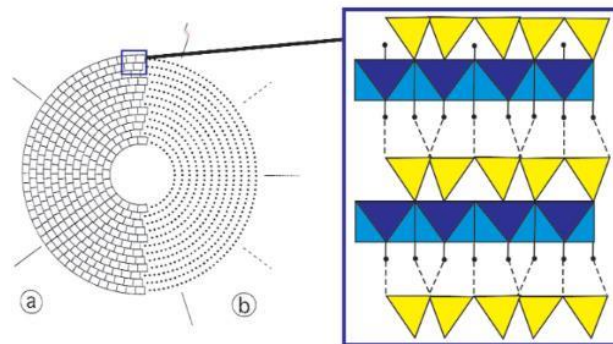


Figura 3: Struttura del crisotilo vista perpendicolarmente l'asse della fibra. In giallo sono riportati gli strati tetraedrici, in blu quelli ottaedrici. I pallini neri rappresentano gli ossidrili (Compagnoni & Groppo, 2006)

I serpentini hanno formula generale $\text{Mg}_3(\text{Si}_2\text{O}_5)(\text{OH})_4$ e sono caratterizzati da uno “stress reticolare” dovuto ad una minore forza dei legami elettrostatici rispetto a quelli covalenti, il legame lungo gli strati è molto più forte rispetto a quello tra uno strato e l'altro. Per ovviare a questo stress esistono tre pseudo-polimorfi di serpentino con diversa struttura:

- lizardite: gli strati tetraedrici presentano una vicarianza di Si-Al e una rotazione di circa 3,5 Å. Questa fase è caratterizzata da una struttura planare.

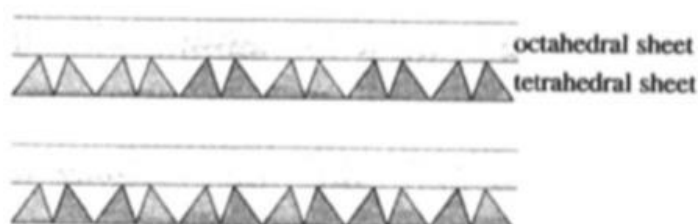


Figura 4: Struttura planare (Rinaudo & Croce, 2020).

- antigorite; gli strati ottaedrici sono continui, quelli tetraedrici ruotano periodicamente. La struttura è lamellare e nello strato tetraedrico ci possono essere delle sostituzioni Si-Al.

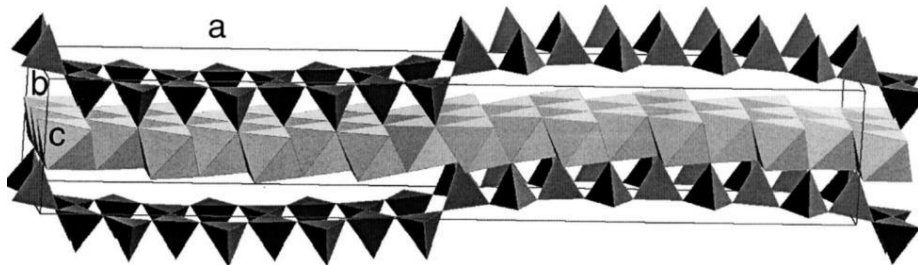


Figura 5: Struttura ondulatoria dell'antigorite (Albonico, 2017)

- crisotilo; lo stress non viene compensato e gli strati T-O si arrotolano formando un cilindro. Le sostituzioni sono minori rispetto a lizardite e antigorite e si genera così il classico aspetto fibroso dell'amianto.

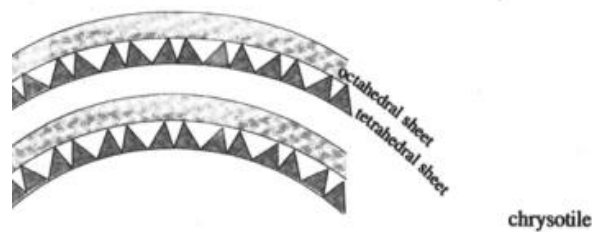


Figura 6: Struttura cristallina del crisotilo. (Rinaudo & Croce, 2020).



Figura 7: Aspetto fibroso del crisotilo (<https://www.sobrero.edu.it/wp-content/uploads/2017/05/LA-STRUTTURA-DEL-SERPENTINO.pdf>).

2.2 L'AMIANTO NELLA STORIA

L'amianto è un minerale che è stato utilizzato molto, fin dall'antichità. Sono state scoperte delle mummie egizie avvolte in teli d'amianto per proteggere il defunto dal deterioramento. Plinio il Vecchio nello scritto "Naturalis Historia" lo definisce come una sostanza rara, utilizzata per cremare i defunti per renderne le ceneri più pure e chiare. (<https://www.infobuildenergia.it>)

Più tardi nel Medioevo, l'amianto viene denominato lana della salamandra. Secondo una credenza popolare, infatti, il rettile riusciva a non bruciarsi con il fuoco proprio perché era rivestito di amianto. Anche Marco Polo nel "Il Milione" parla dell'amianto; secondo l'esploratore era utilizzato nella provincia cinese Chingitalas per filarlo in preziose tovaglie. E intorno al '600 inizia ad essere utilizzato anche per preparare medicinali. Secondo il medico Boezio, infatti, l'amianto sarebbe molto utile nella cura delle ulcere e per guarire i bambini dalla scabbia. In realtà l'uso dell'amianto rimase nei medicinali e nella pasta per le otturazioni dei denti fino al 1960 circa.

Per l'applicazione dell'amianto nell'industria si deve attendere il 1800. Un caso particolare che diede il via all'incremento dell'utilizzo dell'amianto fu' un incendio che provocò 83 morti, in seguito al quale, il Comune di Parigi, decise di utilizzare strutture in amianto per sostituire quelle già esistenti più pericolose e infiammabili realizzate in altri materiali. Successivamente lo stesso esempio venne seguito anche dal Comune di Londra per la metropolitana. Da quel momento l'amianto venne utilizzato anche per la costruzione edile, diventando la base di realizzazioni come palestre, scuole, ospedali e abitazioni civili. (<https://www.spagliarisi.it>)

I prodotti e le applicazioni più diffuse nel settore edilizio comprendono:

- Prodotti in cemento-amianto: lastre, tubazioni, serbatoi, canne fumarie
- Materiali spruzzati come rivestimento ignifugo
- Intonaci con impasti applicati a cazzuola
- Pannelli fonoassorbenti
- Stucchi e collanti per pavimenti e piastrelle

Le principali proprietà che hanno determinato l'ampio utilizzo dell'amianto sono:

- Flessibilità
- Alta resistenza elettrica
- Proprietà termoisolanti
- Alto potere adsorbente
- Elevata resistenza chimico-fisica
- Resistenza all'azione di agenti chimico-biologici
- Potere fonoassorbente

In particolar modo il crisotilo, la crocidolite e l'amosite, sono stati sfruttati negli anni per la loro facile reperibilità e per le loro caratteristiche di resistenza termica e meccanica. Purtroppo, però negli anni, per quanto si pensasse che l'amianto fosse indistruttibile, esso ha mostrato la sua facile deperibilità dovuta alla sua friabilità, rilasciando fibre nell'ambiente che possono essere inalate causando le cosiddette patologie asbesto correlate.

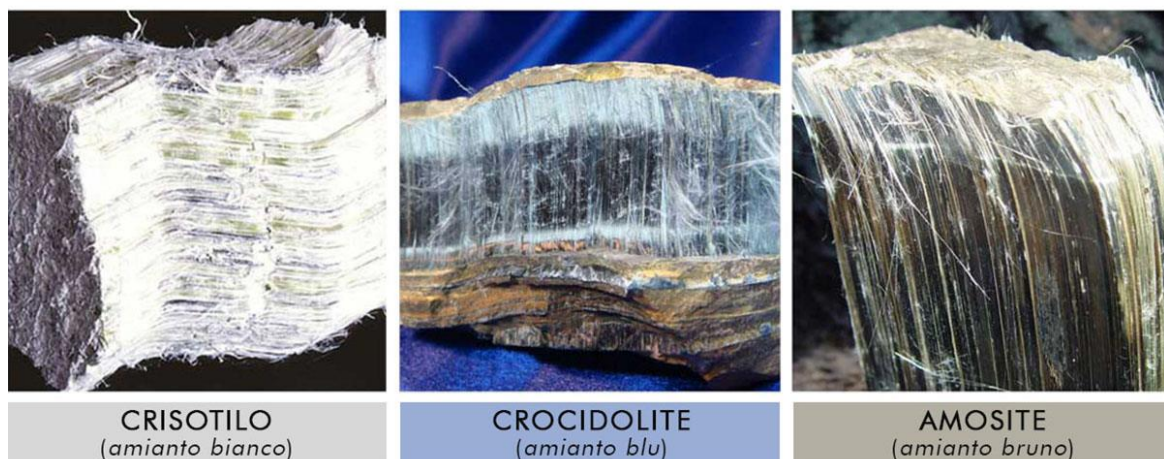


Figura 8: Rappresentazione del crisotilo, della crocidolite e dell'amosite.
(<https://www.infobuildenergia.it>)

2.2.1 AMIANTO IN ITALIA E DIFFUSIONE

L'Associazione Mineraria del Piemonte, tra il 1870 e il 1882, è stata una fra le maggiori produttrici di amianto in Italia. Successivamente fra il 1860 e il 1875, alcune imprese italiane iniziarono a lavorare l'amianto per produrre tessuti, pannelli termoisolanti e corde. Nel 1907 aprì a Casale Monferrato il primo stabilimento Eternit e nel 1912 due ingegneri italiani,

Magnani e Mazza, contribuirono a perfezionare le prime macchine atte alla produzione di cemento- amianto.

Dopo Casale Monferrato, gli stabilimenti Eternit iniziano a propagarsi in tutta l'Italia e la produzione di questi stabilimenti ebbe il massimo picco intorno al 1977. Negli anni successivi accadde qualcosa di inaspettato, un operaio della fabbrica di Casale iniziò a denunciare i danni dovuti all'esposizione all'amianto e questo spinse le autorità sanitarie a fare indagini più approfondite. Nel 1981, circa 80 operai denunciarono la fabbrica e l'Inail a causa del mancato riconoscimento dei danni causati dal minerale e ad oggi si contano più di 3000 decessi a partire dalla prima denuncia, nonostante l'emanazione della Legge n. 36 del 2003 che ordina lo smaltimento di tutti i manufatti in Eternit. Nel 2009, invece, ci furono le prime condanne. (<https://www.spagliarisi.it>)

La maggior parte dell'asbesto venne estratto dalla cava di Balangero (TO), attiva fra il 1907 e il 1990. Tuttavia, furono molti gli intellettuali che si dedicarono a indagare e narrare le condizioni di precarietà lavorativa a cui erano sottoposti gli operai della miniera. Tra questi intellettuali troviamo Primo Levi, che venne assunto sotto falso nome per indagare nel 1941 e scrisse quell'esperienza nel libro "Il sistema periodico. Nichel, 1975" e anche Italo Calvino. Primo Levi scrisse: *"C'era amianto dappertutto, come una neve cenerina: se si lasciava per qualche ora un libro su di un tavolo e poi lo si toglieva, se ne trovava il profilo in negativo; ..."* raccontando le condizioni di pericolo nelle fabbriche destinate alla lavorazione del minerale.



Figura 9: Amantifera di Balangero, TO, anni '40. Montagna avvolta da una nube di polvere. (<https://www.infobuildenergia.it>)

Anche Italo Calvino che arrivò a Balangero nel 1954 denunciò le condizioni lavorative e precarie di Balangero. Nel suo report intitolato *“la fabbrica della montagna”*, egli descrisse la cava con *“quelle gradinate grigie, lucide ad anfiteatro tagliate nella montagna rossiccia di cespugli invernali; la montagna scendeva pezzo a pezzo nei frantoi della fabbrica e veniva risputata in enormi cumuli di scorie, a formare un nuovo, ancora informe sistema montuoso grigio opaco.”* Un pezzo di montagna, che ha ormai perduto la sua originaria naturalezza, dove *“non ce n'è di lepri nel bosco, non crescono funghi nella terra rossa dei ricci di castagno, non cresce frumento nei duri campi dei paesi intorno, c'è solo il grigio polverone d'asbesto della cava che dove arriva brucia, foglie e polmoni, c'è la cava, l'unica così in Europa, la loro vita e la loro morte”*. (<https://www.infobuildenergia.it>)

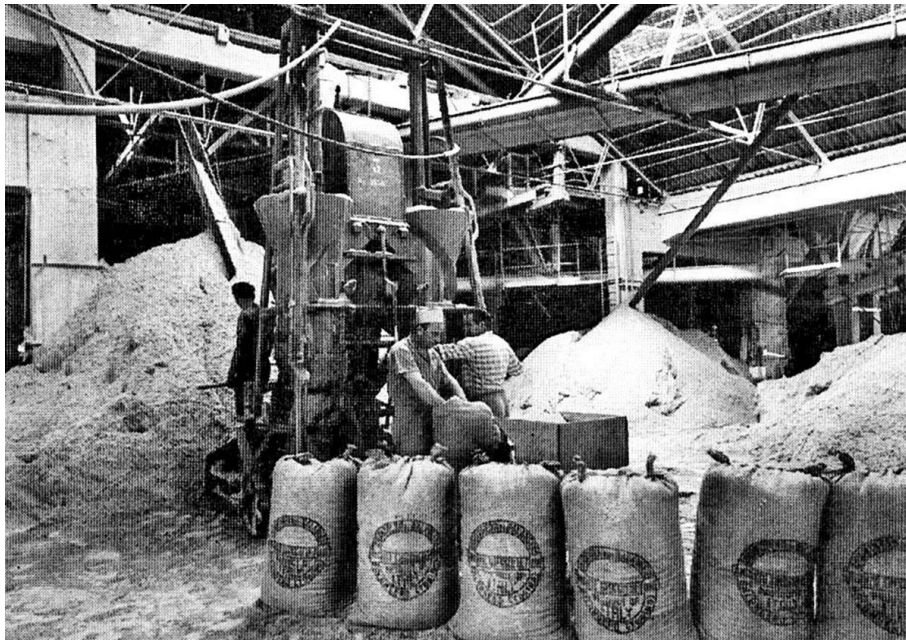


Figura 10: Stabilimento di Balangero, poco distante dalla cava, anni '40. Si noti la totale assenza di misure di sicurezza. (<https://www.infobuildenergia.it>)

2.2.2 ETERNIT

Il chimico Ludwig Hatschek inventò il fibrocemento, ovvero una particolare miscela di amianto, che venne poi acquistata da una ditta belga (Etex). Negli anni il nome Eternit fu il più utilizzato per denominare questa miscela. Il fibrocemento è composto da fibre e amianto, ed è proprio questo che ne conferisce le caratteristiche fibrose che lo rendono molto adatto ai diversi impieghi.

La pericolosità di questo materiale è stata riconosciuta successivamente negli anni, quando è stato dimostrato che con il degrado inizia a sfaldarsi in fibre che, se inalate, possono provocare delle gravi conseguenze. L'industria italiana ha utilizzato molto l'Eternit, soprattutto per realizzare tubature, tetti, canne fumarie e molto altro. L'utilizzo e la produzione nel nostro paese sono stati vietati dal 1992; purtroppo, però, nel nostro paese esistono ancora strutture contenenti il materiale. (<https://www.spagliarisi.it>)



Figura 11: Stabilimento Eternit. (<https://www.spagliarisi.it>).

2.2.3 SIN (SITO DI INTERESSE NAZIONALE)

Il Sito di Interesse Nazionale (SIN), con il perimetro decretato dal Ministero dell'Ambiente il 10 gennaio del 2000, comprende un territorio di 48 Comuni, dei quali 45 in Provincia di Alessandria, 2 in provincia di Vercelli e 1 in Provincia di Asti per una superficie totale pari a 73895 ettari.

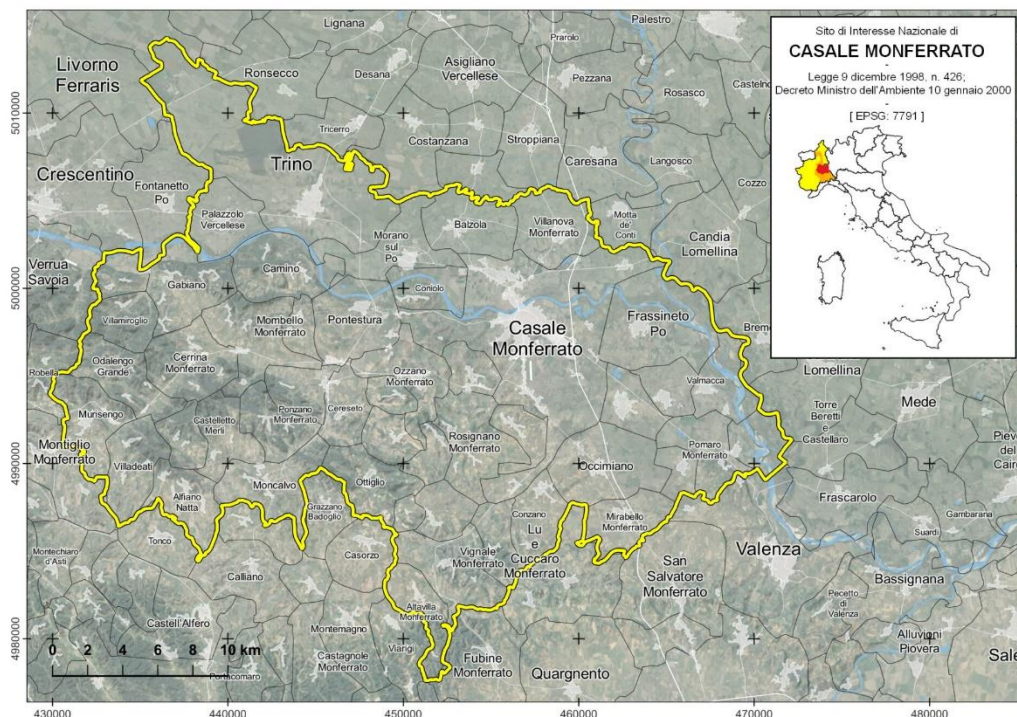


Figura 12: Inquadramento geografico ambientale. (<https://bonifichesiticontaminati.mite.gov.it>).

“I comuni del territorio usufruiscono:

- 1) dei finanziamenti per la bonifica delle COPERTURE PUBBLICHE: l'Amministrazione comunale può ottenerli in Accordo di Programma con Casale Monferrato;*
- 2) dei finanziamenti per la bonifica del friabile o "POLVERINO": i cittadini dei 48 Comuni possono rivolgersi direttamente al Settore Tutela Ambiente del Comune di Casale Monferrato e la bonifica è organizzata ed eseguita gratuitamente;*
- 3) dei CONTRIBUTI per la bonifica delle coperture private: tutti i proprietari di fabbricati siti nel territorio possono partecipare ai bandi del Comune di Casale Monferrato;*

- 4) *del servizio di RITIRO A DOMICILIO dei pacchi di cemento-amianto gratuito fino a 500 mq organizzato dal Comune di Casale Monferrato;*
- 5) *dell'ACCESSO ALLA DISCARICA per amianto di Casale Monferrato.*”
- (<https://www.comune.casale-monferrato.al.it/sin-territorio>).

Il sito si interessa della presenza diffusa di materiali da costruzione contenenti amianto, provenienti dagli ex stabilimenti Eternit di Casale Monferrato. Il SIN è stato incluso nei siti di bonifica di interesse nazionale dalla Legge n 426/1998.

Gli accordi sottoscritti sul SIN sono:

- Accordo di Programma “per la bonifica ed il ripristino ambientale del Sito di bonifica di Interesse Nazionale di Casale Monferrato”, sottoscritto in data 27 aprile 2006 tra il MATTM (Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare), la Regione Piemonte, la Provincia di Alessandria ed il Comune di Casale Monferrato;
- Atto Integrativo all'Accordo di Programma “per la bonifica ed il ripristino ambientale del Sito di bonifica di Interesse Nazionale di Casale Monferrato” sottoscritto in data 30 settembre 2008, tra i medesimi Soggetti.
(<https://bonifichesiticontaminati.mite.gov.it>)

Lo stabilimento Eternit aveva sede nel Comune di Casale Monferrato; la sua attività ha permesso una notevole diffusione dell'amianto sul territorio. Il SIN opera attraverso bonifiche sul territorio al fine di risanare l'ambiente dalla presenza di amianto in matrice friabile e compatta. Gli elementi principali della bonifica del SIN sono.

- bonifica dello stabilimento Eternit e delle zone da esso colpite;
- bonifica del polverino;
- bonifica delle coperture in cemento nel settore pubblico e privato.

Nel settembre del 2016 è stato inaugurato il parco “Eternot”, proprio dove vi era lo stabilimento Eternit prima della sua bonifica e della bonifica della sponda del Po, dove esso scaricava. Gli interventi di bonifica del polverino riguardano sia cortili, sia strade, sia sottotetti, la metodica è stata oggetto di sperimentazione in quanto non c'erano riferimenti normativi; a fronte di 180 siti censiti, ne sono già stati bonificati 170. Per quanto riguarda la

rimozione delle coperture private, il comune di Casale Monferrato, ha pubblicato diversi bandi a partire dal 2005.

Per risanare il territorio e smaltire correttamente l'amianto estratto, è stato realizzato nel 2001, un apposito impianto di discarica atto a ricevere i rifiuti delle bonifiche delle aree, composto da vasche per il polverino e l'amianto in matrice compatta. Nel SIN sono condotte campagne triennali di monitoraggio da parte di Arpa Piemonte sull'aerodisperso. (<https://www.regione.piemonte.it>)

2.3 NORMATIVA ITALIANA

Sebbene più di 50 paesi hanno vietato l'uso di amianto, esistono ancora paesi in cui l'asbesto può essere estratto e lavorato per essere esportato, soprattutto nei paesi in via di sviluppo. L'Italia è stata fra i primi paesi Europei a vietarne la produzione, la vendita e il consumo. Ciononostante, il problema delle malattie asbesto correlate rimane un pericolo per la salute, questo dovuto al fatto che gli effetti dell'esposizione si manifestano sulla salute a distanza di anni.

Con la Legge n. 257 del 27 marzo del 1992, l'Italia mette a bando l'amianto e ne vieta l'estrazione, l'esportazione e importazione, la commercializzazione e la produzione. Dal 1992 ad oggi si sono succedute una serie di norme per ridurre l'utilizzo, l'esposizione e aumentare la prevenzione e la sicurezza per la salute:

- *“Il D. Lgs. 17 n 114, Marzo 1995: definisce i limiti di concentrazione di amianto aero disperso in fase di rimozione e demolizione.*
- *Decreto del Ministero della Sanità 14 Maggio 1996: indica e regola le tipologie di interventi di bonifica*
- *Decreto Ministeriale n. 471, 25 ottobre 1999: definisce dei valori per la concentrazione di amianto, individua i limiti tollerati e stabilisce l'obbligo di bonifica in caso all'interno dell'immobile o nelle sue adiacenze vi sia concentrazione di fibre aero disperse.*
- *Legge n. 426, 9 Dicembre 1998, Decreto Ministeriale 18 Settembre 2001 n. 468, Legge n. 179 2002: vengono individuati in tutto il Paese i siti da bonificare perché contenenti amianto*
- *Decreto n. 248, 29 luglio 2004: regola le attività di recupero dei prodotti realizzati in amianto*

- *Decreto Ministeriale del 3 Agosto 2005: definisce criteri e procedure per l'ammissione dei rifiuti speciali nelle discariche*
- *D. Lgs. n. 257 del 25 luglio, 2006 introduce il titolo "Protezione dei lavoratori contro i rischi connessi all'esposizione ad amianto" nel Dlgs 626/1994" (<https://www.mosaikosrl.net/>)*

2.3.1 LA NORMATIVA A TUTELA DEI LAVORATORI

La mappatura dell'amianto è stata predisposta dall'INAIL in una Banca Dati di Amianto, in convenzione con il Ministero dell'Ambiente. Per la mappatura regioni e province autonome hanno l'obbligo di trasmettere al MiTE (Ministero della Transizione Ecologica) i dati relativi alla presenza di asbesto entro il 30 giugno di ogni anno. Il censimento nazionale risulta ancora parziale in quanto è stato completato solo da 6 regioni su 15, tra cui Campania, Emilia-Romagna, Marche, Piemonte, Provincia Autonoma di Trento e Valle D'Aosta.

Secondo i dati forniti dal CNR (Consiglio Nazionale delle Ricerche) i materiali che contengono amianto in Italia sono circa 32 milioni di tonnellate e secondo l'ONA (Osservatorio Nazionale Amianto) l'asbesto è presente ancora in 2.400 scuole, 250 ospedali e 300.000 km di tubature su 500.000 km.

"Il D.Lgs n 81/2008, al capo III "Protezione dai rischi connessi all'esposizione all'amianto" del titolo IX "Sostanze pericolose", disciplina gli obblighi del datore di lavoro in occasione dello svolgimento di attività lavorative che possano comportare esposizione all'amianto (ossia, ai sensi dell'art. 246 del D.Lgs., "manutenzione, rimozione dell'amianto o dei materiali contenenti amianto, smaltimento e trattamento dei relativi rifiuti, nonché bonifica delle aree interessate), per ognuno dei quali è prevista una specifica sanzione". (<https://temi.camera.it.>)

Nell'articolo 248 viene indicato che il datore di lavoro deve richiedere ai proprietari del locale informazioni sulla composizione della struttura, volto a individuare la presenza di materiali a potenziale contenuto di amianto, prima di ogni eventuale demolizione per prendere le giuste precauzioni in termini di sicurezza sulla salute. Definito il grado di integrità e i valori limite soglia, il datore di lavoro può elaborare con il medico competente un piano di sorveglianza sanitaria per monitorare i livelli di amianto presenti. I risultati periodici devono essere riportati nel documento di valutazione dei rischi e qualora si verifichi un incremento notevole, deve essere segnalato all'ASL di competenza.

L'articolo 249 disciplina la valutazione del rischio dell'amianto nei luoghi di lavoro e i vari obblighi che gravano sul datore di lavoro, quali:

- utilizzo di DPI (dispositivi di protezione individuale) e adeguate misure di prevenzione e protezione per ridurre la dispersione delle fibre di amianto;
- periodico controllo sulla concentrazione di fibre di amianto respirabili, non deve essere superato il valore soglia;
- informare i lavoratori su eventuali rischi per la salute correlati all'amianto;
- formare i lavoratori sulla salute e sicurezza nei luoghi di lavoro;
- sorveglianza sanitaria preventiva e triennale.

(<https://temi.camera.it>)

3 PATOLOGIE ASBESTO CORRELATE

Sebbene ci siano diverse normative che vietano l'utilizzo, la lavorazione e il commercio dell'amianto, sono presenti sul territorio nazionale diversi milioni di tonnellate di materiali contenenti tali minerali.

La via inalatoria e quella orale sono le principali vie di esposizione all'amianto come anche indicato nella valutazione dell'IARC (Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro). Nel 1986 l'OMS indicò come pericolose tutte le fibre di amianto aventi lunghezza $>5\mu\text{m}$, diametro $<3\mu\text{m}$ e un rapporto dimensionale lunghezza/diametro $>3^{14,15,16}$. La pericolosità relativa all'inalazione dipende dal grado di penetrazione nelle vie respiratorie e dalle dimensioni delle fibre stesse: quelle che hanno diametro minore penetrano con più facilità nei bronchi, fino al livello alveolare. Le fibre sono definite respirabili quando hanno un diametro inferiore a $3\mu\text{m}$. Le particelle con diametro maggiore si fermano nelle vie aeree superiori e possono essere eliminate attraverso l'azione delle ciglia e la presenza del muco.

I tre fattori principali che determinano la pericolosità dell'amianto sono:

- morfologia e dimensione;
- clearance e ritenzione (rilevante per gli effetti a lungo termine);
- composizione chimica che può, con reazioni chimiche, condizionare la tossicità delle fibre.

Le fibre depositate possono essere rimosse grazie all'azione di macrofagi alveolari per fagocitosi, le fibre più corte sono eliminate più velocemente rispetto a quelle più lunghe. Si ritiene, pertanto, che i macrofagi non riescano ad eliminare le fibre aventi una lunghezza pari o superiore al loro diametro (7-14 μm). Le fibre lunghe provocano un danneggiamento della membrana dei macrofagi con conseguente rilascio di contenuto lisosomiale, questo scatena una reazione infiammatoria che ha come risultato il danneggiamento delle cellule epiteliali. Le fibre che si ritengono più pericolose per la salute hanno un diametro $>1,5 \mu\text{m}$ e una lunghezza di 8 μm .

A indurre gli effetti tossici e la bio-persistenza, ovvero la capacità delle fibre di persistere in modo inalterato, sono sia la composizione chimica sia la struttura cristallina del solido. Inoltre, le diverse proprietà di superficie influenzano il trasferimento delle fibre nei diversi compartimenti biologici, l'attivazione delle cellule dei macrofagi e la fagocitosi. Si evince, infatti, che il meccanismo che sta alla base della tossicità dell'amianto prevede una complessa interazione fra le fibre minerali e i target cellulari. L'accumulo di fibre nel tessuto polmonare, nella pleura e nei linfonodi è stato dimostrato in soggetti esposti professionalmente per inalazione a fibre di amianto mentre la traslocazione a distretti distanti dal polmone e quindi dal punto iniziale del contatto, come nel caso del tumore ovarico, non è nota.

Sono stati proposti vari meccanismi tra cui:

- infiammazione cronica dovuta a fattori di crescita come il TNF- α e alle specie radicaliche dell'ossigeno (ROS), con conseguente danno al DNA
- danni diretti al DNA dovuti ad una interazione fisica della fibra con gli acidi nucleici
- aumento della proliferazione

Secondo la valutazione della IARC, oltre alle patologie asbesto correlate elencate precedentemente, vi è evidenza sufficiente che l'esposizione ad amianto causi anche carcinoma della laringe e dell'ovaio; vi è inoltre evidenza limitata per i tumori di faringe, stomaco e colon-retto. (<https://www.airc.it>.)

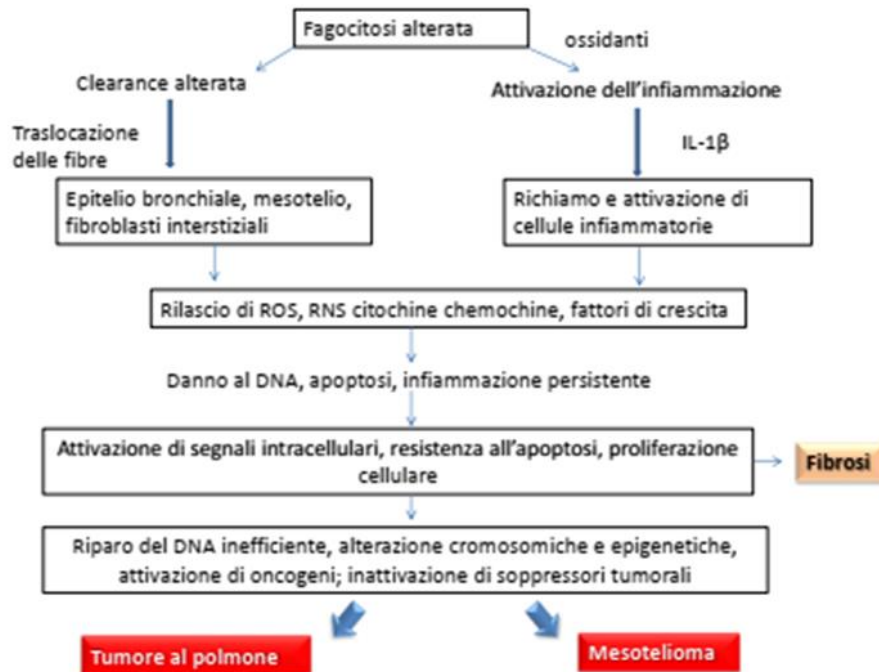


Figura 14: Meccanismi di induzione del tumore al polmone e del mesotelioma. (<https://www.salute.gov.it/>)

3.1 MESOTELIOMA

Il mesotelioma è un tipo di tumore che colpisce il mesotelio, costituito a sua volta dalle cellule mesoteliali, le quali avvolgono la superficie esterna di pleura, peritoneo e pericardio, come anche la tunica vaginale del testicolo.

La pleura si suddivide in due strati, uno più esterno, pleura parietale, che aderisce alla parete toracica, e uno più interno, pleura viscerale, che aderisce al polmone. Il peritoneo è una membrana mesoteliale, anch'essa formata da uno strato più esterno, peritoneo parietale, e uno più interno, peritoneo viscerale. Il peritoneo parietale riveste la cavità addominale e parte di quella pelvica mentre il peritoneo viscerale avvolge gran parte degli organi interni, come fegato, stomaco, intestino, ecc., facendoli aderire alle pareti della cavità.

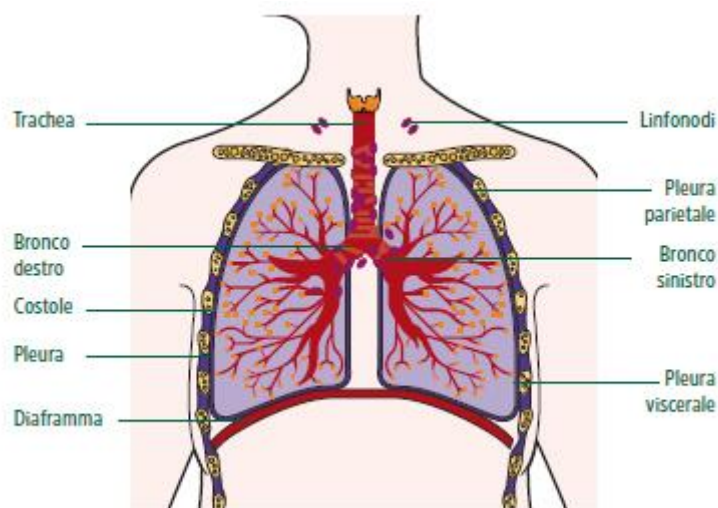


Figura 15: Rappresentazione vie aeree superiori. (<https://www.aimac.it>)

Il mesotelioma è una patologia piuttosto rara, con una frequenza di 0,5 – 2 casi su un milione l'anno, che ha avuto un aumento intorno agli anni '70. Il mesotelioma pleurico è molto più frequente, circa dell'80%, rispetto a quello pericardico e peritoneale, e pur essendo malattie rare, sono pericolose perché non danno sintomi precoci, bensì, si manifestano quando sono in uno stadio avanzato, avendo procurato danni irreversibili, sui quali le cure non hanno più effetto. Il ReNaM ha incluso 6057 casi in uno studio condotto dal 1993 al 2012, di questi, 4134 (68,25%) sono stati collegati allo sviluppo della patologia in seguito all'esposizione all'amianto. Le regioni maggiormente colpite sono state la Lombardia con 2276 casi e il Piemonte con 1104 casi, come mostrato in tabella:

Region	ReNaM Cases	INPS Linked	ReNaM Records	INPS Records
Piedmont	1104	742 (67.21%)	2490	1885
Lombardy	2276	1595 (70.08%)	3965	4083
Emilia-Romagna	891	634 (71.16%)	1367	1906
Tuscany	906	568 (62.69%)	3465	1600
Lazio	289	189 (65.40%)	634	613
Apulia	335	208 (62.09%)	440	642
Sicily	256	198 (77.34%)	440	873
Total	6057	4134 (68.25%)	12,801	11,602

Tabella 2: Regioni maggiormente colpite da mesotelioma secondo la rivista ReNaM fino al 2012. (Airoldi C. et al., 2020)

Un recente studio, condotto nel 2023, si è concentrato sull'insorgenza prematura della malattia in lavoratori del cemento- amianto. Lo studio ha incluso 12578 lavoratori provenienti da 21 coorti: 6626 erano i decessi totali, di cui 858 per cancro ai polmoni e 394 per neoplasia maligna della pleura. Il tempo di accelerazione per la mortalità totale è stato di 3,35 (IC 95% da 2,98 a 3,71) per chi era stato esposto entro i 20 anni e 6,70 (IC 95% da 5,95 a 7,41) per chi era stato esposto entro i 40 anni. Lo studio ha osservato un marcato aumento del tasso di mortalità dopo l'esposizione all'amianto per il cancro al polmone e il mesotelioma pleurico, nonché per la mortalità totale. (Azzolina D. et al., 2022).

A Casale Monferrato l'incidenza di mesotelioma è più alta rispetto a quella riscontrata in altre città e regioni. Anche le mogli dei lavoratori hanno mostrato un forte aumento dei decessi per mesotelioma. Diversi studi condotti dalla IARC, hanno evidenziato, soprattutto tra gli anni 1980 e 1991, nei relativi ospedali della Regione Piemonte, non solo l'esposizione professionale ma anche quella domestica e ambientale. Questi studi hanno indotto l'implementazione di un registro regionale dei mesoteliomi che monitora l'epidemia di mesotelioma nella zona di Casale Monferrato. Per quanto riguarda i dati più recenti, dagli anni 2013 al 2017, l'incidenza della patologia nel casalese era di 54/100000 abitanti negli uomini e 32/100000 nelle donne. Il Registro Mesoteliomi Piemontese è stato uno dei registri locali che ha contribuito allo sviluppo del Registro Nazionale Mesoteliomi (ReNaM), il quale segue un protocollo standardizzato per raccogliere le informazioni dei soggetti. Recentemente, il ReNaM ha pubblicato un report che comprende 31572 casi di mesotelioma nel periodo 1993-2018, di cui il 69,1% era dovuto ad un'esposizione professionale, il 5,1% ad un'esposizione familiare, il 4,3% ad un'esposizione ambientale e l'1,5% ad un'esposizione dovuta ad attività nel tempo libero. L'analisi dei casi di mesotelioma a Casale Monferrato (Tabella 3) ha evidenziato un diverso rapporto tra i sessi in relazione all'esposizione professionale o non professionale (Magnani C. et al., 2023):

	Ever Workers at Eternit: Direct Exposure to Asbestos				Never Workers at Eternit but Indirect Exposure to Eternit Asbestos				Indirect/Direct (Both Sexes)
	Women	Men	Total	M/F	Women	Men	Total	M/F	
1990–1994	9	27	36	3.0	24	20	44	0.8	1.2
1995–1999	10	24	34	2.4	38	31	69	0.8	2.0
2000–2004	11	29	40	2.6	49	59	108	1.2	2.7
2005–2009	8	21	29	2.5	51	47	98	0.9	3.4
2010–2014	2	14	16	7.0	39	53	92	1.4	5.8
2015–2017	0	7	7	-	37	29	66	0.8	9.4
Total	40	122	162	3.1	238	239	477	1.0	2.9

Tabella 3: Casi di mesotelioma nella zona di Casale Monferrato divisi per sesso e periodo di diagnosi. L'incidenza dei lavoratori esposti e di quelli non esposti è pari. (Magnani C. et al., 2023)

I sintomi più frequenti nel mesotelioma pleurico sono:

- dispnea dovuto al versamento pleurico
- tosse
- dolore toracico
- malessere generico e perdita di peso

I sintomi più frequenti del mesotelioma peritoneale sono:

- cachessia
- gonfiore e dolore addominale a causa dell'ascite
- ostruzione intestinale
- anemia
- febbre e malessere generale

La diagnosi della malattia non è per niente facile. Si inizia con esami fisici, TC del torace e risonanza magnetica, qualora risultasse esserci un inspessimento della pleura, in un soggetto che è stato esposto ad amianto, la diagnosi clinica di mesotelioma ha una probabilità molto alta, ma deve essere confermata da una successiva analisi al microscopio di un campione di tessuto prelevato praticando una piccola incisione nel torace o nell'addome (biopsia) (Esame istologico). Si può eseguire un'ulteriore analisi cito-patologica del versamento, tramite l'aspirazione con una siringa, qualora il fluido sia presente in quantità sufficienti (Esame citologico). Tuttavia, l'assenza di cellule maligne non esclude la

probabilità dell'insorgenza della malattia, ma rende la diagnosi meno probabile. L'esame citologico che viene eseguito se il materiale raccolto viene incluso in paraffina (Cito-incluso) non sarà solo indicativo richiedendo una conferma istologica su un campione bioptico, ma potrà essere anche già diagnostico se confrontato con il quadro clinico. Molto importante nella diagnostica cito/istologica (Anatomo-patologica) l'analisi immunohistochimica per la diagnosi differenziale. (<https://www.aimac.it/>)

Esistono tre tipi istologici di mesotelioma maligno:

- l'istotipo epitelioide è quello più frequente, formato da aggregati di cellule atipiche epitelioidei mesoteliali raggruppati in fasci, acini aventi un aspetto simile all'adenocarcinoma. Esistono sottotipi e varianti come la forma pleomorfa, caratterizzata da cellule anaplastiche, o quella linfo-istiocitoide caratterizzata da un infiltrato infiammatorio.

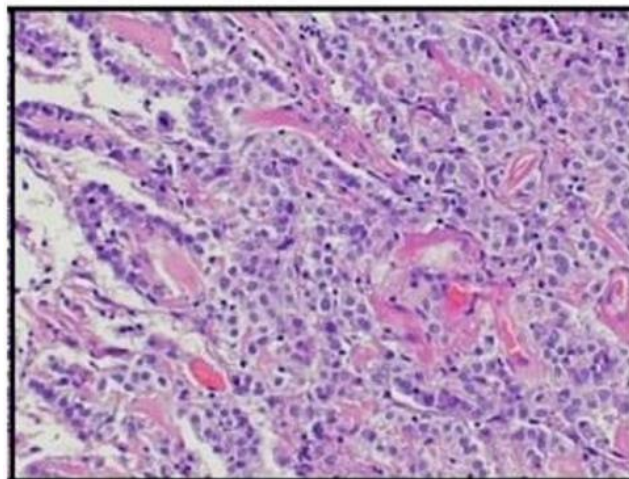


Figura 16: Istotipo epitelioide. (Ponziano, 2022)

- l'istotipo sarcomatoide è composto da cellule fusiformi che infiltrano i tessuti molli della pleura parietale o del parenchima polmonare. Ha un aspetto simile al fibrosarcoma o all'istiocitoma fibroso maligno. Anche in questo caso si osservano poi sottotipi e varianti, come il mesotelioma sarcomatoide pleomorfo e il tumore desmoplastico.

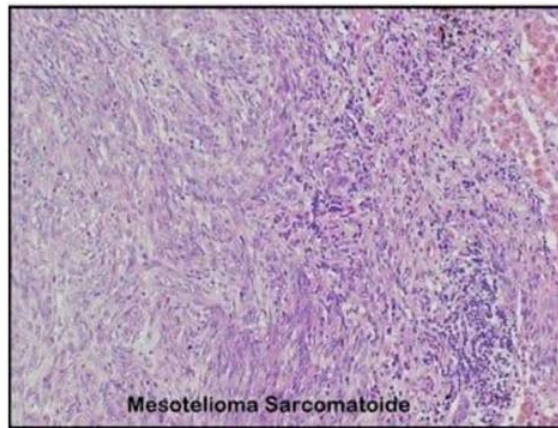


Figura 17: Istotipo sarcomatoide. (Ponziano, 2022)

- l'istotipo bifasico: raggruppa entrambi i tipi istologici precedenti, e presenta almeno il 10% di una delle due componenti.

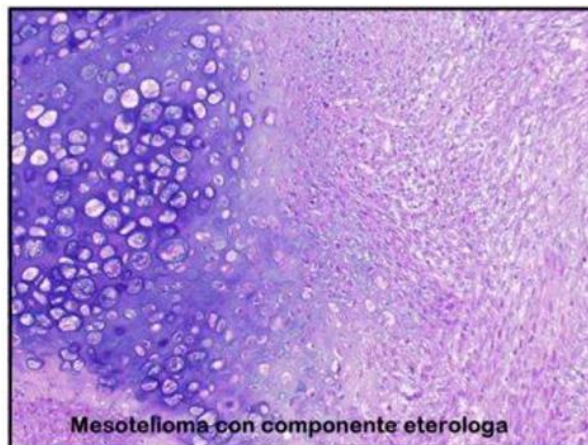


Figura 18: Istotipo bifasico. (Ponziano, 2022)

“Recentemente sono stati infine identificati anche criteri clinico-patologici per la diagnosi di mesotelioma maligno in situ che rappresenta una proliferazione monostratificata mesoteliale atipica con dimostrata alterazione molecolare in senso maligno (es. perdita dell'espressione della proteina BAP1 o di MTAP, delezione di CDKN2A in FISH), ma in assenza macro/microscopica o radiologica di invasione diretta pleurica per almeno 1 anno dalla diagnosi e discussione multidisciplinare della diagnosi. Il tumore adenomatoide è una rara forma benigna di proliferazione mesoteliale”. (AIOM, 2021)

La scelta del trattamento dipende dal sottotipo istologico, dallo stadio del tumore al momento della diagnosi ma anche dalle caratteristiche del paziente quali salute ed età. Il mesotelioma è difficile da curare perché occupa una superficie ampia, dalla quale si separano facilmente cellule maligne che possono dare origine a metastasi, inoltre è molto invasivo negli organi circostanti e ha un intervallo di latenza variabile. In base alle linee guida della Società Europea di Oncologia Medica per diagnosi, terapia e fasi successive alla terapia della malattia, la stadiazione clinica si basa sui dati della toracosopia e sulle immagini della tomografia computerizzata.

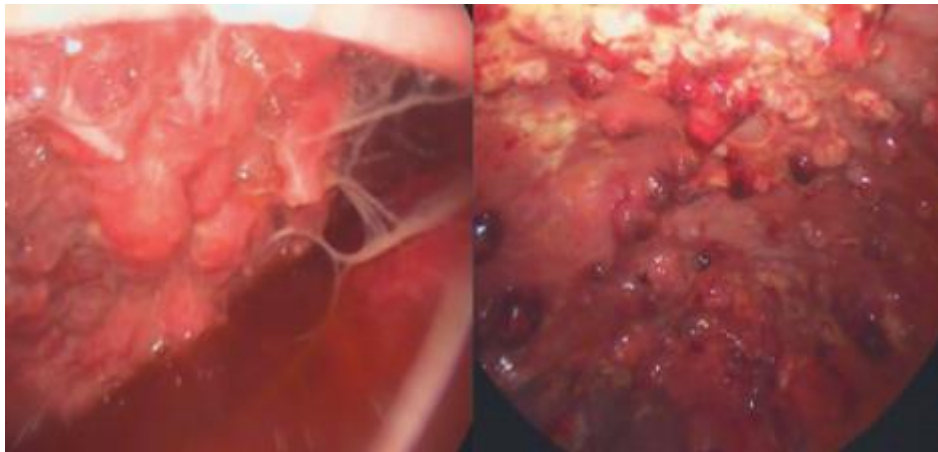


Figura 19: Immagini endoscopiche di mesotelioma pleurico maligno (Taddei et al., 2018).

Per la stadiazione si utilizza il sistema TNM (T= tumore, N= linfonodi, M= metastasi) che colloca i pazienti in diverse categorie mostrate in tabella:

Stadio	TNM	Caratteristiche
Ia	T1a N0 M0	Tumore primitivo confinato alla pleura parietale.
Ib	T1b N0 M0	Come lo stadio Ia con coinvolgimento della pleura viscerale.
II	T2 N0 M0	Come lo stadio Ia o Ib con coinvolgimento del diaframma o della pleura viscerale o del polmone.
III	T3 N0 M0	Tumore localmente avanzato (coinvolge il polmone).
	T3 N1 M0	Coinvolti i linfonodi bronco-polmonari dello stesso lato o dell'ilo.

	T3 M0	N2	Coinvolti i linfonodi sottocarenali (biforcazione bronchiale) o mediastinali omolaterali.
IV	T4 M1	N3	Tumore localmente avanzato e non asportabile chirurgicamente. Coinvolti i linfonodi controlaterali mediastinali, mammari e/o sopraclavicolari omolaterali o controlaterali. Metastasi a distanza.

Tabella 4: Classificazione in base alla stadiazione del tumore. (Stahel et al., 2010)

Come per tutti i tipi di tumore, il trattamento principale avviene tramite radioterapia, chirurgia e chemioterapia. Per quanto riguarda la chirurgia, funziona molto bene come tecnica, ma se associata a radioterapia e chemioterapia le probabilità di successo aumentano. La chirurgia maggiormente diffusa è la pleurectomia, nella quale si asporta un tratto di pleura. La radioterapia viene eseguita dopo la chirurgia, molte volte in combinazione con la chemioterapia con lo scopo di allungare la vita e migliorarne la qualità. Gli studi hanno dimostrato che l'unico modo efficace per combattere la malattia è tramite il trattamento chemioterapico, anche se gli effetti collaterali possono essere molto severi, come vomito, malessere, riduzione delle cellule del sangue, ulcere, ecc. nei casi che si presentano con versamento pleurico, per inibire la formazione del versamento pleurico responsabile della dispnea e del dolore toracico, si esegue il talcaggio della cavità pleurica, da solo o in combinazione successivamente con le terapie sopra descritte. (<https://www.aimac.it/>)

3.1.1 VESICOLE EXTRACELLULARI

Le limitate conoscenze relative all'esposizione all'amianto e alla mancanza di opzioni terapeutiche efficaci per questo tumore per la maggior parte dei casi letale suggeriscono un'immediata necessità di comprendere i meccanismi patogenetici del mesotelioma maligno. Attualmente vi sono molte ricerche volte allo studio delle nano-vescicole.

In seguito all'attivazione cellulare o all'apoptosi si formano per gemmazione dalla membrana cellulare delle vescicole extracellulari, aventi un diametro che varia da 0.1 a 1 µm e molto eterogenee per quanto riguarda la composizione. La microvescicolazione è un processo biologico che può avvenire in tutti i tipi cellulari, anche nei fluidi; pertanto, il liquido pleurico

è un fluido ideale per studiare le microparticelle. Le microparticelle derivanti dalle cellule tumorali suscitano molto interesse perché avendo le caratteristiche della cellula tumorale di origine possono offrire molte informazioni a riguardo. Si tratta di sacche eterogenee ancorate alla membrana che vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare. Il tumore può produrre queste vescicole anche senza stimolazione. (Roca E, 2022)

3.1.2 ESOSOMI

Sono specifiche microparticelle extracellulari aventi un diametro inferiore a 150 nm. Sono state scoperte intorno agli anni '80 ma solo recentemente sono state utilizzate nella ricerca. La loro superficie è composta da una membrana lipidica che può contenere DNA, miRNA, RNA, ecc. La presenza di queste proteine superficiali e la loro stabilità li rende dei potenziali messaggeri extracellulari, in grado di raggiungere cellule molto distanti fra loro, rendendo possibile un'eventuale comunicazione intercellulare. La comunicazione esosomiale è molto utilizzata dai vari sistemi biologici per la loro funzione immunitaria, per la riparazione di tessuti e la segnalazione al sistema nervoso.

Una prima ricerca sugli esosomi ed il mesotelioma maligno era finalizzata a ricercare gli esosomi avente come carico proteico quello del liquido pleurico di pazienti affetti da neoplasia. Gli esosomi sono stati isolati mediante ultracentrifugazione dal liquido pleurico di pazienti aventi il mesotelioma maligno, il cancro al polmone, cancro della mammella o dell'ovaio. La tecnica MALDI-TOF ha identificato grandi quantità di proteine esosomiali, fattori del complemento e peptidi provenienti dalle immunoglobuline. Alcune di queste proteine sono la proteina SNX25 (proteina sorting nexin), la BTG1 (proteina B-Cell traslocazione delle cellule B1) e PEDF (fattore derivato dall'epitelio pigmentato). Sia BTG1 che PEDF sono proteine in grande abbondanza negli esosomi provenienti da processi maligni. Mentre con la tecnica del Western Blot sono state trovate molecole MHC di classe II, HSP90 e immunoglobuline G e M.

Nel 2005 alcuni studi hanno portato alla luce interessanti funzioni immunologiche degli esosomi secreti da cellule tumorali del cancro al seno e del mesotelioma e hanno dimostrato come la presenza di questi alterasse l'espressione del recettore NKG2D sui leucociti ematici target. Negli anni successivi alcuni ricercatori hanno studiato gli effetti della modulazione genica e il carico proteomico degli esosomi provenienti da cellule esposte all'amianto. Sono state messe in coltura cellule polmonari BEAS2B o macrofagi THP1 (prime cellule note a

incontrare l'amianto durante l'inalazione) con l'amianto, successivamente sono stati isolati gli esosomi. Questi sono stati poi sottoposti a una spettrometria tandem di massa ed è stato dimostrato che 145 proteine appartenevano agli esosomi delle cellule epiteliali mentre 55 erano diverse in termini di quantità nel gruppo esposto all'amianto, e tra queste vi erano la vimentina, l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1, la trombospondina e il glicano-1. Dopo l'analisi proteomica degli esosomi dei macrofagi, su 785 proteine isolate, 32 erano presenti in quantità diverse tra il gruppo di controllo e quello di esposizione all'amianto. Questo studio ha portato alla scoperta del fatto che gli esosomi provenienti da cellule esposte all'amianto sono in grado di modificare geneticamente le cellule mesoteliali in modo simile a come cambierebbero le fibre di amianto stesse.

Altri studi sono stati effettuati con cellule di mesotelioma umano, plasma di campioni esposti all'amianto e campioni di persone affette da mesotelioma. Sono state condotte ricerche confrontando le cellule malate con esosomi plasmatici isolati da pazienti sani, dal gruppo non tumorale esposto all'asbesto e da gruppi di mesotelioma con esposizione all'asbesto e anche in questo caso le proteine erano maggiori nei diversi gruppi patologici rispetto ai controlli. (Roca E, 2022)

Le vescicole extracellulari permettono di individuare il tumore prima che sia diagnosticato, ma la massa deve già essere presente. L'obiettivo è quello di utilizzare queste vescicole anche come screening per identificare la patologia prima che questa insorga con sintomi clinici.

4 TESSUTI EXTRAPOLMONARI

4.1 APPARATO GASTROINTESTINALE

Il tratto digerente permette il passaggio delle sostanze dalla cavità orale fino all'eliminazione dello sfintere anale. È costituito da:

- Bocca
- Faringe
- Esofago
- Stomaco
- Intestino: suddiviso in intestino tenue ed intestino crasso

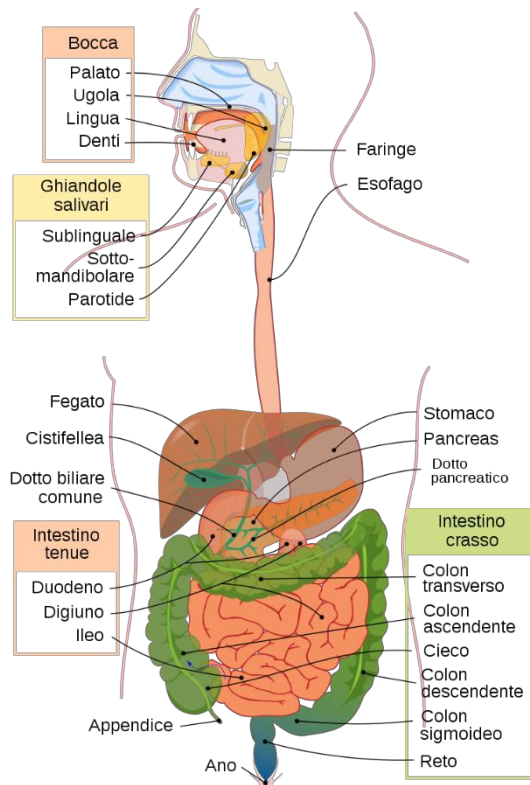


Figura 20: Apparato digerente. (https://it.wikipedia.org/wiki/Apparato_digerente).

Bocca, faringe e parte superiore dell'esofago sono caratterizzati da un epitelio pavimentoso stratificato; la restante parte dell'apparato digerente presenta tre tonache:

- mucosa: parte più interna, formata da una lamina propria dove poggia uno strato di cellule epiteliali pavimentose stratificate e da una muscolaris mucosae, strato di muscolatura con la funzione di far contrarre i dotti ghiandolari per riversare le sostanze nel lume;
- sottomucosa: spesso strato di connettivo lasso che contiene vasi linfatici, sanguigni ed è caratterizzato dalla presenza di ghiandole. In questo strato è presente il Plesso Sottomucoso del Meisner che controlla l'attività secretoria del tratto;
- muscolaris externa: rappresenta il vero muscolo, caratterizzato da uno strato di muscolo liscio. In questo strato troviamo il Plesso Mienterico di Auerbach che coordina l'attività motoria (peristalsi).
- a chiudere questi layer è la Sierosa, strato di lamine monostratificate di mesotelio.

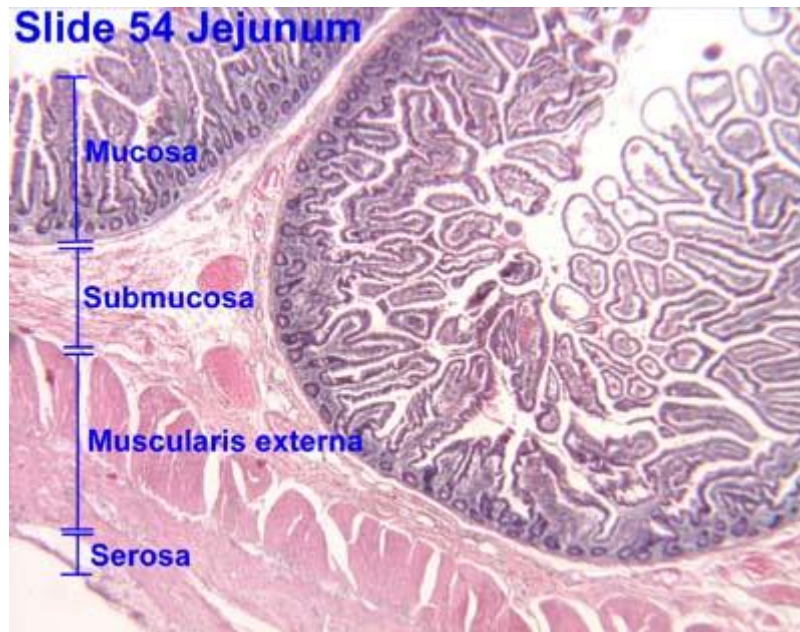


Figura 21: Suddivisione delle tonache del tratto digerente. (<https://manualidimedicina.blogspot.com/>).

L'attività motoria del tratto ha la funzione di controllare la progressione ab-orale, la frammentazione e il rimescolamento del cibo con i succhi digestivi. Il movimento è regolato e innervato dal sistema nervoso autonomo ed enterico, da ormoni ma anche da cellule pacemaker modificate, dette cellule di Cajal, che impartiscono il movimento in modo automatico permettendo di mantenere un ritmo elettrico di base, che permettere di mantenendo il muscolo in uno stato di preallerta, in modo tale da generare una contrazione in modo più veloce e facile in seguito a uno stimolo avvenuto sulla muscolatura.

Gli ormoni che regolano il tratto sono:

- gastrina: prodotta dallo stomaco, regola la secrezione gastrica di acido cloridrico e stimola la motilità dello stomaco durante la digestione;
- secretina: stimola la secrezione acquosa di bicarbonato e regola l'acidità gastrica;
- colecistochinina: induce contrazione della cistifellea nella digestione, induce il rilascio della componente enzimatica del pancreas esocrino, coopera nel controllo del piloro e regola il rilascio dello sfintere di Oddi;
- grelina: ormone che induce fame a digiuno;
- somatostatina: molecola che inibisce il fattore di crescita a livello ipotalamico e inibisce l'eccesso di acido nello stomaco;

- istamina: a livello gastrico è un cofattore di rilascio di acido cloridrico dalle cellule parietali.

Gli sfinteri sono le valvole del tratto che regolano il passaggio del materiale, generalmente chiusi, si aprono in seguito ad uno stimolo e sono i seguenti:

- sfintere gastro-esofageo (Cardias): via di accesso allo stomaco;
- sfintere pilorico: regola il passaggio dallo stomaco al duodeno;
- sfintere di Oddi: immette il succo pancreatico e la bile nel duodeno;
- sfintere ileo-cecale: regola il passaggio dal tenue al crasso;
- sfintere anale: suddiviso in interno (involontario) che regola il rilassamento dell'ampolla rettale, ed esterno (volontario) che controlla lo stimolo per la defecazione. (Magnelli, V., 2022)

4.1.1 FARINGE

La faringe è il canale che mette in comunicazione la gola con l'esofago, ma svolge anche una doppia funzione:

- fa parte delle vie aeree superiori, quindi permette il passaggio dell'aria dal naso, immettendola nella laringe;
- è il primo tratto del tubo digerente che attraverso la deglutizione riceve il cibo dalla bocca e lo trasporta all'esofago.

La faringe ha una classica forma ad imbuto ed è composta da tre parti:

- rinofaringe: parte più alta, permette il passaggio dell'aria ed è in comunicazione con la tromba di Eustachio per garantire un assestamento della pressione sulla membrana timpanica;
- orofaringe, quella che comunemente chiamiamo gola, separata dalla rinofaringe grazie al palato molle;
- ipofaringe: parte inferiore, in comunicazione con l'esofago.

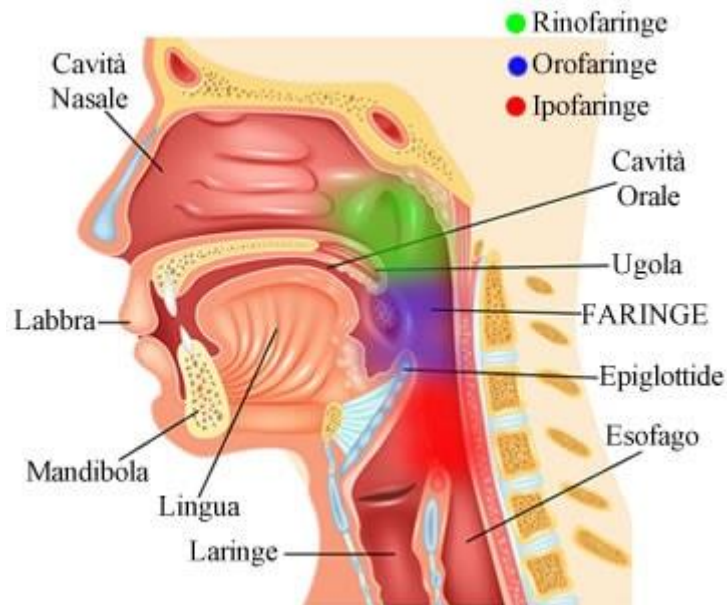


Figura 22: Anatomia della faringe. (<https://www.my-personaltrainer.it/>)

Rinofaringe, orofaringe e ipofaringe sono rivestite da epitelio squamoso pluristratificato ma la rinofaringe in prossimità delle coane si trasforma in epitelio ciliato pseudostratificato. Esistono diverti tipi di muscolatura: il costrittore superiore della faringe, il costrittore medio della faringe e il costrittore inferiore della faringe.

4.1.2 ESOFAGO

L'esofago è lungo circa 25 cm ed ha un diametro di 2,5 cm, è posizionato a partire dal collo e si allunga fino a raggiungere l'addome. Ha la funzione di permettere il passaggio del bolo, ovvero cibo masticato e parzialmente digerito dagli enzimi digestivi della saliva, dalla bocca allo stomaco. (<https://www.gavazzeni.it/>)

4.1.3 STOMACO

Lo stomaco è un organo sacciforme, con la funzione di serbatoio. Raccoglie il bolo e attraverso reazioni chimiche (proteasi, acidi, ecc.) e movimenti peristaltici trasforma il bolo in chimo frantumandolo in porzioni più piccole. Lo stomaco ha una forma a "J", è alloggiato nel peritoneo ed è agganciato agli organi circostanti grazie al piccolo omento (connette lo stomaco a fegato e duodeno) e al grande omento (connette lo stomaco all'intestino).

Nello stomaco si differenziano diverse porzioni

- cardias, canale che collega l'esofago allo stomaco;
- fondo, rappresenta la parte superiore;
- corpo, parte centrale che raccoglie il materiale;
- antro pilorico, zona che collega lo stomaco al duodeno.

L'attività di rimescolamento del cibo è facilitata da tre tipi di muscolatura presenti: longitudinale esterna, circolare media, e obliqua interna.

Anatomia dello stomaco

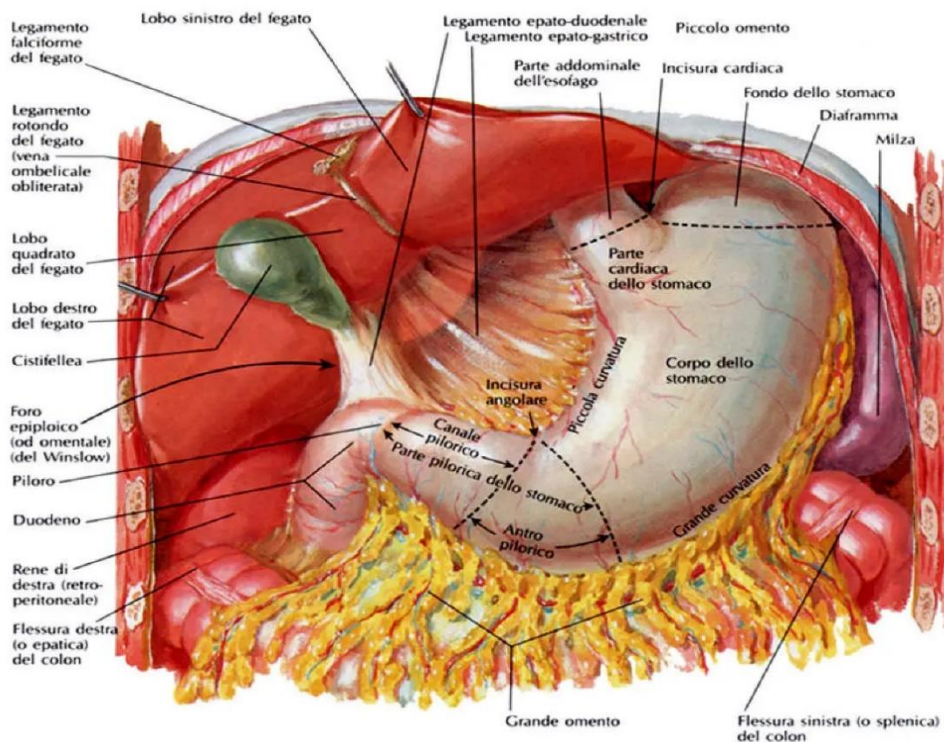


Figura 23: Anatomia dello stomaco. (<https://www.gastroepato.it>)

Nello stomaco troviamo diversi tipi di cellule gastriche che partecipano all'attività secretoria:

- cellule mucipare: secernono muco ricco di bicarbonato e permettono la formazione del layer mucoso con funzione protettiva;
- cellule parietali o ossintiche: hanno una doppia produzione, secernono sia l'acido cloridrico sia il fattore intrinseco di Kestel, fondamentale per l'assorbimento della vitamina B12. Il fattore fa sì che la vitamina venga assorbita prima di essere bersaglio della flora intestinale;

- cellule peptiche o principali: producono i pepsinogeni, precursori delle pepsine. Le pepsine sono enzimi che vengono attivati nel lume gastrico dall'acido cloridrico, una volta attive attaccano le proteine e le frammentano in peptidi. Le pepsine funzionano ad un pH acido, di circa 2- 2,5.
- cellule che producono somatostatina;
- cellule che producono gastrina;
- cellule che producono istamina.

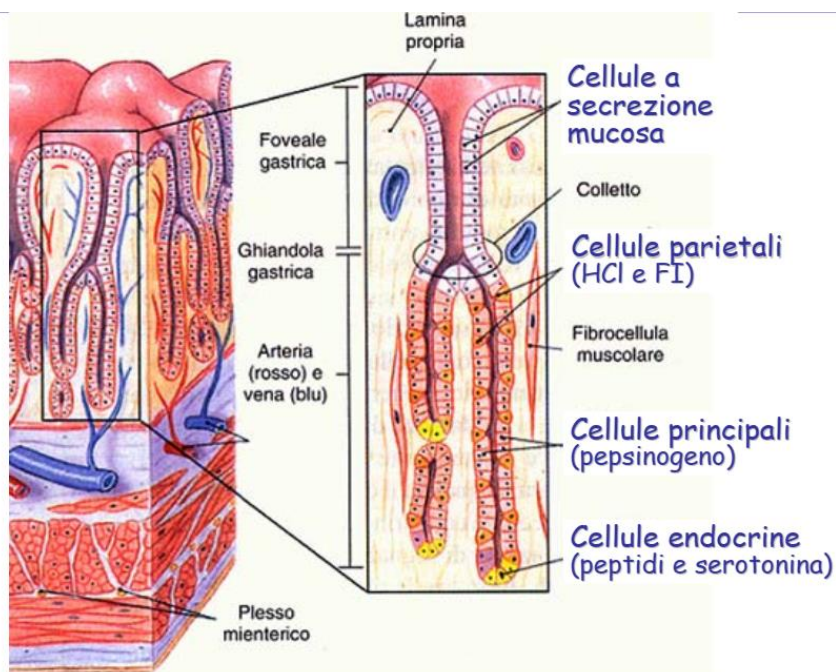


Figura 24: Cellule gastriche. (<https://www.disputer.unich.it>)

Le cellule ossintiche sono particolari, nella fase digestiva vanno incontro ad una transizione morfo-funzionale e cambiano sia l'aspetto, sia il meccanismo d'azione. Nella cellula ossintica a riposo ci sono delle vescicole quiescenti; nel momento in cui la cellula viene stimolata queste si fondono con la membrana aumentandone la superficie apicale. Questo meccanismo viene messo in atto per attivare una pompa protonica che immette protoni nel lume. La pompa trasporta protoni all'interno grazie all'azione dell'anidrasi carbonica, la quale idrata l'anidride carbonica (CO_2) portando alla formazione di ioni bicarbonato (HCO_3^-) e protoni (H^+). Questi protoni grazie alla pompa protonica vengono trasportati attivamente nel lume in contro trasporto con il potassio (K^+). Il bicarbonato, invece, esce sulla membrana scambiandosi con il cloro (Cl^-), che entra all'interno. Il bicarbonato recuperato sulla

membrana forma la montata alcalina che caratterizza il processo digestivo e verrà poi neutralizzato dai protoni che verranno prodotti dal pancreas.

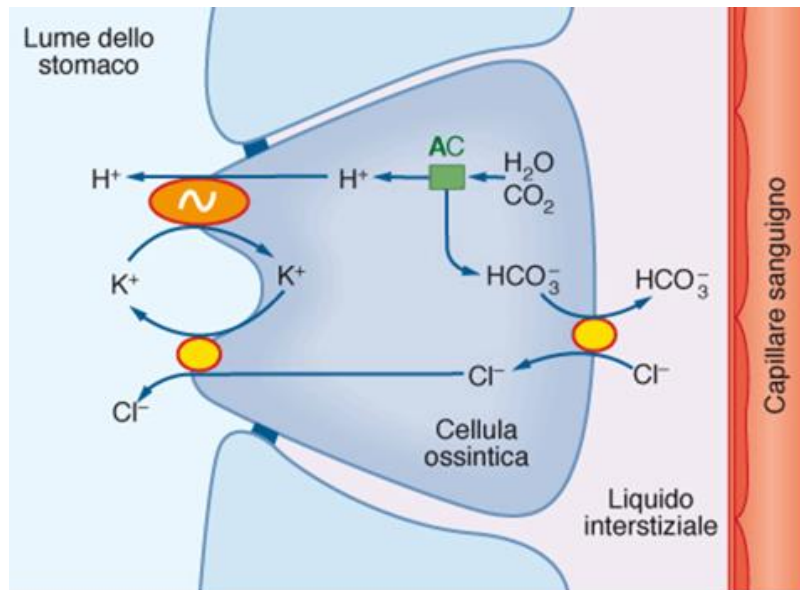


Figura 25: Attivazione pompa protonica e formazione dell'acido cloridrico. (Taglietti & Casella, C. 2015).

La transizione morfo- funzionale avviene per tre fattori:

- acetilcolina: rilasciata dai terminali vagali, agisce sui recettori muscarinici, in particolare su M3. Questo recettore è accoppiato a proteine G che attivano la cascata dell'IP3-DAG liberando il calcio dal reticolo;
- gastrina: agisce sul recettore CCKB, accoppiato anch'esso ad una proteina G e promuove l'aumento di calcio nella cellula;
- istamina: attiva la via dell'adenilato ciclasi e della PKA portando ad un ulteriore aumento di calcio.

Questo meccanismo avviene nella fase cefalica, ovvero prima dell'introduzione del cibo, dove viene stimolato il centro autonomo bulbare, creando quella sensazione nota come 'acquolina'. Questo stimolo attiva il nervo vago, il quale inizia a rilasciare acetilcolina che va ad agire sulle cellule gastrina, istamina secernenti. Questo porta ad un aumento della concentrazione gastrica, ma quando questa aumenta troppo interviene la somatostatina inibendo l'istamina. Per quanto riguarda i pepsinogeni, sono anch'essi stimolati nella fase cefalica ma si attivano solo dopo l'arrivo del materiale. Questo meccanismo avviene anche nel duodeno. (Magnelli, V. 2022)

4.1.4 INTESTINO

L'intestino si suddivide in due porzioni, quella superiore definita intestino tenue e quella inferiore definita intestino crasso. L'intestino tenue ha una lunghezza di circa 7m, presenta delle ghiandole tubulari rappresentate dalle Cripte del Lieberkuhn, situate fra i villi intestinali, i quali hanno il compito di assorbire i nutrienti introdotti con il cibo. Vi sono anche delle pliche circolari che contribuiscono ad aumentare la superficie di assorbimento. A livello intestinale è presente anche un vaso linfatico latteale che ha il compito di assorbire il materiale lipidico tramite i chilomicroni. Lungo le pareti delle cripte ci sono diversi tipi di cellule, alcune secernono muco, altre somatostatina; sul fondo delle cripte, invece, troviamo le cellule staminali che rimpiazzano continuamente le cellule che vengono perse. Sono presenti anche le cellule del Paneth, che producono lisozima.

L'intestino tenue è formato dal:

- duodeno: lungo circa 25 cm, a forma di C. È ricoperto da una mucosa che elabora la secretina e la serotonina e sono presenti le ghiandole del Brunner che secernono muco alcalino per proteggere il tratto dal chimo acido. Presentano pochi villi;
- digiuno: parte centrale dell'intestino tenue, ha pareti spesse ed è ricco di villi intestinali;
- ileo: caratterizzato da pareti più sottili e da villi.

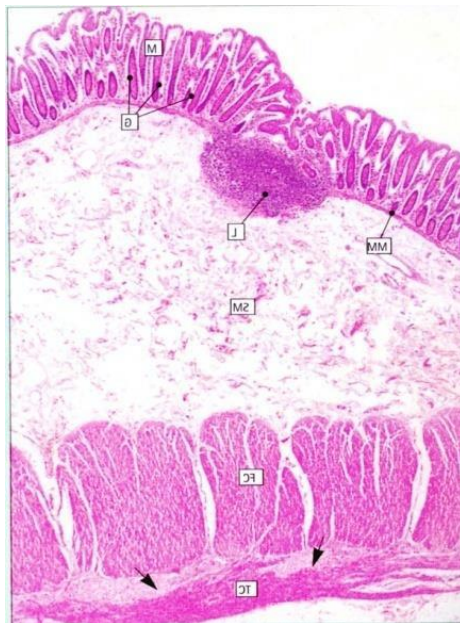


Figura 26: Istologia dell'intestino tenue. (<https://www.unife.it/>)

L'intestino crasso è lungo circa 2m e si estende dalla valvola ileo-cecale all'orifizio anale, ha il compito principale di assorbire acqua ed elettroliti, permette l'accumulo di sostanze non digerite e provvede alla loro evacuazione. Inoltre, provvede anche all'assorbimento di sostanze quali sodio e cloro e di alcune vitamine prodotte dalla flora come la vitamina K. È formato da:

- cieco
- colon
- retto e ano

(Magnelli, V. 2022).

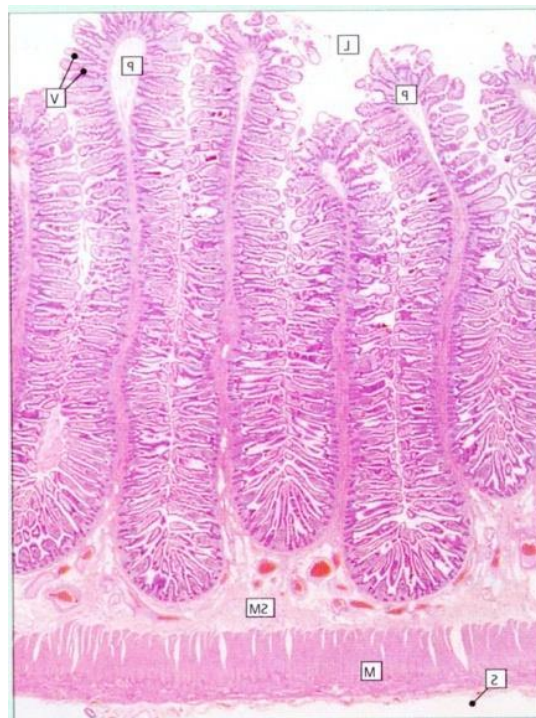


Figura 27: Istologia dell'intestino crasso. (<https://www.unife.it/>)

4.1.5 PANCREAS

Il pancreas è un organo al di fuori del peritoneo che contrae stretti rapporti con il fegato e con lo stomaco. È un organo impari alloggiato nella porzione sinistra della cavità addominale. È formato da quattro porzioni: testa, collo o istmo, corpo e coda. Al 98% ha una funzione di ghiandola di tipo esocrino, mentre per il 2% è un organo endocrino; soprattutto nella zona del corpo e della coda troviamo le isole del Langherans che costituiscono la porzione del pancreas endocrino. Troviamo anche delle cellule duttali vicino

ai dotti che producono la componente acquosa. Il pancreas poi sfocia nel duodeno dove riversa il succo pancreatico.

Il succo pancreatico è costituito da:

- componente enzimatica prodotta dalle cellule degli acini. Contiene tutti gli enzimi necessari alla digestione massiva dei macronutrienti.
- componente acquosa prodotta dalle cellule duttali. È caratterizzata da acqua, elettroliti e una notevole abbondanza di ione bicarbonato, il quale nel duodeno dovrà neutralizzare il chimo acido fuoriuscito dallo stomaco.

Il drenaggio dei vari acini avviene a carico di dotti di calibro via via crescente. Questi dotti confluiscono in un dotto principale (detto dotto pancreatico di Wirsung) che, appena prima di entrare nel duodeno si unisce al coledoco proveniente dalla cistifellea che trasporterà la bile. Il dotto comune entra nel duodeno attraverso lo sfintere di Oddi.

La componente del pancreas endocrino è altamente vascolarizzata; le isole sono caratterizzate da quattro tipi cellulari:

- cellule α . Si trovano nella periferia dell'isolotto e producono glucagone, un ormone a funzione iperglicemizzante. Rappresentano il 16% delle cellule dell'isolotto.
- cellule β . Rappresentano circa il 60% dell'isolotto e producono insulina, l'unico ormone a funzione ipoglicemizzante.
- cellule δ . Secernono somatostatina. Rappresentano il 9% dell'isolotto.
- cellule PP. Che producono un polipeptide pancreatico. Rappresentano il 14% dell'isolotto.

La condizione necessaria per far sì che il pancreas riversi prodotto nel duodeno è il fatto che ci sia materiale nel duodeno. Il pancreas, come lo stomaco, comincia a produrre la componente enzimatica già durante la fase cefalica, orale e gastrica. Il pancreas, essendo una ghiandola annessa al tratto digerente, non possiede un sistema nervoso enterico; è controllato dal sistema simpatico e dal sistema parasimpatico. Il nervo vago innerva solamente le cellule degli acini, quindi cominciano ad essere rilasciati gli zimogeni inattivi ma manca il drenaggio acquoso; per questo motivo, gli zimogeni vengono rilasciati ma non vengono drenati lungo il dotto. Per questa ragione, durante la fase cefalica-orale e durante la fase gastrica queste sostanze non irrompono nel duodeno; inoltre, lo sfintere di Oddi è

chiuso. Quando il materiale arriva nel duodeno si ha anche secrezione acquosa e lo sfintere di Oddi si apre; gli zimogeni quindi vengono portati nell'intestino.

Gli enzimi vengono prodotti nel succo pancreatico in due forme:

- enzimi attivi, come le lipasi e le amilasi.
- enzimi inattivi. Vengono secreti come proenzimi e vengono attivati nel duodeno; se venissero attivati nel pancreas si avrebbe una autodigestione dell'organo stesso. Si può andare incontro a pancreatite acuta con esito spesso fatale. Il pancreas però è protetto dall'attivazione di questi enzimi, infatti possiede delle anti-tripsine.

Il pancreas produce sotto forma inattiva un tripsinogeno, un chimotripsinogeno, una procarbossipeptidasi e una proelastasi. Questi enzimi inattivi poi vengono drenati lungo il dotto pancreatico ed entrano nel duodeno dove troviamo una enterochinasi presente sull'orletto a spazzola degli enterociti; questa attiva il tripsinogeno a tripsina.

La tripsina attivata a cascata procede all'attivazione di tutti gli altri: attiva il chimotripsinogeno a chimotripsina, la procarbossipeptidasi in carbossipeptidasi e la proelastasi in elastasi. Questa cascata prende il nome di cascata di Ohlsson.

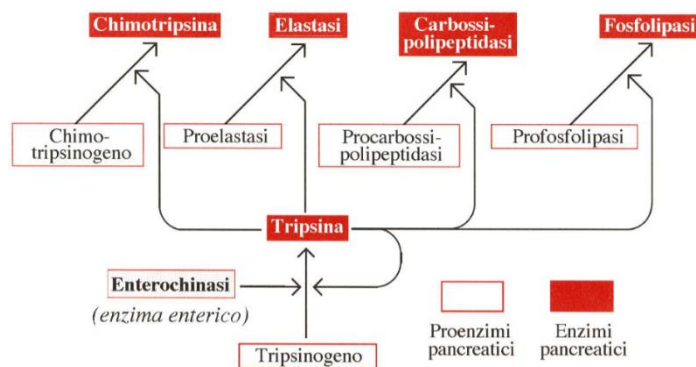


Figura 28: cascata di Ohlsson. (Magnelli, V. 2022)

Nel pancreas abbiamo una secrezione enzimatica e una secrezione duttale. Le cellule duttali sono cellule polarizzate con una porzione apicale e una porzione basolaterale. Sulla porzione basolaterale troviamo la Na^+/K^+ ATPasi che mantiene un gradiente del sodio atto a fare entrare sodio all'interno della cellula. In questo caso, il sodio ci serve per estrudere dalla cellula duttale i protoni. Vengono emessi protoni perché all'interno della cellula pancreatico viene promossa una reazione di idratazione della CO_2 grazie all'anidrasi carbonica con produzione di bicarbonato e protoni. I protoni non devono essere eliminati,

quindi vanno ad acidificare l'ambiente del sangue che è stato alcalinizzato dalla tonaca gastrica. Gli ioni bicarbonato, grazie ad uno scambio dei cloruri, passano nel lume duttale e vanno ad alcalinizzare la soluzione acquosa proveniente dal pancreas. Il cloro viene portato dentro nello scambio dei cloruri, ma poi dobbiamo riportarlo fuori: utilizziamo il canale CFTR, il target della fibrosi cistica. Il cloro che fuoriesce va a negativizzare il lume e va a creare un potenziale transepiteliale che richiama sodio per via transcellulare e per osmosi acqua. A questo punto, il liquido duttale è pronto per essere inviato a livello del duodeno.

Anche nel pancreas esistono fattori che regolano la produzione pancreatica; sono fattori che esulano dal sistema nervoso enterico che manca nel pancreas.

I fattori che regolano la produzione pancreatica sono:

- acetilcolina rilasciata dai terminali vagali. Viene rilasciata già durante la fase cefalica e la fase orale della digestione. Va ad agire sulla secrezione degli acini; comincia a stimolare l'esocitosi degli zimogeni da parte delle cellule degli acini. Questo processo continua anche in fase gastrica, ma si interrompe quando il materiale arriva nel duodeno.
- colecistochinina. Viene rilasciata in maniera massiva quando il materiale arriva nel duodeno; questo stimolo aumenta la produzione enzimatica.
- secretina. Viene prodotta quando il chimo acido arriva nel duodeno. E' l'unico ormone che, veicolato dal torrente ematico, arriva alle cellule duttali stimolando la secrezione acquosa.

Inoltre, il pancreas possiede due dotti, quello accessorio o di Santorini e quello di Wirsung che sboccano nel duodeno, rispettivamente nella papilla minore e in quella maggiore. Il dotto di Wirsung si unisce in un dotto comune con il coledoco, canale che trasporta la bile, per riversare il tutto nell'intestino. Questo ingresso di bile e succo pancreatico avviene solo nella fase digestiva ed è regolato dallo sfintere di Oddi. (Magnelli, V. 2022)

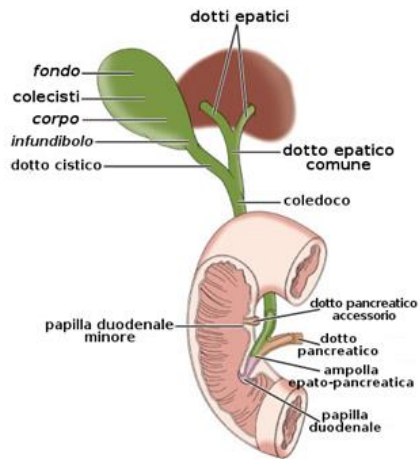


Figura 29: Anatomia del pancreas. (Magnelli, V. 2022)

4.1.6 FEGATO E COLECISTI

Il fegato è il secondo organo più grande del nostro organismo, dopo la cute. È circa il 5% del peso del soggetto. È dotato di elevata capacità replicativa ed è formato da quattro lobi (lobo destro, lobo sinistro, lobo quadrato, lobo caudato). Dal punto di vista digestivo, è importante perché produce la bile; il succo biliare ammonta a circa 1.2 L al giorno. In parte viene riversato nel duodeno, in parte viene conservato nella cistifellea.

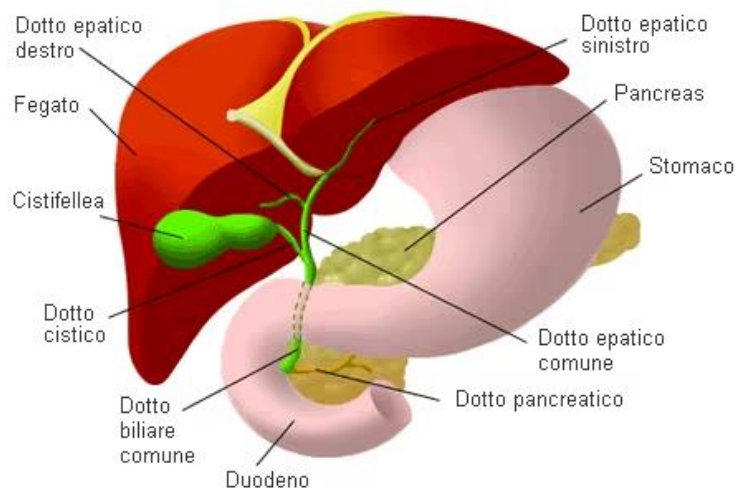


Figura 30: Anatomia del fegato e della cistifellea. (<https://www.my-personaltrainer.it/>)

Funzioni del fegato:

- Sintetizza proteine plasmatiche, corpi chetonici, lipidi. Tutte le proteine plasmatiche sono di origine epatica; sono volte al trasporto più o meno specifico di sostanze. La produzione di corpi chetonici avviene in fase di gluconeogenesi oppure quando l'organismo è in deperimento; i soggetti diabetici vanno facilmente incontro a chetoacidosi per elevata produzione di corpi chetonici. Il fegato produce anche trigliceridi e lipoproteine, quindi ha un ruolo importante nel metabolismo lipidico.
- Biotrasformazione di sostanze tossiche in composti reattivi. È un metabolismo fondamentale del fegato perché funziona come scavenger di tutte le sostanze endogene ed esogene che l'organismo deve smaltire, in particolare sostanze lipofile. Queste sostanze, infatti, entrano facilmente all'interno dell'organismo che però fa fatica ad eliminarle; il fegato ha lo scopo di renderle idrosolubili e così più facilmente eliminabili con le feci e con le urine.
- Ghiandola endocrina. Interviene in alcuni processi endocrini, come l'idrossilazione in posizione 1 dell'idrossicolecalciferolo, il quale poi viene anche idrossilato in posizione 25 a livello renale dando la forma attiva della vitamina D.
- Ghiandola esocrina. Produce bile destinata alla digestione dei grassi.
- Organo escretore. Elimina la bilirubina, una sostanza che deriva dal catabolismo dell'emoglobina. La parte proteica dell'emoglobina viene degradata da proteasi e si ricavano amminoacidi; il gruppo eme da un lato libera ferro che viene legato alla transferrina per distribuirlo nell'organismo, dall'altro lato dà origine alla bilirubina. La bilirubina è un pigmento giallognolo che deve essere eliminato. Viene metabolizzato a livello epatico dando come sottoprodotti biliverdina e stercobilina che vengono eliminati rispettivamente a livello renale e a livello intestinale.
- Filtro del sangue. Ripulisce il sangue refluo dall'apparato intestinale prima di rimetterlo nella circolazione sistemica; lo pulisce sia da microparticelle sia da possibili agenti patogeni.
- Immagazzina glicogeno, vitamine liposolubili (A, B, K ed E), ferro e rame. Le vitamine vengono immagazzinate nelle cellule di ito.

La bile che il fegato produce viene drenata dai canalicoli biliari e viene idratata dai colangiociti e poi finisce nel dotto epatico comune. Nel dotto epatico comune si inserisce il dotto cistico che drena la bile contenuta nella colecisti che funziona come riserva di bile. Il dotto epatico comune può immettere la bile direttamente nel duodeno se siamo in fase

digestiva; se, invece, siamo in fase interprandiale la bile viene immagazzinata nella cistifellea (30-40 ml). Per la produzione di queste sostanze, il fegato si avvale di un complicato sistema di trasportatori. I sali biliari vengono rilasciati dalla porzione apicale attraverso un ABC transporter (ATP Binding Cassette). La bile contiene sali biliari che vengono prodotti dall'epatocita. Questo produce i sali biliari primari provenienti dall'acido colico e dall'acido chenodesossicolico. I colati e i chenodesossicolati vengono coniugati con taurina o glicina per formare tauro o glico coniugati e poi vengono estrusi nei canalicoli biliari dove verranno uniti ad altre sostanze ed idratati per formare la bile finale. I sali biliari possono essere modificati dalla flora batterica intestinale, dando origine ai sali biliari secondari (litocolico e desossicolico); questi poi vengono riportati a livello epatico dal circolo portale. I sali biliari hanno come precursore il colesterolo. La bile può sfociare nel duodeno e così è pronta per essere utilizzata; contiene acqua, sali, sali biliari e altre sostanze che vanno nel complesso a formare la struttura micellare destinata alla digestione dei trigliceridi.

Se ci troviamo in fase inter-prandiale la bile viene riversata nella cistifellea, una sacchettina piccola dotata di una buona tonaca muscolare. La colecisti o cistifellea è un organo del sistema digerente deputato all'accumulo della bile durante il digiuno, riversandola nell'intestino tenue dopo i pasti. È un organo cavo in grado di accumulare circa 30-50 ml, ma può aumentare in condizioni patologiche. La cistifellea si trova in una fossetta chiamata fossetta cistica ed è suddivisa in fondo, corpo e collo; quest'ultimo tratto continua nel dotto cistico che si unisce al dotto epatico per costituire il coledoco.

Il fegato produce bile durante tutta la giornata, quindi per far sì che ci stia all'interno della colecisti viene concentrata e l'acqua viene eliminata. Se facciamo un confronto tra la bile epatica e la bile cistica vediamo che quella cistica è molto più concentrata. Quando questo processo di disidratazione e reidratazione della bile non funziona bene si possono sviluppare i calcoli alla cistifellea.

La funzione della bile da punto di vista digestivo è quella di emulsionare le grosse particelle di grasso. I grassi sono sostanze lipofile e arrivano nel duodeno sotto forma di grossi goccioloni che sarebbero difficilmente digeribili dalle lipasi. I sali biliari, grazie ai movimenti peristaltici, emulsionano la grossa goccia di grasso in piccole gocce. Queste microgoccioline poi vengono attaccate dalla lipasi pancreatica che scinde i trigliceridi in due acidi grassi e un 2-monogliceride. Questa reazione però è reversibile: gli acidi grassi tendono nuovamente

ad attaccarsi allo scheletro del glicerolo riformando i trigliceridi. Per evitare questo, bisogna sottrarre i prodotti derivanti dalla degradazione dei trigliceridi man mano che si staccano; i sali biliari, quindi, formano delle micelle che trasportano gli acidi grassi verso gli enterociti, i quali li assorbono. La micella poi ritorna a livello duodenale, recupera altri acidi grassi e li riporta agli enterociti; fa questo durante tutto il processo digestivo. (Magnelli, V. 2022)

4.2 LA RICERCA DI PATOLOGIE ASBESTO CORRELATE NEL TRATTO DIGERENTE

Le malattie legate all'amianto come i tumori maligni e l'asbestosi, rimangono una preoccupazione per la salute pubblica. Nonostante ciò, l'amianto è ancora ampiamente utilizzato in molti paesi in via di sviluppo. La mortalità dovuta alle malattie legate all'amianto è ancora troppo elevata. L'associazione tra amianto e tumori, come il cancro al polmone e il mesotelioma, è ben consolidata, ma l'esposizione alle fibre dell'asbesto è stata collegata anche a tumori correlati al tratto gastrointestinale come lo stomaco, il colon e l'esofago. La correlazione è stata esaminata da un comitato multidisciplinare nominato Institute of Medicine, Accademia Nazionale delle Scienze degli Stati Uniti.

La via di esposizione più probabile per il tratto gastrointestinale si trova nell'acqua potabile contaminata e nell'esposizione professionale. L'acqua potabile può venire contaminata dalle fibre a causa del suo passaggio attraverso condutture idriche contenenti amianto o tramite contaminazione naturale. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che le fibre di amianto inalate possono essere traslocate dal polmone ai tessuti extrapolmonari o ad altri organi come cervello, fegato e reni. (Kim, et al., 2013)

L'infiammazione cronica indotta dall'amianto può attivare diverse vie di segnalazione coinvolte nella sopravvivenza e nella proliferazione delle cellule, inclusa la via del fattore di crescita epidermico (EGFR). Inoltre, un'infiammazione prolungata può causare alterazioni nell'epigenetica cellulare e può indurre ipermetilazione. nel parenchima polmonare, ad esempio, l'attività fagocitaria prolungata, al fine di eliminare le fibre biopersistenti, induce anche il rilascio di RNS (specie reattive dell'azoto) e ROS da parte dei macrofagi attivati. È noto che RNS e ROS inducono la doppia rottura del filamento, promuovendo la trasformazione maligna della cellula, oltre ad attivare la perossidazione lipidica e le cascate di segnalazione della sopravvivenza e proliferazione cellulare. Il rilascio di ROS e RNS nei tessuti bersaglio recluta a sua volta altri macrofagi e cellule dell'infiammazione nei siti di deposizione delle fibre.

Diversi studi hanno dimostrato che fibre di crocidolite e crisotilo possono interagire direttamente con proteine ed istoni andando ad influenzare la struttura della cromatina. Possono, infine, compromettere le attività di uccisione dei linfociti CD8+ e cellule Natural Killer. Gli studi sono stati effettuati tramite sequenziamento per ricercare biomarcatori cellulari principalmente nelle vie biliari. Tuttavia, non esistono altri dati in letteratura su tessuti appartenenti all'apparato gastrointestinale. (Brandi, et al., 2020).

È stato scoperto che l'amianto ingerito può attaccare la mucosa gastrointestinale causando una riduzione della sintesi del DNA. È stata rilevata una maggiore sintesi del DNA nell'intestino tenue e nel colon di topi in seguito all'ingestione di crisotilo. Ulteriori studi hanno indicato cambiamenti nelle cellule che rivestono la mucosa dell'ileo, del retto e del colon, lungo i quali si è sviluppata una citotossicità indotta da minerali dopo un'ingestione periodica di 50 mg/giorno di amianto crisotilo.

Anche se negli studi sugli animali, non è stato ancora dimostrato che l'amianto ingerito causi il cancro, esistono prove sperimentali di un aumento delle rotture dei filamenti di DNA nelle cellule intestinali esposti ad amianto e le prove accumulate nell'uomo, implicano che tutte le forme di esposizione all'amianto sembrano aumentare il rischio di cancro allo stomaco e possibilmente di altri tumori gastrointestinali; rispetto al polmone, tuttavia, questi effetti appaiono molto meno robusti e non tutti gli studi dimostrano un'associazione positiva. (Kim, et al., 2013)

4.2.1 CANCRO DELLO STOMACO

La relazione tra amianto e cancro allo stomaco non è ben compresa a causa del numero limitato di casi. Il cancro allo stomaco è il quarto tumore al mondo più diffuso e si osserva prevalentemente nei maschi, con un rapporto di 2:1. Fino ad ora la patogenesi del tumore non è ancora stata completamente compresa; fattori genetici e ambientali sembrano essere fattori scatenanti lo sviluppo della patologia e un'esposizione professionale alle fibre di amianto è stata considerata come un possibile fattore di rischio.

Uno studio caso-controllo ha mostrato un rischio elevato di tumori gastrointestinali nei minatori che hanno avuto un'esposizione prolungata alla polvere delle miniere di carbone. I risultati dell'analisi sembrano aver osservato un rischio maggiore di contrarre il cancro dopo un periodo di 25 anni dall'esposizione. I meccanismi che portano allo sviluppo dello stato infiammatorio non sono ben chiari, potrebbero essere dovuti alla presenza persistente di

fibre di amianto nel tessuto dello stomaco. Nel 1987 Kogan ha eseguito con dei collaboratori un esperimento basato sul contatto continuo della parete dello stomaco con amianto nei ratti per comprendere il ruolo nell'eziologia del cancro. Gli studi hanno evidenziato che l'esposizione alle fibre aumenta il rischio di sviluppare la patologia ma dovrebbero essere condotti più studi a riguardo. (Peng, et al., 2015).

È necessario tenere in considerazione che risultati negativi sullo sviluppo del cancro allo stomaco causato dall'ingestione di amianto con cibo o acqua, non escludono una possibile correlazione. Quando le fibre vengono ingerite con il cibo, esse permangono a contatto con la parete dello stomaco per non più di due o tre ore. Pertanto, sono stati condotti studi attraverso l'utilizzo di capsule contenenti amianto, impiantate nello stomaco per mantenere il contatto continuo. La capsula viene perforata affinché continui a far uscire la sostanza cancerogena all'interno dell'organo. Sono stati utilizzati diverse varianti sull'utilizzo delle capsule, ad esempio sono state usate radiazioni ²³ o vari agenti cancerogeni nei topi.

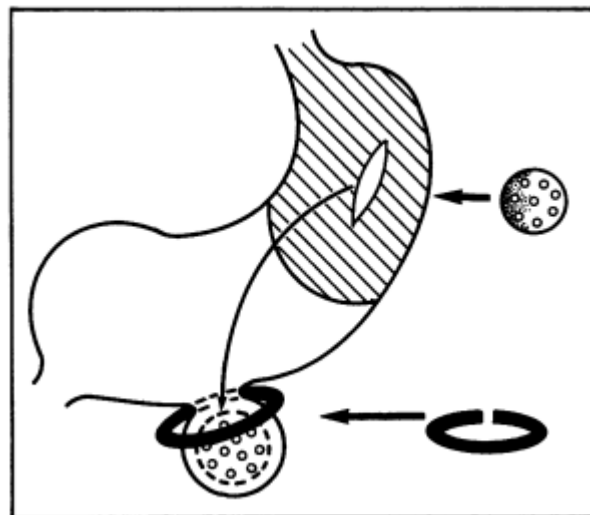


Figura 31: Inserzione di capsule contenenti sostanze cancerogene nello stomaco tramite chirurgia. (Kogan, et al., 1987).

Nella zona ghiandolare dello stomaco sono stati trovati tre tumori maligni, due adenocarcinomi e un carcinosarcoma (Figura a e b); uno dei ratti affetto da adenocarcinoma aveva delle metastasi al fegato. È stato evidenziato anche un caso di carcinoma con cellule squamose nel prestomaco (Figura c) e si sono sviluppati anche due mesoteliomi peritoneali in prossimità della zona principale dello stomaco. Oltre ai tumori allo stomaco e ai mesoteliomi, sono stati trovati altri tre tumori maligni nell'intestino tenue e due fibrosarcomi vicino alla capsula. (Figura e).

Quando si interpretano i dati ottenuti da tali esperimenti, è bene tener conto anche dei tumori che si generano spontaneamente nello stomaco in seguito alla chirurgia. Siamo ancora lontani dal trarre conclusioni pratiche, allo stesso tempo attraverso indagini epidemiologiche si può constatare che l'esposizione prolungata alle polveri contenenti amianto sono un fattore di rischio. (Kogan, et al., 1987).

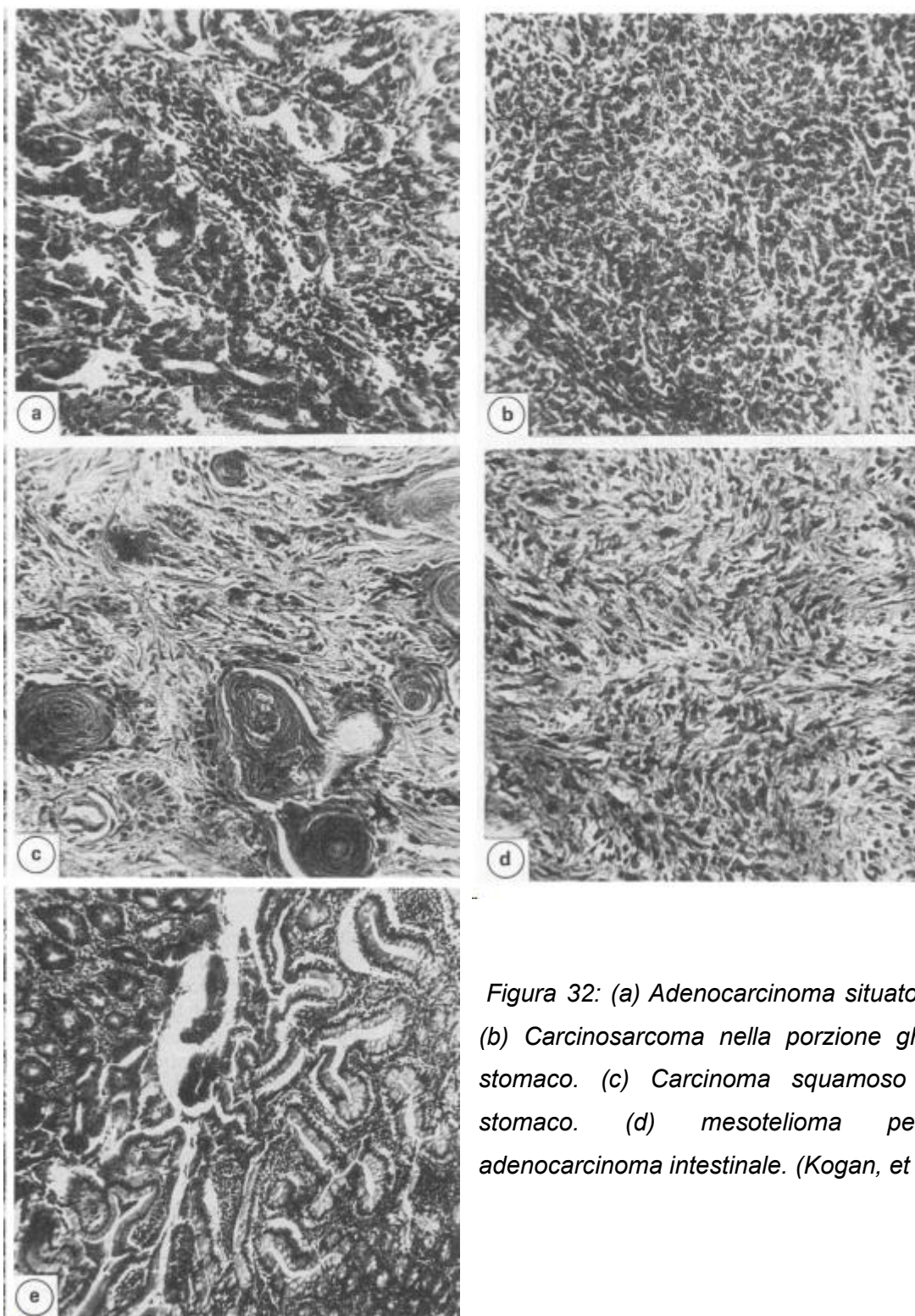


Figura 32: (a) Adenocarcinoma situato vicino alla clip. (b) Carcinosarcoma nella porzione ghiandolare dello stomaco. (c) Carcinoma squamoso cellulare dello stomaco. (d) mesotelioma peritoneale. (e) adenocarcinoma intestinale. (Kogan, et al., 1987).

4.2.2 CANCRO AL FEGATO

Il colangiocarcinoma (CC) comprende un gruppo eterogeneo di tumori che si sviluppano nell'albero biliare interno (ICC) ed esterno (ECC) del fegato. Negli ultimi decenni si è visto il progressivo aumento dei tumori ICC e diminuzione dei tumori ECC. Alcune condizioni patologiche come la steatoepatite non alcolica (NASH), la colangite sclerosante primitiva, epatoliti, cisti delle vie biliari, malattia di Caroli sono state riconosciute come fattori di rischio per l'ICC; tuttavia, il 50% dell'eziologia del tumore rimane sconosciuta e questo suggerisce che anche altri fattori di rischio possano essere coinvolti nello sviluppo della patologia; studi epidemiologici recenti hanno fornito prove sul legame fra amianto e ICC.

È stato condotto uno studio prospettico caso-controllo sull'associazione tra esposizione all'amianto e lo sviluppo del colangiocarcinoma nell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Bologna dove sono stati reclutati 168 casi CC e 185 controlli (pazienti ospedalizzati per malattie non neoplastiche). L'esposizione all'amianto era basata su categorie derivate dai questionari ReNaM (Registro Nazionale dei Mesoteliomi) e questo studio suggerisce che fra i fattori eziologici legati allo sviluppo delle ICC, l'amianto è uno dei maggiori responsabili. (Brandi, et al., 2020).

Un altro studio è stato condotto nella cittadina di Casale Monferrato, in provincia di Alessandria, dove si è osservata un'incidenza di tumore ai polmoni, asbestosi e mesotelioma pleurico molto più alta di quanto osservato nel resto d'Italia. Lo studio in questione si è soffermato sul tratto biliare e sulla cistifellea di pazienti affetti da disturbi benigni delle vie biliari o da malattie correlate all'amianto che vivono in aree inquinate. È stata utilizzata la tecnica della microscopia elettronica a scansione con sonda a dispersione di energia (VP-SEM/EDS); sono state evidenziate fibre di amianto direttamente su sezioni istologiche senza digestione chimica. Purtroppo, il numero di campioni per il CC è limitato, e per questo motivo viene spesso diagnosticato in fase avanzata e pochi sono i casi in cui si può intervenire chirurgicamente. Lo studio è stato condotto su 7 pazienti, per ciascun caso sono state preparate tre sezioni di tessuto con spessore di 5µm, inclusi poi, in blocchi di paraffina e successivamente colorati con la tecnica di Ematossilina-Eosina; tecnica eseguita presso l'Ospedale di Alessandria. In 5 dei 7 pazienti sono state riconosciute delle fasi fibrose ascrivibili all'amianto. Le fibre osservate si trovavano al confine tra il tessuto epatico sano e quello malato, tuttavia, questi risultati sono preliminari ma forniscono la prova che le fibre di amianto possono raggiungere il fegato. (Grosso, et al., 2019).

Sulla base dei risultati sono state condotte analisi di sequenziamento di nuova generazione in pazienti esposti e non esposti all'amianto al fine di identificare i biomarcatori molecolari. In particolare, si evince che i pazienti esposti hanno un profilo in linea con i pazienti affetti da mesotelioma, al contrario dei non esposti, suggerendo che l'amianto potrebbe indurre tipiche alterazioni molecolari nelle cellule bersaglio.

Il prerequisito per il ruolo dell'amianto nella cancerogenesi del colangiocarcinoma interno è dovuto alla presenza di fibre di amianto nell'albero biliare. Inoltre, sono stati analizzati, dopo asportazione chirurgica, dei calcoli alla cistifellea di cinque pazienti residenti a Casale Monferrato, tre dei quali presentavano fibre riconducibili all'amianto. Questo risultato conferma l'ipotesi che le fibre hanno bisogno di molto tempo per traslocare negli organi extra-polmonari. In altri sette pazienti della medesima città affetti da ICC sono state trovate delle fibre di crisotilo. L'incorporazione delle fibre è avvenuta al confine fra il tessuto epatico sano e quello neoplastico. Nel fegato è stato rilevato il crisotilo mentre nella colecisti anche crocidolite.

Le fibre di amianto possono essere introdotte per inalazione o ingestione; pertanto, si è sviluppata un'ipotesi sul meccanismo di traslocazione nei tessuti extra-polmonari. Infatti, nel percorso inspiratorio le fibre, una volta inalate, rimangono parallele al flusso d'aria delle vie aeree superiori e raggiungono gli alveoli polmonari. Qui possono essere drenate dai flussi dei vasi linfatici che agiscono come una pompa. La rimozione delle fibre dagli alveoli attraverso il sistema linfatico è un fenomeno estremamente lento, motivo per il quale alcune particelle vengono intrappolate nei linfonodi che diventano un serbatoio di materiale di scarto. Successivamente attraverso i vasi linfatici possono raggiungere tutti gli organi, compreso fegato e vie biliari attraverso l'arteria epatica. Per quanto riguarda la via di ingestione si pensa che le fibre possano attraversare la mucosa intestinale e infine essere trasportate al fegato tramite la circolazione della vena porta.

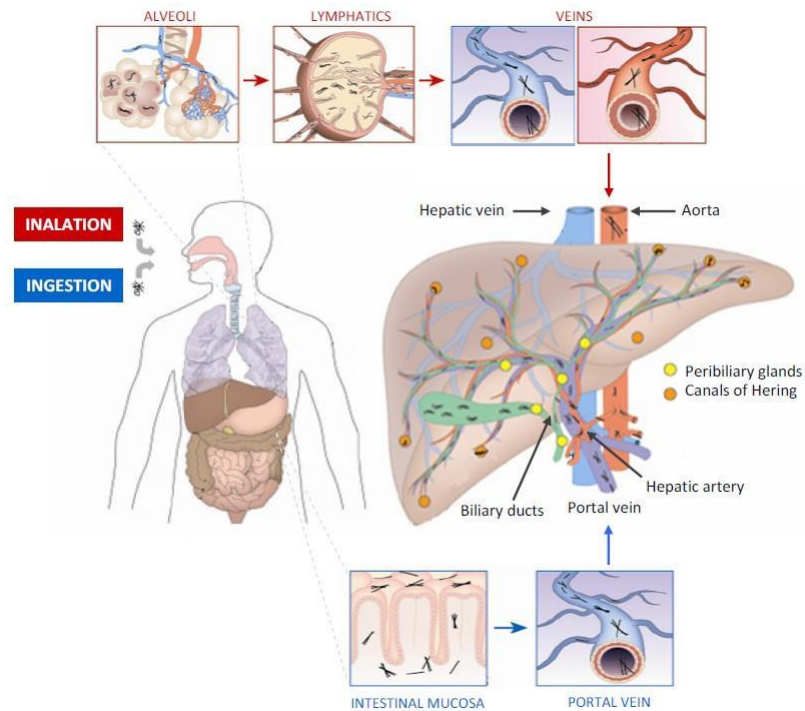


Figura 33: Vie di contagio delle fibre di amianto. (Brandi, et al., 2020).

Inoltre, nel fegato c'è un'alta permeabilità microvascolare dovuta ai sinusoidi epatici che possono permettere l'entrata e la deposizione delle fibre; sono anche presenti le cellule del Kupfer, macrofagi epatici deputati a ripulire il sangue dalle sostanze di scarto, che possono esercitare un ruolo simile ai macrofagi alveolari, attori chiave dello sviluppo della cancerogenesi. Nel parenchima epatico le fibre possono rimanere intrappolate nei dotti biliari più piccoli, come nel canale di Hering, inducendo la trasformazione maligna di HpSC (cellule progenitrici epatiche). Questa mutazione cellulare potrebbe spiegare recenti studi epidemiologici che correlano l'amianto allo sviluppo delle ICC, piuttosto che dell'ECC.

Nel parenchima epatico, sottile e le fibre lunghe di amianto potrebbero rimanere intrappolate nei dotti biliari più piccoli, in particolare a livello delle vie biliari canali di Hering, inducendo così la trasformazione maligna di HpSC (Figura 33). In questo scenario, inoltre, si pensa che l'amianto potrebbe essere il responsabile dello sviluppo di altri tumori primitivi del fegato, come ad esempio il carcinoma epatocellulare (HCC) e HCC-ICC combinato; resta però quest'ultima ipotesi da confermare.

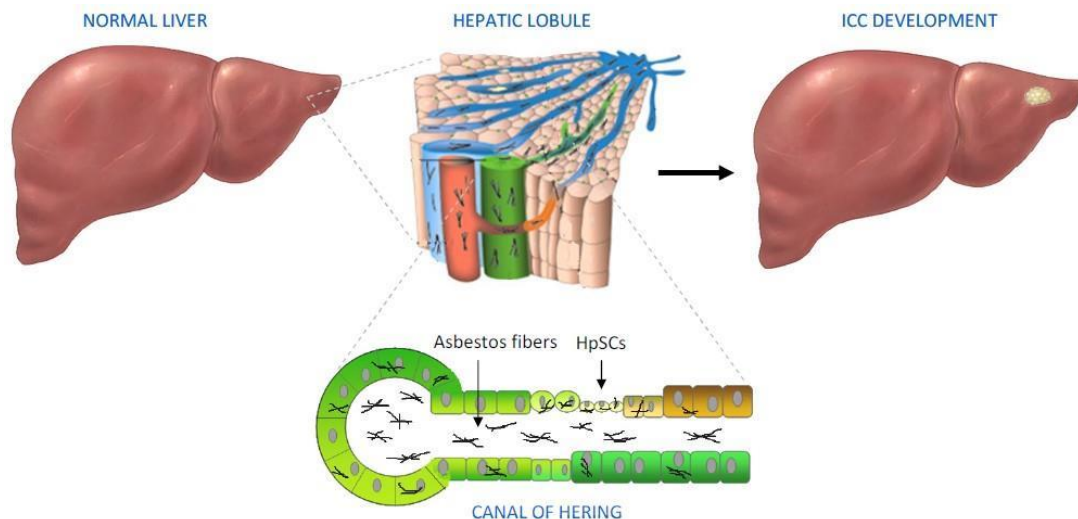


Figura 34: Sviluppo epatogenesi asbesto correlata nel fegato. (Brandi, et al., 2020).

Nonostante i vari studi, questa patologia rimane un grave problema mondiale e l'identificazione di marcatori molecolari potrebbero migliorare il monitoraggio di soggetti esposti ad alto rischio e consentirebbero lo sviluppo di percorsi personalizzati per la diagnosi ed il trattamento del tumore. (Brandi, et al., 2020).

4.2.3 CANCRO AL PANCREAS

Il tumore al pancreas rappresenta il 5,2% di tutte le morti per cancro. L'eziologia del cancro del pancreas esocrino (EPC) rimane in gran parte sconosciuta. L'unico fattore di rischio ad oggi correlato è il fumo, ma spiega solo la metà dei casi; altri fattori di rischio sono l'età, il diabete, la pancreatite cronica e l'obesità. (Miguel, et al., 2010)

Nel 1967 sono stati condotti studi in Canada su 17.800 uomini. All'inizio dello studio la maggior parte degli uomini (10.101 su 17.800) avevano meno di 40 anni ed erano stati esposti all'amianto da meno di 20 anni. Nel 1976 sono stati registrati 2271 decessi su 1658 che erano previsti e questo dato ha aperto uno spiraglio sull'indagine riguardante la correlazione tra amianto e cancro al pancreas. (Selikoff & Seidman, 1981).

Nell'agosto del 1977, ci fu un elevato numero di mortalità nella città di Duluth, in Minnesota, per cancro all'esofago, stomaco e retto nei maschi e tumori del retto e del pancreas nelle donne. Per questo motivo tra il 1978 e il 1982 furono avviate indagini sul tasso di mortalità e operazioni per estrarre l'amianto e si scoprì che le reti idriche del comune erano contaminate da crisotilo in peridotite serpentizzata; una roccia ultrafemica metamorfosata

appartenente alla famiglia delle peridotiti rocce nelle quali quasi tutti i minerali componenti (olivina, pirosseno e a volte gli anfiboli) si sono trasformati in serpentino. Ma il presente studio non supportò un'associazione tra il cancro al pancreas e l'esposizione delle fibre di amianto nell'acqua potabile. (Wigle & Donald, 1977).

Ad oggi è stato correlato ad un aumentato rischio di insorgenza della patologia l'esposizione professionale, come l'esposizione a solventi idrocarburi clorurati, cromo, nichel, silice, insetticidi e altri agenti specifici quali amianto e radiazioni ionizzanti.

È stato riscontrato un aumento del rischio di EPC negli uomini con qualifiche professionali come minatori, operai edili e meccanici e nelle donne impiegate d'ufficio. Per quanto riguarda l'esposizione professionale ad agenti specifici, sono stati condotti studi dose-risposta per i solventi idrocarburi clorurati e l'amianto e la maggior parte delle associazioni sono aumentate quando le analisi sono state limitate agli adenocarcinomi delle cellule duttali confermati istologicamente. (Miguel, et al., 2010)

4.2.4 CANCRO DEL COLON

Il cancro del colon è il secondo tumore più letale e il terzo tumore maligno più diffuso nel mondo. Nonostante ci siano stati notevoli progressi nel trattamento del cancro, che hanno permesso di migliorare la sopravvivenza e la qualità della vita, i decessi sono in continuo aumento. (Nelson et al, 2020).

Gli individui che presentano un alto rischio di sviluppo della patologia sono i pazienti affetti da sindromi familiari, come la poliposi adenomatosa familiare (FAP) e il cancro colon-rettale ereditario non associato a poliposi (HNPCC) e i pazienti con colite ulcerosa. Inizialmente il tumore non manifesta sintomi e si presenta come una crescita anomala delle pareti interne. La sequenza adenoma-carcinoma è universalmente conosciuta come fondamento istologico dello sviluppo della maggior parte dei cancri al colon e la presenza di un polipo adenomatoso nel colon è associata ad un aumentato rischio di insorgenza di una possibile neoplasia. (Di Bona et al, 2003).

L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha rilevato un'associazione positiva tra l'esposizione all'amianto e lo sviluppo del cancro al colon-retto, ma i diversi gruppi di lavoro erano equamente divisi sulla questione se le prove fossero abbastanza forti da giustificare la classificazione come "sufficiente". Pertanto, sono stati condotti studi su 1642 decessi per cancro al colon dagli anni '90 fino al 2018. Diciannove studi coinvolgevano

sia uomini che donne mentre tre studi hanno coinvolto rispettivamente solo maschi o solo femmine. Dieci sono stati condotti nell'industria tessile, otto in quella mineraria, otto in cemento-amianto, quattro in isolanti e due nella costruzione navale. Altri studi riguardavano lavoratori in fabbriche di amianto, officine ferroviarie, petrolio e lavorazione dei metalli.

I risultati di tali studi hanno evidenziato un aumentato rischio di cancro al colon tra i lavoratori esposti all'amianto con una stima di rischio complessiva pari a 1,16 (IC al 95%: da 1,05 a 1,29). (Kwak et al, 2019).

Molte prove supportano l'associazione singola con l'amianto o in sinergia con altri fattori come radiazioni e fumo allo sviluppo del cancro al colon. Tuttavia, gli aspetti riguardanti il tempo di esposizione, la tipologia di contagio, la concentrazione delle fibre e i tumori in siti extra polmonari non sono ancora ben chiari. I meccanismi noti nella cancerogenesi sono l'infiammazione cronica e la perdita di meccanismi di soppressione del tumore come la perdita della proteina 3p21, associata a BRCA1 e BAP1, e la proteina 9p21, inibitore delle chinasi ciclina dipendenti A2 e CDKN2A. BAP1 è un enzima localizzato nel nucleo, coinvolto in processi come la regolazione e proliferazione cellulare e nella riparazione del danno al DNA, mentre CDKN2A è un gene soppressore del tumore che impedisce la proliferazione incontrollata inducendo apoptosi.

Sono stati condotti diversi studi sui meccanismi della cancerogenesi in pazienti affetti da adenocarcinomi ma non sono state trovate fibre di amianto nelle sezioni istologiche del tessuto; sono state identificate, invece, nel liquido cellulare ascitico dei pazienti. (Serio et al., 2022).

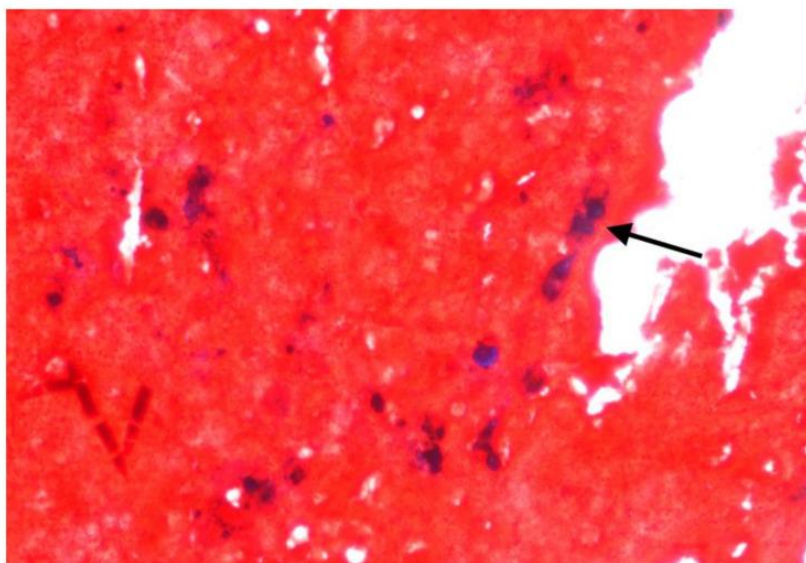


Figura 35: Citoblocco del liquido ascitico del paziente 1. Un corpo di amianto è chiaramente visibile (freccia) (colorazione con blu di Prussia di Perls, ingrandimento originale ×400). (Serio et al., 2022).

La diagnosi precoce costituisce la premessa per un trattamento chirurgico radicale e per il miglioramento della prognosi. Numerose società scientifiche come l'American College of Gastroenterology raccomandano uno screening per il cancro al colon per i soggetti a medio rischio, mentre, per i soggetti ad alto rischio con una storia familiare o personale di cancro al colon, vi è una raccomandazione di screening più frequente, mediante colonscopia. (Di Bona et al., 2003).

5 PREVENZIONE E PROSPETTIVE FUTURE

A distanza di più di 20 anni dal decreto Legge 257/1992, il problema dell'amianto non è ancora stato risolto, nonostante sia stato bonificato 1/5 dell'amianto presente, il problema rimane nell'utilizzo, in quanto la legge ne vietava solo l'impiego ma non pone una scadenza temporale sulla eliminazione di quello già presente nelle abitazioni e nei luoghi pubblici e privati, lasciando libertà ai singoli proprietari di scegliere se rimuovere o meno i materiali in uso. Dal punto di vista della sanità pubblica c'è uno spiccato interesse nel prevenire l'insorgenza delle patologie asbesto correlate al fine di instaurare adeguate misure di prevenzione e di contenimento dell'esposizione all'amianto. Negli Stati Uniti e in Svezia dove i consumi di amianto sono diminuiti si assiste anche a una diminuzione di mortalità.

La prevenzione primaria e secondaria del mesotelioma e delle patologie asbesto-correlate è un problema rilevante in Italia a causa del grande utilizzo passato dell'amianto, dalla lunga

latenza della malattia e dalla presenza di materiale non ancora smaltito, soprattutto presente nei luoghi di lavoro e negli ambienti di vita.

Per la prevenzione primaria sono state emanate normative atte a limitare l'inquinamento da amianto e l'esposizione nell'ambiente di vita, tuttavia, rimane un rischio per la salute per la diffusa presenza di materiali contenenti amianto, ad oggi rimangono ancora 32 milioni di tonnellate da bonificare. Si può attuare una prevenzione primaria anche tramite l'informazione e la formazione individuale dei lavoratori esposti e della popolazione generale. Per la prevenzione secondaria, invece, l'unico metodo al momento valido a livello di popolazione è tramite una campagna di screening con TC spirale annuale negli esposti ad amianto e fumatori per il mesotelioma e il tumore al polmone. (Ministero della Salute 2012).

- Creazione di liste di ex-esposti ricavandole da banche dati esistenti (INAIL, INPS)
- Creazione di una rete di laboratori analisi fibre in liquidi e tessuti biologici
- Iscrizione nel registro ex-esposti su richiesta individuale
- Definizione di almeno 3 categorie di rischio per esposti (alto, intermedio, basso)
- Monitoraggio dell'incidenza delle patologie asbesto-correlate
- Attivazione di procedure di prevenzione primaria
- Disassuefazione al fumo e miglioramento dello stile di vita degli esposti
- Monitoraggio di eventuali campagne di screening, laddove indicate
- Coinvolgimento e formazione dei medici di medicina generale nella gestione degli esposti
- Supporto psicologico per gli ex-esposti, loro familiari e pazienti con patologie correlate
- Sviluppo di progetti di ricerca clinica e di base supportati da organi istituzionali
- Identificazione di Centri di eccellenza per il trattamento e la gestione delle patologie correlate
- Revisione dei criteri per la definizione del fondo per le vittime

Tabella 5: Proposte operative per la lotta all'amianto in Italia. (Ministero della Salute 2012).

6 MATERIALI E METODI

Nel seguente capitolo verranno elencate le diverse pratiche di laboratorio utilizzate per le analisi di laboratorio. L'oggetto dello studio è stato individuare fibre di amianto o di altri inquinanti ambientali in campioni di tessuto sano, ponte e malato in soggetti operati per tumore allo stomaco e al colon residenti a Casale Monferrato. Le diverse analisi sono state eseguite dopo digestione chimica o direttamente sulla sezione istologica tramite:

- Microscopia ottica; per individuare in prima battuta la presenza di materiale inorganico;
- Microscopia elettronica a scansione (SEM); per andare ad indagare a livello morfologico e chimico.

6.1 PREPARAZIONE CAMPIONI PER IL MICROSCOPIO OTTICO

Le sezioni istologiche utilizzate per la preparazione dei campioni sono state fornite dall'ospedale S. Spirito di Casale Monferrato (AL) in blocchi di inclusione in paraffina.

6.1.2 I MATERIALI

I materiali impiegati per la preparazione dei vetrini sono stati:

- Attrezzatura da taglio (bisturi, lamette, forbici chirurgiche);
- Pinzette;
- Pennellini;
- Microtomo;
- Biocassette da inclusione;
- Contenitori in plastica con tappo a vite;
- Acqua MilliQ deionizzata;
- Etanolo in diverse concentrazioni (70%,95%,100%);
- Ematossilina di Mayer;
- Eosina;
- BioClear.



Figura 36: A sinistra contenitori con bioClear, Etanolo a diverse concentrazioni e acqua; a destra contenitori per colorazione con Ematossilina, acqua e Eosina.

6.1.3 I METODI PER L'ALLESTIMENTO DEL CAMPIONE



L'eccesso di paraffina viene eliminato attraverso l'utilizzo di lamette o bisturi, si colloca poi, la biocassetta nell'apposito supporto del microtomo e con esso si tagliano delle sezioni spesse circa 5 μm .

Figura 37: Microtomo con campione incluso in paraffina situato nell'apposito supporto.



Successivamente, con l'ausilio di un pennellino, si sollevano le sezioni tagliate e vengono posizionate su un vetrino, sul quale era stata depositata precedentemente dell'acqua MilliQ a temperatura ambiente. I vetrini vengono, poi, riscaldati su una piastra apposita a 40-45 °C e l'eccesso di acqua viene eliminato mediante l'utilizzo di carta assorbente.

Figura 38: Vetrini su piastra riscaldante.

Una volta asciutti, i vetrini, sono stati colorati con la tecnica Ematossilina-Eosina (E-E). La colorazione E-E è la più comune colorazione istologica, utilizzata prevalentemente nel campo della microscopia ottica. Questa colorazione permette di osservare morfologicamente organi e tessuti. Inoltre, è una colorazione utilizzata anche per gli esami istopatologici di routine perché permette di identificare le alterazioni patologiche. La colorazione E-E è definita bicromica, per la combinazione dei due coloranti: l'Ematossilina è un colorante basico, che colora in blu-viola gli acidi nucleici (componenti cariche negativamente), mentre l'Eosina, è un colorante acido che colora in rosso-viola le proteine cellulari, il citoplasma (componenti cariche positivamente). (<https://www.microbiologiaitalia.it/>).

La colorazione avviene secondo un protocollo di laboratorio standardizzato:

- 1) Eliminazione della paraffina in hellendhal, immergendo il campione 2 volte per 30s nel BioClear;
- 2) Reidratazione in etanolo a concentrazioni decrescenti:
 - 100%
 - 95%
 - 70%
- 3) Immersione in acqua corrente;

4) Colorazione:

- Ematossilina di Mayer filtrato per 20 min;
- Lavaggio in acqua corrente;
- Eosina per 4 minuti;
- Disidratazione in etanolo a concentrazioni crescenti:
 - i. 70% per 5 min;
 - ii. 95% per 5 min;
 - iii. 100% per 5 min;
- Chiarificazione in Bioclear 3 volte per 30s;
- Montaggio con Eukitt e vetrino copri oggetto.

Le sezioni bianche, dopo il taglio, vengono direttamente montate sul vetrino o su un tondino di plastica per l'analisi in spettroscopia micro-Raman e SEM/EDS.

6.2 MICROSCOPIO OTTICO

La prima forma di microscopia ottica risale al 1590, quando Zacharia Janssen e suo figlio costruirono un sistema di ingrandimento dotato solo di due lenti. Sperimentando l'utilizzo di diverse lenti inserite in un tubo videro che gli oggetti apparivano ingranditi. Nel 1609, Galileo, migliorò il sistema precedentemente costruito aggiungendo un dispositivo di focalizzazione. Il vero padre del microscopio, però, venne considerato Anton van Leeuwenhoek, che migliorò il sistema di lenti fino ad un ingrandimento di 270 diametri. Negli anni successivi, Robert Hooke, riconfermò le scoperte di van Leuwenhoek, e utilizzando il sistema microscopico per osservare degli organismi in una goccia d'acqua e perfezionandolo aggiungendo sistemi integranti.

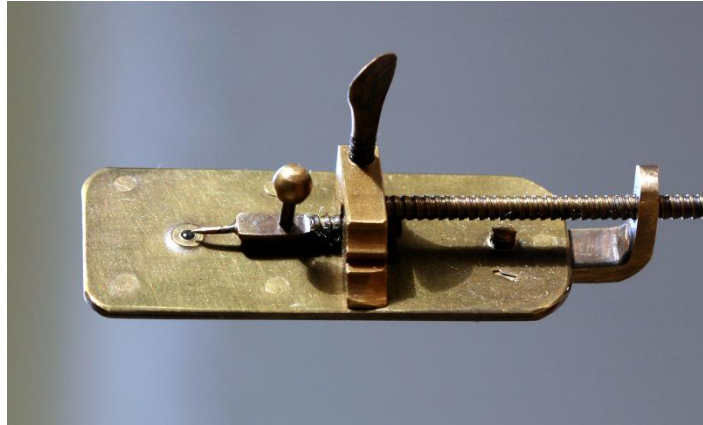


Figura 39: Sistema di lenti costruita da van Leuwenhoek. (Barboni, 2014).

6.2.1 MICROSCOPIO OTTICO A LUCE TRASMESSA

Ad oggi, il microscopio ottico è costituito da due sistemi di lenti inserite nel tubo porta lenti. La lente a cui appoggiamo l'occhio è chiamata oculare mentre la lente posizionata vicino al campione, in fondo al tubo, è l'obbiettivo; i microscopi sono dotati inoltre di tre obbiettivi a diversi ingrandimenti avvitato in un piattello girevole. Oculare, tubo e obbiettivo formano il sistema ottico del microscopio. Il potere d'ingrandimento si ottiene moltiplicando l'obbiettivo per l'oculare; ad esempio, se abbiamo un obbiettivo 40x, l'oggetto apparirà ingrandito di 40 volte, aggiungendo un oculare 10x, il prodotto finale sarà un potere d'ingrandimento di 400x. Possiamo ingrandire l'immagine fino a rendere visibili due punti che distano tra loro 0,3 micron, due punti a distanza inferiore non possono essere distinti, perché la luce visibile non lo consente. Per particolari ancora più piccoli si ricorre al microscopio elettronico, nel quale la luce viene sostituita da elettroni, che dopo aver attraversato il campione vengono visualizzati su uno schermo.

Oltre al sistema ottico, il microscopio possiede anche un sistema di illuminazione che può essere costituito anche solo da uno specchio, posto sotto il campione da osservare. Lo specchio riflette sull'oggetto la luce della lampada. Questo sistema di illuminazione può anche comprendere un condensatore, che concentra la luce sull'oggetto, e un diaframma, che regola la quantità di luce riflessa. Il campione, poi, viene attraversato dalla luce e la sua immagine viene ingrandita e vista dal sistema ottico.

Per un'ottima visione, è necessario che il campione sia stato tagliato precedentemente in sezioni molto sottili, grazie all'ausilio del microtomo e se necessario, si possono effettuare anche delle colorazioni. Il campione viene posto, poi, su un vetrino e coperto da un vetrino

copri-oggetti. Il fissaggio, invece, viene fatto se il campione deve essere conservato a lungo. Il vetrino così pronto può essere appoggiato sul tavolino porta oggetti, che ha un foro che permette il passaggio della luce proveniente dallo specchio, che illumina il campione dal basso verso l'alto.

La struttura di sostegno del microscopio comprende:

- Base d'appoggio;
- Tavolino porta oggetti;
- Supporto su cui è collegato il tubo porta lenti.

Sul supporto sono presenti:

- Vite macrometrica; permette di mettere a fuoco il campione, allontanando o avvicinando il tubo porta lenti al vetrino;
- Vite micrometrica; permette di migliorare la messa a fuoco.

(Barbone, 2010)

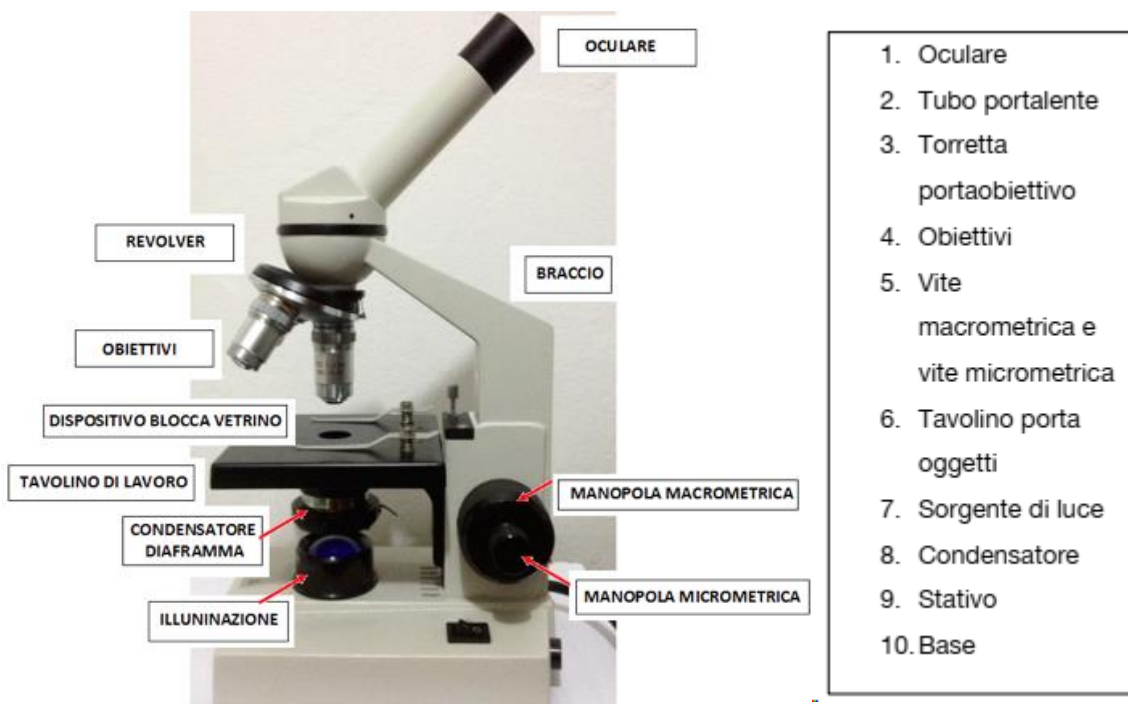
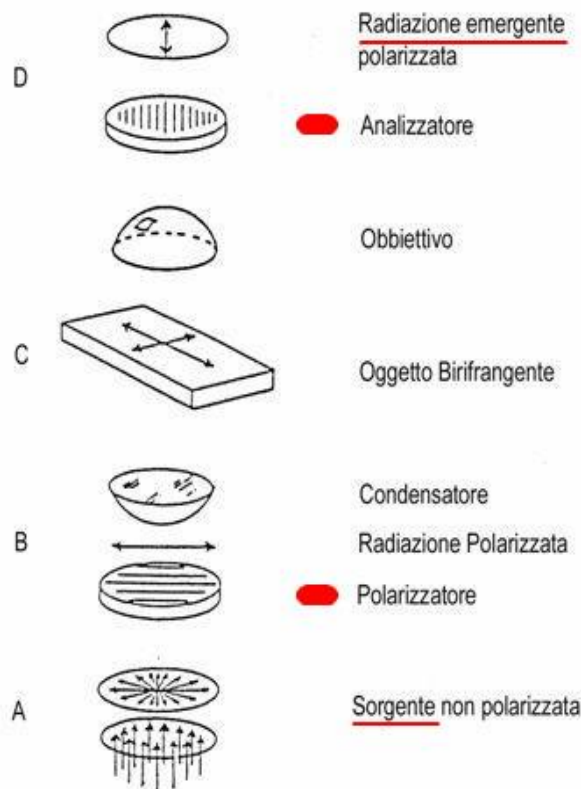


Figura 40: Struttura microscopio ottico. (<https://mazzavillani.blogspot.com>)

6.2.2 MICROSCOPIO OTTICO A LUCE POLARIZZATA

Quella che noi comunemente chiamiamo “luce”, è una radiazione ottica composta da onde; un’onda è una variazione periodica di un campo elettrico e di uno magnetico. Ogni singola onda ha un periodo limitato, costante, ed è data da un insieme di fotoni. Nella luce i vari fotoni oscillano in piani orientati a caso e pertanto la luce non è polarizzata.

Un polarizzatore è un filtro che permette di selezionare determinati fotoni che oscillano solo su un determinato piano, rendendo così la luce polarizzata. Per ottenere un microscopio polarizzatore, si unisce l’insieme di un polariscopio e un microscopio; il polariscopio è un sistema di due filtri polarizzanti, in mezzo ai quali si può inserire un oggetto e lo si può illuminare per trasparenza.



“Il “polarizzatore” in senso stretto trasforma un fascio di radiazione “naturale”, non polarizzata (A), in un fascio polarizzato (B). L’analizzatore (D) invece rivela lo stato di polarizzazione del fascio che incide su di esso, fascio che può essere stato modificato da un “oggetto” trasparente interposto (C). Le frecce verticali in A (primo schema in basso) indicano la direzione del fascio incidente “naturale”. Tutte le altre frecce indicano la direzione dei vettori elettrici, cioè dei piani di vibrazione delle onde presenti nelle varie sezioni del sistema. “
<https://www.funsci.it>.”

Figura 41: Struttura interna del microscopio ottico a luce polarizzata. (<https://www.funsci.it>).

In questo tipo di strumento si inserisce un polarizzatore (Nicol) sotto il condensatore, e un analizzatore sopra l’obiettivo, creando una direzione di oscillazione perpendicolare a quella del primo, in modo tale che i fotoni che arrivano dal Nicol sono estinti dal secondo. Questo viene chiamato “posizione di estinzione”, dove si ha un fondo nero dato dai Nicol incrociati.

Molti oggetti naturali, come le rocce, sono birifrangenti, questo significa che, se il fascio di luce colpisce l'oggetto birifrangente, si divide in due fasci che oscillano in piani perpendicolari fra loro, ma, se poniamo l'oggetto fra i due Nicol incrociati, non si ha più estinzione e i raggi colpiscono l'analizzatore e in parte lo attraversano, così facendo vibrano sullo stesso piano e possono interferire fra loro. Questa interferenza genera alla fine, dei colori, chiamati "colori d'interferenza", dando la possibilità di risalire a determinate proprietà ottiche dell'oggetto. (<https://www.funsci.it>).

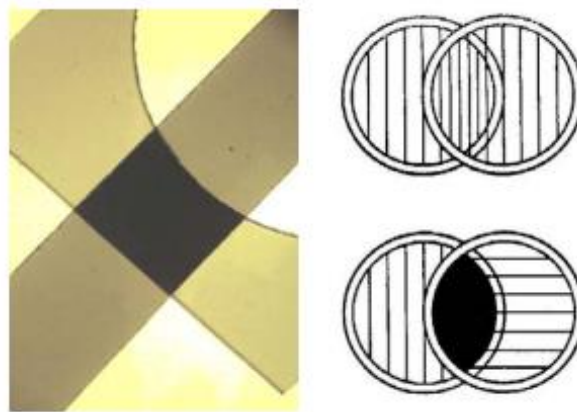


Figura 42: Colori generati dall'interferenza con Nicol incrociati. (<https://www.funsci.it>).

Il microscopio ottico a luce polarizzata è principalmente utilizzato nelle analisi mineralogiche per osservarne le caratteristiche strutturali. I campioni vengono preparati in sezioni sottili, come visto nel capitolo precedente.

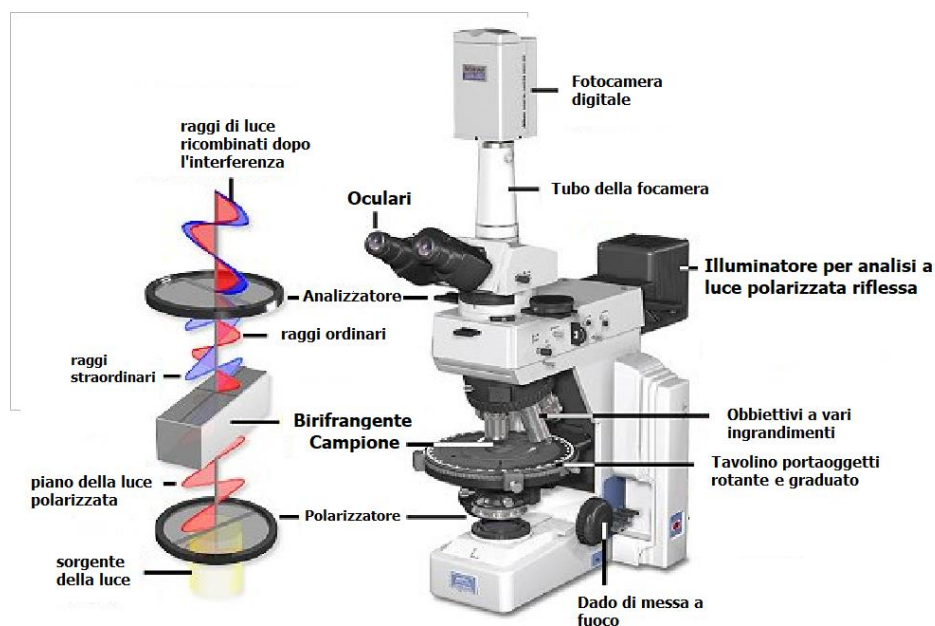


Figura 43: Struttura del microscopio ottico a luce polarizzata. (<https://manualedelgeologo.it>).

6.3 DIGESTIONE CHIMICA DEI TESSUTI

Per analizzare le sostanze inorganiche tramite il microscopio elettronico a scansione è necessario applicare la tecnica della digestione chimica. Il campione arriva dall'Azienda Ospedaliera di Casale, in una provetta contenente paraffina liquida.

6.3.1 I MATERIALI

I materiali impiegati per la digestione chimica sono:

- Bilancia tecnica;
- Lamette e bisturi;
- NaClO;
- Piastra riscaldata;
- Filtri in policarbonato;
- Acqua MilliQ;
- Pinzette;
- Pin stub;
- Porta campioni;
- Bacher;
- Provette falcon;
- Cilindro graduato;
- Matraccio.

6.3.2 METODI PER LA DIGESTIONE CHIMICA E PER L'ALLESTIMENTO DEL CAMPIONE

Dopo l'estrazione del campione, grazie all'ausilio di pinzette, dalla provetta contenente paraffina liquida, si esegue il seguente protocollo:

- Si pesa la sezione con una bilancia tecnica e si riporta il dato su un quaderno di laboratorio insieme al suo codice identificativo;
- Si prepara una provetta Falcon, riportando anche su di essa il codice identificativo del campione;
- Si preleva circa 0,5 g di tessuto, e si fa una seconda misurazione della sezione sulla bilancia tecnica lavorando con un errore di $d = 1 \times 10^{-2}$ g;
- Si sminuzza la sezione con lamette o bisturi;

- Si inserisce l'omogeneizzato nella Falcon preparata precedentemente insieme a 30 ml di NaClO per far avvenire la digestione;
- Si inserisce la provetta all'interno di un Becher contenente acqua e si posiziona il tutto su una piastra riscaldante a circa 60 °C.

Per questa procedura è necessario aspettare almeno 72 ore prima di passare alla filtrazione.

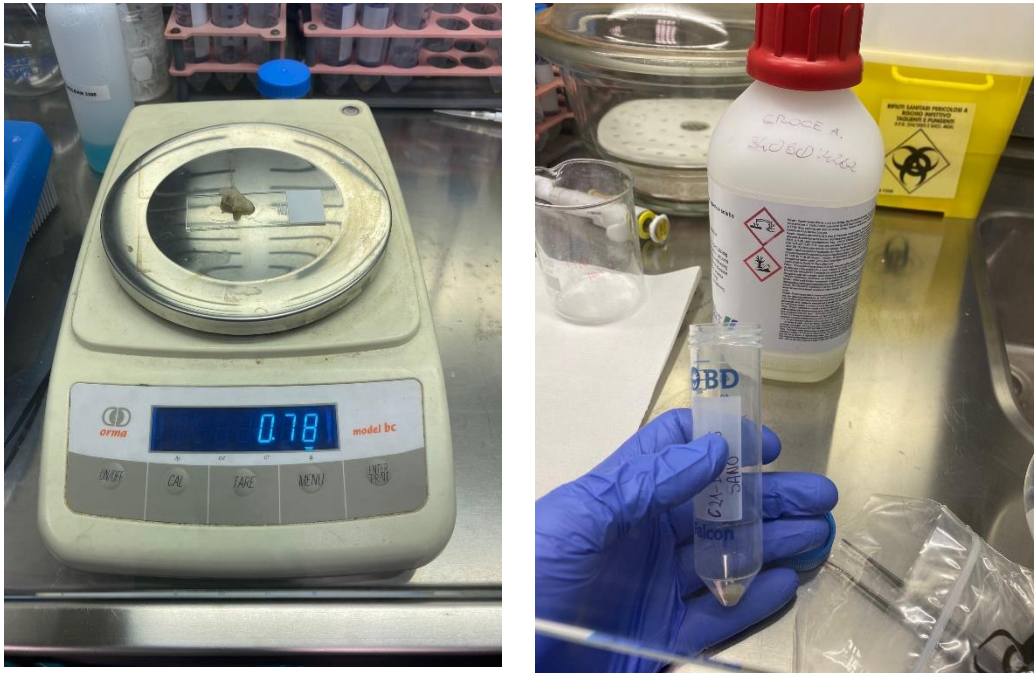


Figura 44: A sinistra bilancia tecnica con campione; a destra provetta falcon e NaClO.

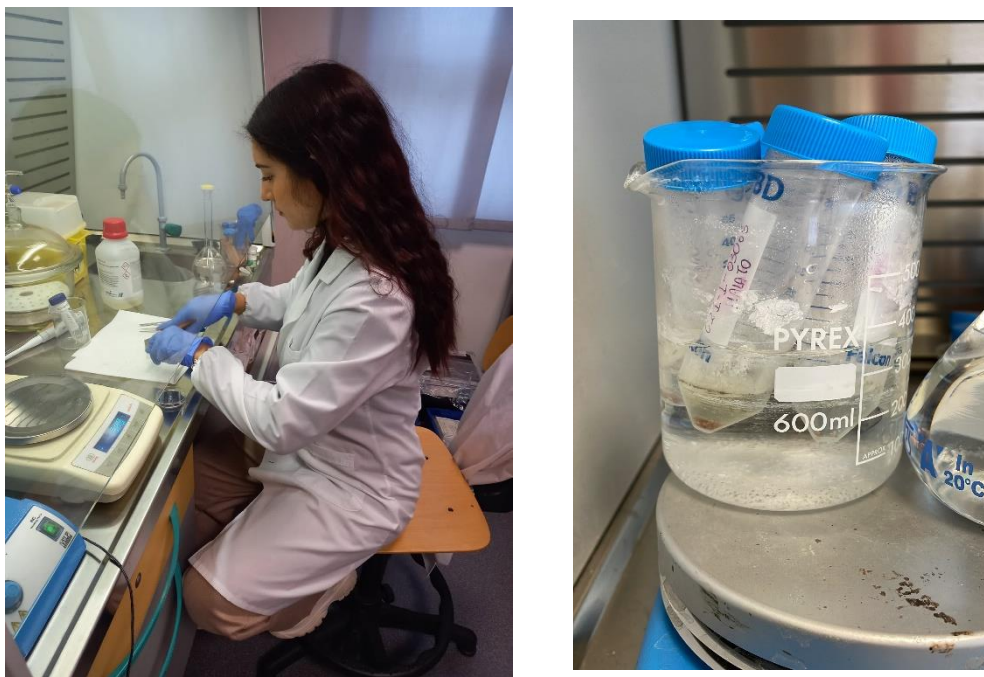


Figura 45: A sinistra viene rappresentato il momento della preparazione dell'omogeneizzato; a destra le provette contenenti i campioni in fase di digestione.

- La filtrazione avviene su un filtro misto in policarbonato, con diametro di 25 mm e porosità di 0,2 micron al fine di raccogliere solamente il materiale inorganico;
- La soluzione è stata diluita con acqua MilliQ riscaldata a 60°C per ridurre la possibile precipitazione di NaCl;
- Grazie all'ausilio di pinzette, è stato estratto il filtro ed è stato posizionato su supporti chiamati "pin "stub", precedentemente rivestiti con nastro biadesivo per agevolare l'adesione del filtro;
- Successivamente viene posizionato il supporto con il filtro nel porta campioni all'interno della camera del microscopio elettronico a scansione (SEM)

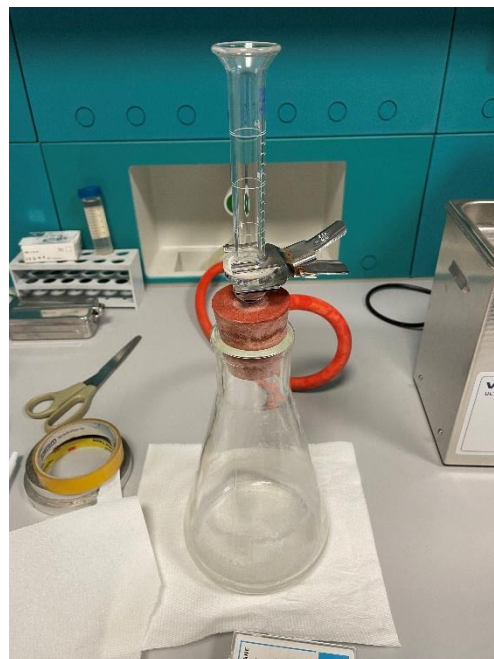


Figura 46: A sinistra supporto porta campioni contenenti i pin stub con i filtri; a destra lo strumento utilizzato per la filtrazione.

6.4 MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE

La microscopia elettronica a scansione con annessa microsonda in dispersione di energia (SEM/EDS) è un tipo di microscopia con altissimi ingrandimenti (fino a 200.00x teorici) ed è uno strumento ad alta risoluzione (limite 2 nm) che permette di ottenere gli spettri relativi alla composizione chimica dei materiali.,

Il SEM è uno strumento molto versatile poiché permette un'elevata varietà di campioni e di analisi, che differiscono per natura, forma e dimensione. È una tecnica non distruttiva e

viene utilizzata in molti campi sia biologici che chimici. Tuttavia, presenta anche degli svantaggi:

- non permette di effettuare analisi in situ;
- non permette di effettuare caratterizzazioni cristallografiche;
- è necessario possedere un database di spettri di riferimento per confrontare le fasi e la natura del campione in esame.

6.4.1 STRUMENTAZIONE SEM/EDS

I microscopi elettronici a scansione sono formati da:

- una sorgente di elettroni;
- un anodo verso cui sono accelerati gli elettroni;
- lenti elettromagnetiche che servono a focalizzare il fascio di elettroni;
- una lente di scansione e di messa a fuoco del preparato, ove il fascio elettronico interagisce con il campione;
- una camera da vuoto con tavolino porta-campioni (stage) per posizionare il campione;
- diversi tipi di rivelatori che acquisiscono i segnali generati dall'interazione tra il fascio elettronico e il campione e li trasmettono a dispositivi di elaborazione;
- uno schermo su cui l'immagine viene ricostruita e visualizzata.

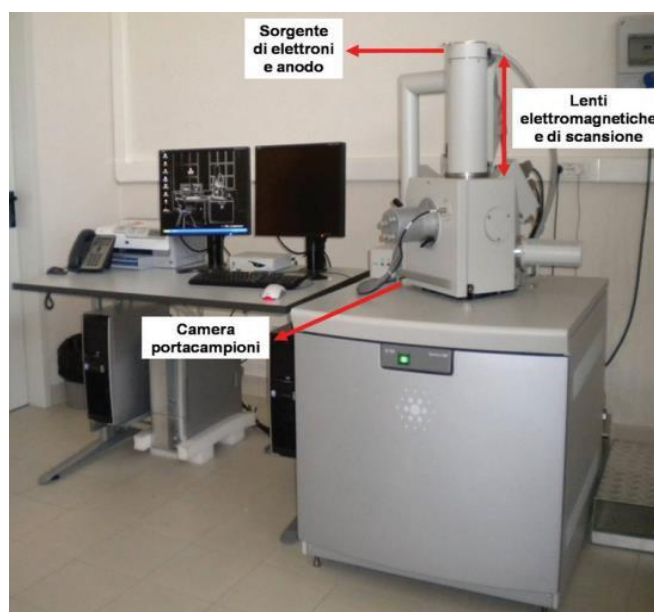


Figura 47: microscopio elettronico a scansione del polo DISIT.

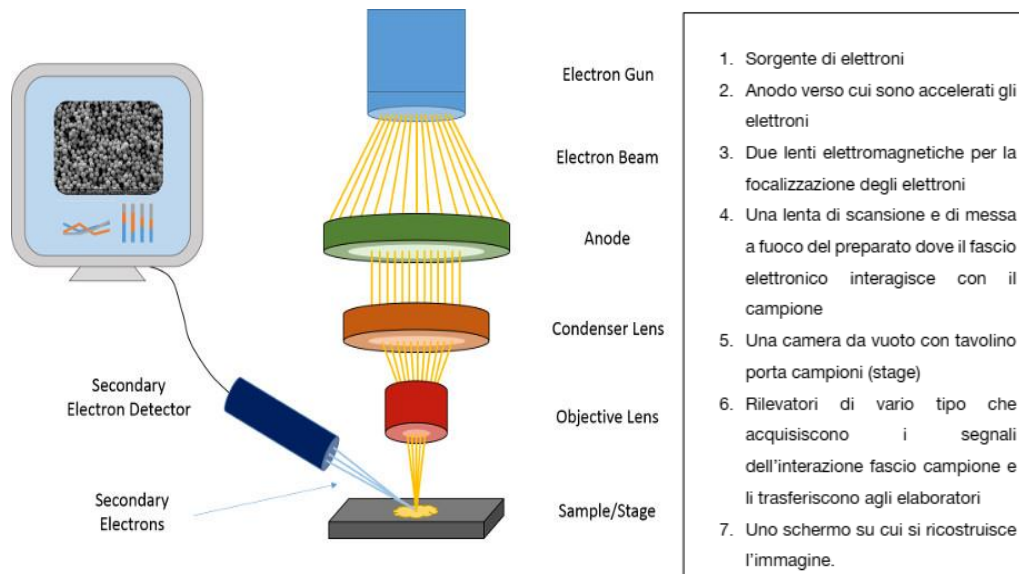


Figura 48: Rappresentazione schematica del funzionamento del microscopio elettronico a scansione. (<https://www.jove.com>).

Nella parte superiore della colonna è situata la “sorgente di elettroni”, si tratta solitamente di un filamento in tungsteno o di esaboruro di lantanio, che funzionano da catodo. Questo viene riscaldato a 2700K circa, tramite un effetto termoionico, emettendo elettroni; la sorgente può essere, anche, ad emissioni di campo (FEG) che permette di ottenere elevate prestazioni strumentali.

Il filamento è situato all’interno di un cilindro perforato e polarizzato, Wehnelt, che svolge la funzione di selezionare un fascio di elettroni in cui è possibile variare la tensione di alimentazione e può avere un’orientazione più o meno negativa rispetto al fascio stesso. Sotto il cilindro, è presente un anodo, da cui gli elettroni emessi dal filamento vengono accelerati a energie variabili, di solito da 0,3 a 30keV. Gli elettroni vengono emessi dal filamento in tutte le direzioni, ma il campo elettrico del Wehnelt e la differenza di potenziale applicata fra questo e l’anodo li convergono in una regione, detta “cross over”, dove si forma l’immagine della sorgente.

Sotto l’anodo, nella colonna del microscopio, ci sono tre lenti elettromagnetiche. Le prime due hanno la funzione di collimare e regolarizzare la larghezza del fascio, mentre la terza, mette a fuoco il campione alla distanza di lavoro scelta dall’operatore. La transizione del fascio elettronico sulle lenti genera 4 tipologie di aberrazione, che possono essere corrette dall’operatore in fase di analisi:

- a) Sferica, se gli elettroni che viaggiano a distanze diverse rispetto all’asse sono focalizzati in punti diversi;

- b) Cromatica, se gli elettroni con diversa energia vengono focalizzati in piani diversi a causa della velocità non uniforme del fascio;
- c) Di diffrazione, in cui non tutte le onde arrivano all'interno della lente, per le dimensioni definite finite della lente e per la natura non ondulatoria dell'elettrone;
- d) Astigmatismo, se diversi fattori come contaminazioni oppure un'irregolarità di lavorazione nell'avvolgimento delle bobine, inducono asimmetrie nel campo delle lenti.

Diminuendo l'angolo di divergenza tra il fascio elettronico e il campione (lunghezza focale), è possibile risolvere sia le aberrazioni cromatiche che quelle sferiche. Un compromesso per lavorare nelle migliori condizioni operative risiede nella diminuzione della lunghezza focale delle lenti senza portare il campione all'interno del loro campo magnetico.

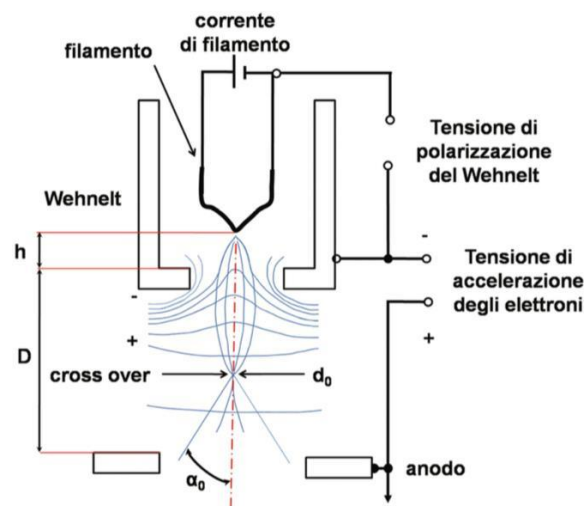


Figura 49: Rappresentazione schematica dell'azione del Wehnelt e dell'anodo sul fascio elettronico, che risulta convogliato verso la zona di cross over (Rinaudo & Croce, 2020)

La scansione è eseguita mediante l'uso di due coppie di bobine posizionate in prossimità dell'asse ottico. I campioni vengono posizionati nella camera porta campioni, in cui si trovano dei tavolini (stage) che permettono di muovere il campione nelle tre direzioni dello spazio, di ruotarlo e di inclinarlo. I campioni vengono posti su supporti chiamati "pin stub", dotati di una forma particolare che consente di porre in campione nei fori del piattello porta campioni all'interno della camera apposita.



Figura 50: Pin stub.

6.4.2 INTERAZIONE FRA ELETTRONI E CAMPIONI

Il fascio di elettroni prodotto dal filamento, collimato e regolarizzato opportunamente dalle lenti elettromagnetiche arriva sul campione dove opera una scansione, linea per linea, del campione in analisi. L'interazione tra gli elettroni e il campione genera una serie di segnali, che forniscono dati morfologici e composizionali. A differenza della microscopia ottica, in cui si ottiene un'immagine reale, il SEM genera un'immagine virtuale basata sull'analisi dei segnali emessi dopo l'interazione con il fascio elettronico primario.

Una volta che gli elettroni vengono emessi dalla sorgente e interagiscono con il campione, generano diversi fenomeni fisici:

- **Elettroni retrodiffusi:** quando gli elettroni del fascio rimbalzano in modo elastico rispetto ai nuclei degli elementi da cui è formato il campione. Nascono dalla porzione di fascio riflessa e provengono da livelli più profondi. Hanno un'energia compresa fra 50 eV a quella di incidenza del fascio elettronico primario. Si può ottenere così un'analisi sia composizionale che morfologica.
- **Elettroni secondari:** quando gli elettroni del fascio scalzano elettroni dagli orbitali esterni degli atomi del campione. Essi vengono originati dagli strati più superficiali del campione, a circa 10 nm. Sono elettroni che hanno bassa energia di penetrazione, al massimo 50 eV. Si può ottenere un'analisi morfologica della superficie del campione.
- **Raggi X:** vengono originati quando un elettrone del fascio riesce a espellere uno degli elettroni dei livelli più interni dell'atomo, ionizzandolo. Di conseguenza un elettrone del livello superiore può andare a ricoprire il posto vacante originando l'emissione di un fotone X, con energia uguale alla differenza tra i due livelli. I raggi X vengono

acquisiti da rivelatori EDS, oppure da rivelatori WDS, ottenendo informazioni composizionali, sia a livello qualitativo che quantitativo. (Rinaudo & Croce, 2020).

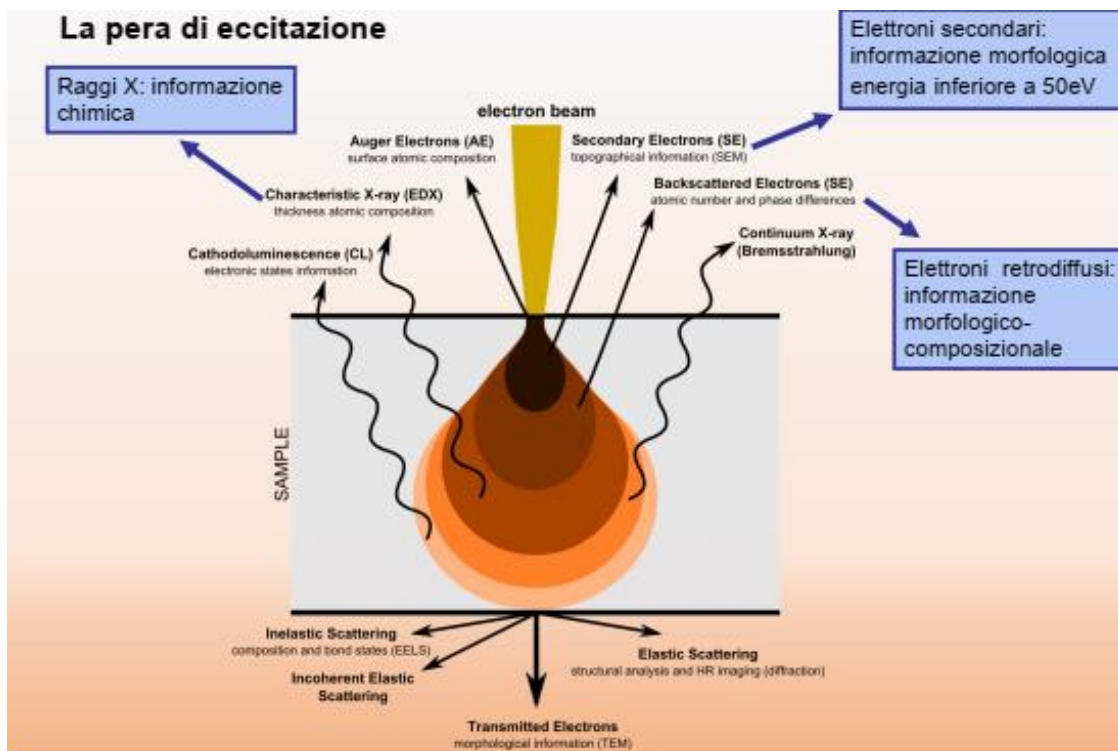


Figura 51: Pera di eccitazione. (Croce, 2022)

6.4.3 RIVELATORI

Per ognuno dei tre segnali esistono dei detector dedicati alloggiati all'interno della camera porta campioni:

- Il "rivelatore degli elettroni secondari" ha una tensione elevata di 10kV ed è posto a basso angolo per attrarre gli elettroni secondari, che hanno bassa energia. L'immagine su scala di grigi permette di ottenere informazioni sulla tridimensionalità morfologica della porzione in analisi del campione.
- Il rivelatore degli elettroni retrodiffusi è posto sopra al campione. Gli elettroni retrodiffusi hanno un'energia che va da 50 eV all'energia del fascio, quindi più alta rispetto agli elettroni secondari. Il contrasto delle tonalità di grigio mette in risalto la diversa composizione chimica delle diverse parti che compongono il campione. Le parti composte da materiale con peso atomico maggiore risulteranno più chiare e viceversa quelle a peso atomico minore.
- Il "rivelatore di dispersione di energia" (EDS), fornisce informazioni chimiche sotto forma di raggi X. Si possono eseguire analisi puntuali, mettendo il fascio in pausa,

oppure analisi lineari, areali e costruzione di mappe a colori che evidenziano la presenza di diversi elementi all'interno dell'area analizzata. Il segnale che arriva dai raggi X è caratteristico dell'atomo e ne permette l'identificazione.

Ognuna delle interazioni è convertita in segnale digitale e visualizzata sullo schermo del pc; opportuni software consentono di ottenere dati chimici e mappe a raggi x, sia sotto un aspetto qualitativo che quantitativo.

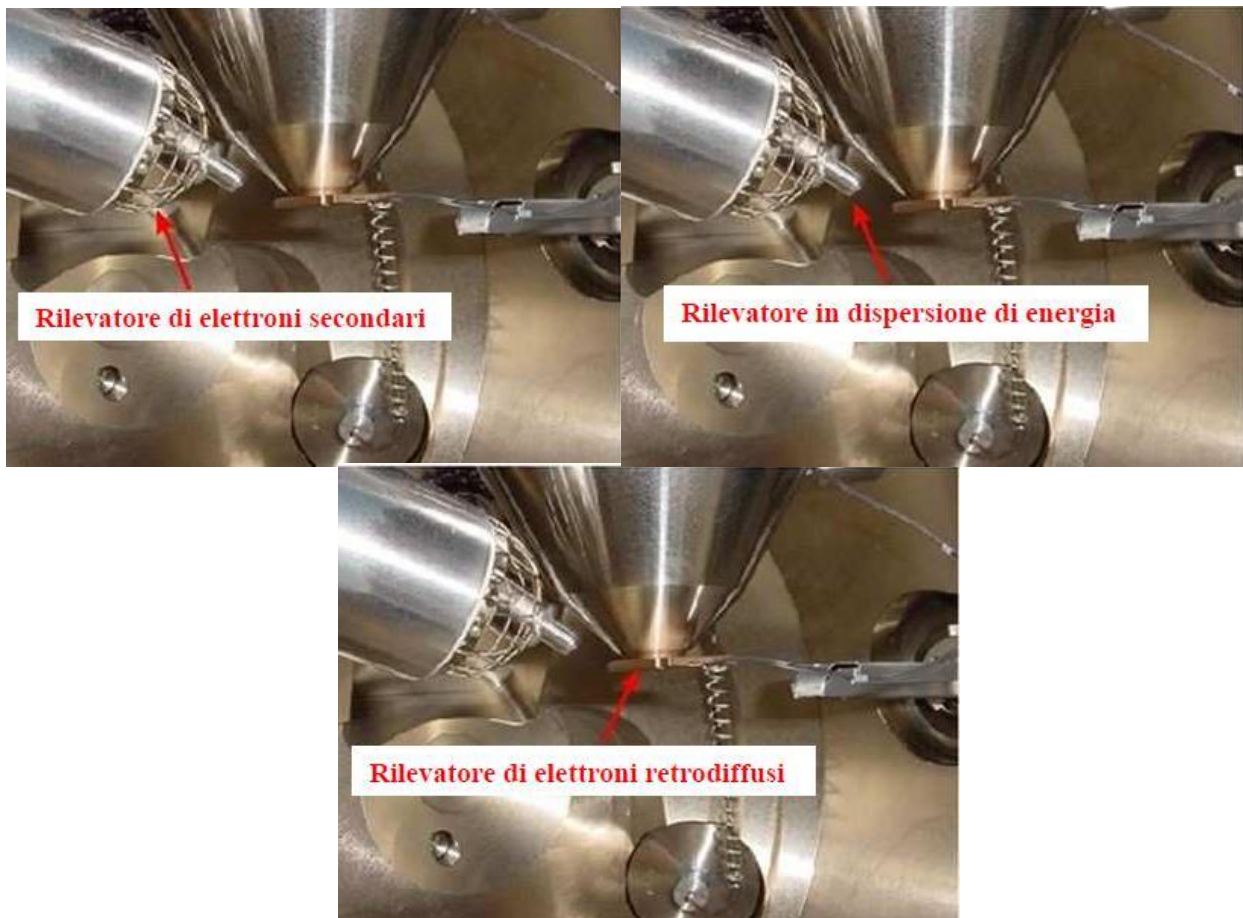


Figura 52: Rappresentazione dei vari detector nello strumento. (Croce, 2022)

6.4.4 MODALITA' OPERATIVE DEL SEM/EDS

Per effettuare un'analisi in microscopia elettronica a scansione, si possono adottare 3 modalità differenti:

1. "Alto vuoto": si lavora con pressione di 10^{-6} Pa, i campioni devono essere resi conduttivi e/o metallizzati e secchi. Con questa modalità si ottengono immagini ad elevati ingrandimenti (200.000x) e, con opportune calibrazioni, analisi chimiche quantitative.

2. “Basso vuoto”: si lavora con pressione tra i 10 e i 130 Pa, si osservano materiali che, operando ad alto vuoto, potrebbero venire danneggiati. I campioni non devono essere conduttivi e secchi. Con questa modalità si ottengono performance di ingrandimento minore rispetto all’alto vuoto e analisi chimiche esclusivamente di tipo qualitativo.
3. “Ambientale” o “*Environmental SEM*”: si lavora con pressioni tra i 10 e i 2600 Pa, ovvero pressioni ambientali, da cui il nome della modalità; si possono osservare materiali umidi, campioni biologici e ogni altro campione contenente liquidi, senza che essi necessitino di manipolazione, mantenendo così le caratteristiche strutturali del materiale in analisi (Croce e Rinaudo, 2020).

6.4.5 IMMAGINI SEM E SPETTRI EDS DELLE FASI PURE

Di seguito vengono riportate le immagini delle fibre di amianto ottenute tramite la microscopia elettronica a scansione (SEM) con l’utilizzo del rivelatore di elettroni secondari, e il relativo spettro EDS.

- Actinolite d’amianto $\text{Ca}_2(\text{Mg}, \text{Fe}^{2+})_5[\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$: il maggior contenuto in Mg rispetto al Fe^{2+} , è dimostrato dalla più alta intensità del picco associato al Mg rispetto ai picchi ascrivibili al Fe^{2+} .

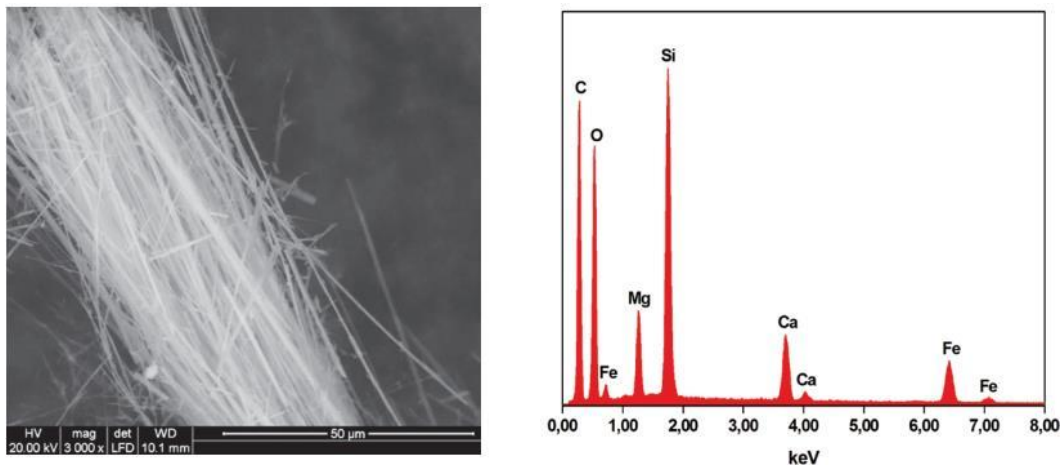


Figura 52: Fibre di actinolite osservate in SEM e il relativo spettro EDS (Rinaudo & Croce, 2020)

- Amosite d'amianto $(\text{Fe}^{2+}, \text{Mg})_7[\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$: il picco del Fe^{2+} risulta più intenso di quello del Mg.

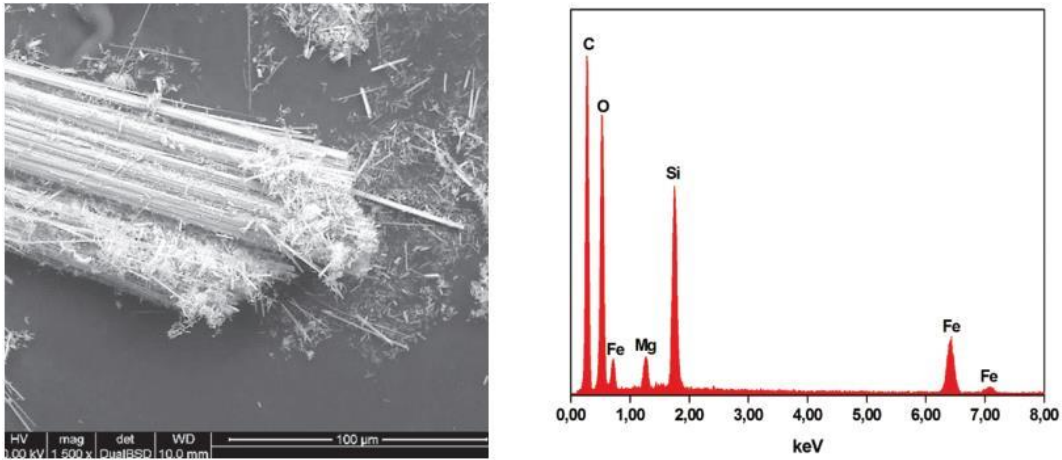


Figura 53: Fibre di amosite osservate in SEM e il relativo spettro EDS (Rinaudo & Croce, 2020)

- Antofillite d'amianto $(\text{Mg}, \text{Fe}^{2+})_7[\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$: il picco del Mg risulta molto più intenso di quello del Fe^{2+} .

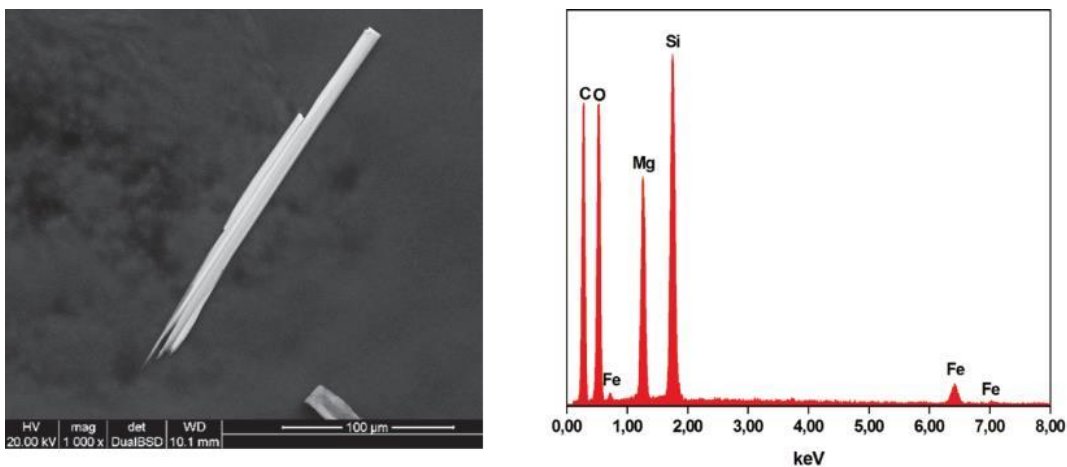


Figura 54: Fibre di antofillite osservate in SEM e il relativo spettro EDS (Rinaudo & Croce, 2020)

- Tremolite d'amianto $\text{Ca}_2\text{Mg}_5[\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$: nella formula chimica teorica il Fe^{2+} è assente, ma spesso vi si identificano piccole quantità che sostituiscono il Mg nei siti ottaedrici. È il caso della tremolite proveniente da Brachiello (Val D'Ala, Piemonte, Italia), dove un picco molto debole associato al Fe viene individuato dall'analisi EDS.

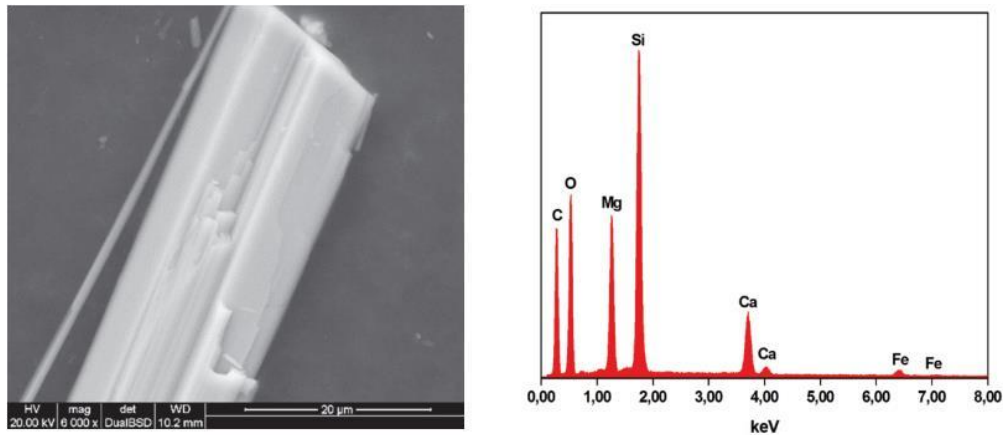


Figura 55: Fibre di tremolite osservate in SEM e il relativo spettro EDS (Rinaudo & Croce, 2020).

- Crocidolite $\text{Na}_2\text{Fe}^{2+}_3\text{Fe}^{3+}_2[\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2]$: essendo il Fe decisamente prevalente sul Mg, i picchi prodotti da tale elemento hanno intensità maggiore rispetto a quelli originati da Na e Mg.

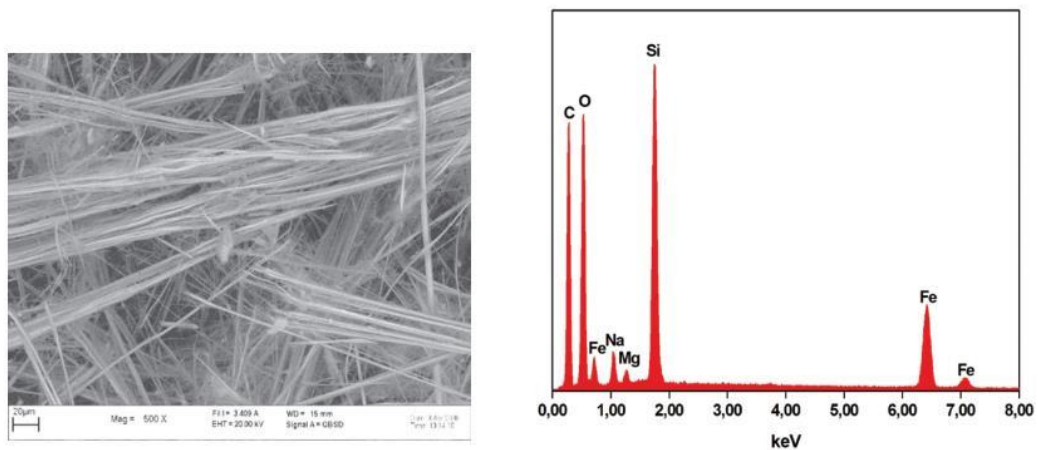


Figura 56: Fibre di crocidolite osservate in SEM e il relativo spettro EDS (Rinaudo & Croce, 2020).

- Crisotilo $\text{Mg}_3\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4$: nella formula chimica teorica il Fe è assente, ma spesso vi si trovano piccole quantità che sostituiscono il Mg nei siti ottaedrici. Lo spettro EDS del crisotilo è caratteristico in quanto l'intensità del picco associato al Mg risulta sempre maggiore di quello del Si (Rinaudo & Croce, 2020)

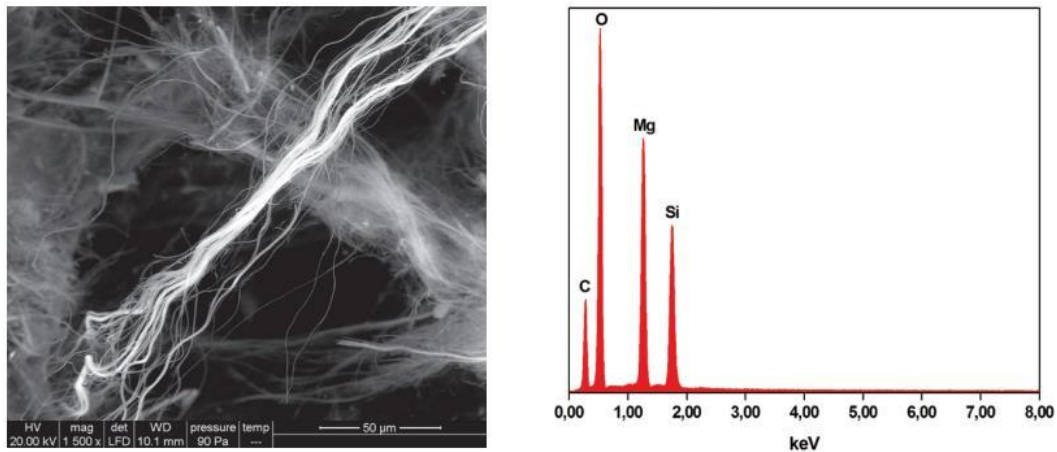


Figura 57: Fibre di crisotilo osservate in SEM e il relativo spettro EDS (Rinaudo & Croce, 2020).

Le metodologie precedentemente illustrate sono state utilizzate dal gruppo di ricerca DAIRI-UPO per identificare la presenza di fibre e particelle di amianto e di altri inquinanti nei campioni prelevati da pazienti affetti da neoplasie extratorali residenti nel SIN di Casale Monferrato. Lo scopo è stato quello di verificare la presenza di fasi minerali nei tessuti extrapulmonari attraverso la tecnica del microscopio elettronico a scansione SEM/EDS, dopo digestione chimica.

Per - “fibre respirabili” - si intendono tutte quelle fibre che presentano lunghezza $> 5 \mu\text{m}$, diametro $< 3 \mu\text{m}$ e rapporto lunghezza/diametro superiore a 3. I corpuscoli dell’asbesto sono un tentativo di fagocitosi dei macrofagi; presentano una morfologia caratteristica a “perla” formata da materiale proteico, in particolare ferritina (proteina deputata allo scambio di ferro). Questa reazione non avviene solo sulla superficie delle fibre di amianto, ma anche su altre fasi esterne riconosciute come dannose dagli organi. I corpuscoli rappresentano un marker tipico dell’esposizione all’amianto e pertanto il loro riconoscimento è importante nell’ambito dell’anatomia patologica. (Rinaudo & Croce, 2020).



Figura 58: Corpuscoli in microscopia ottica. (Rinaudo & Croce, 2020)

La microscopia elettronica a scansione con spettroscopia a dispersione di energia (SEM-EDS) è l'unica tecnica analitica conveniente in grado di discriminare sia la morfologia che la composizione elementare delle fibre inorganiche. Il metodo identifica prima l'abito delle particelle e successivamente ne determina la composizione chimica. Nel caso di fibre singole, diritte e regolari, ad es. gli anfiboli, i diametri si possono discriminare correttamente tra particelle asbestiformi e non asbestiformi. Al contrario, le fibre arricciate e irregolari, ad es. il crisotilo, ma anche anfiboli sovrapposti ad altre particelle, sono soggetti a una sovrastima della larghezza. (Cossi et al., 2018).



Figura 59: Corpuscoli dell'asbesto in microscopia elettronica a scansione (Gruppo biofibre, 2017).

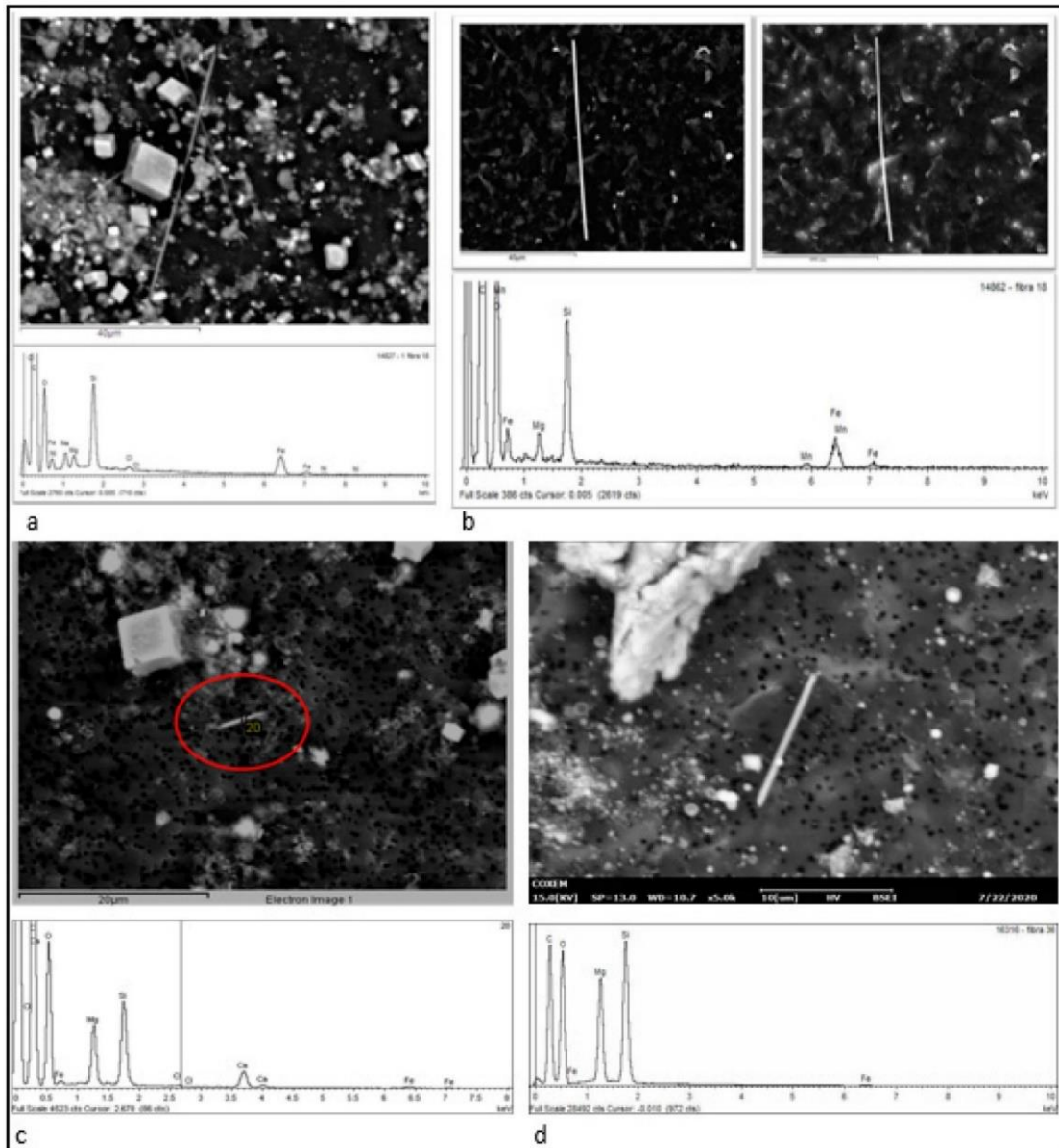


Figura 60: Alcuni esempi di immagini SEM e di spettri EDS di ciascuna tipologia di amianto rilevata. (a) Immagine SEM in elettroni retrodiffusi e spettro EDS della crocidolite. (b) Immagine SEM in elettroni retrodiffusi (a sinistra) e secondari (a destra) e spettro EDS dell'amosite. (c) Immagine SEM in elettroni retrodiffusi e spettro EDS dell'amianto tremolite/actinolite. Le particelle cubiche sono residui di NaCl. (d) Immagine SEM in elettroni retrodiffusi e spettro EDS dell'amianto antofillite. (Visonà et al., 2021)

7 RISULTATI

Di seguito vengono riportate alcune analisi esemplificative effettuate tra il 2014 ed oggi dal gruppo di mineralogia ambientale del DAIRI-UPO, in collaborazione con l'Azienda Ospedaliera Universitaria SS. Antonio e Biagio e Cesare Arrigo di Alessandria e con l'ospedale di Santo Spirito di Casale Monferrato, in organi derivanti da patologie extrarespiratorie.

Le sedi delle neoplasie e/o gli organi studiati sono state:

SEDI	CASI
Fegato	Caso 1 e Caso 2
Colecisti	Caso 3
Stomaco	Caso 4
Colon	Caso 5 e Caso 6

Tabella 6: Sedi analizzate e i nomi dei rispettivi campioni.

7.1 CASO 1

Il caso 1 è relativo alle analisi effettuate su un campione di fegato di un paziente affetto da colangiocarcinoma. Di seguito viene riportato un primo esempio di particella riscontrata nel tessuto (figura 61).

La particella riscontrata, riportata in figura 61, non può essere definita "fibra", in quanto ha una lunghezza di 5,46 μm , un diametro di 3,74 μm e un rapporto lunghezza/diametro di 1,40. La particella è stata analizzata in diversi punti e di seguito ne vengono riportati i risultati.

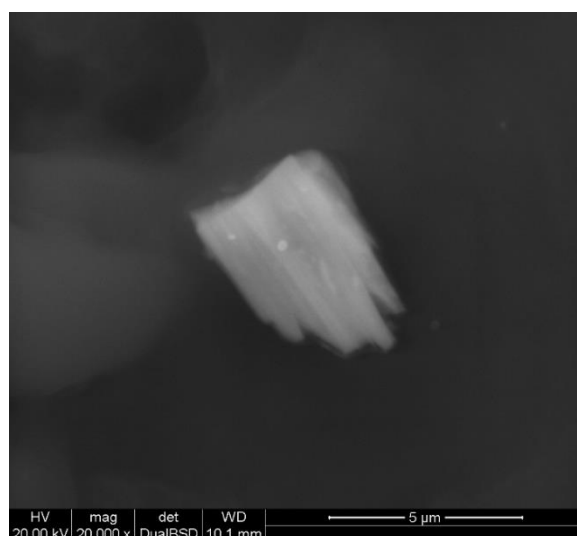


Figura 61: Particella riscontrata nel tessuto.

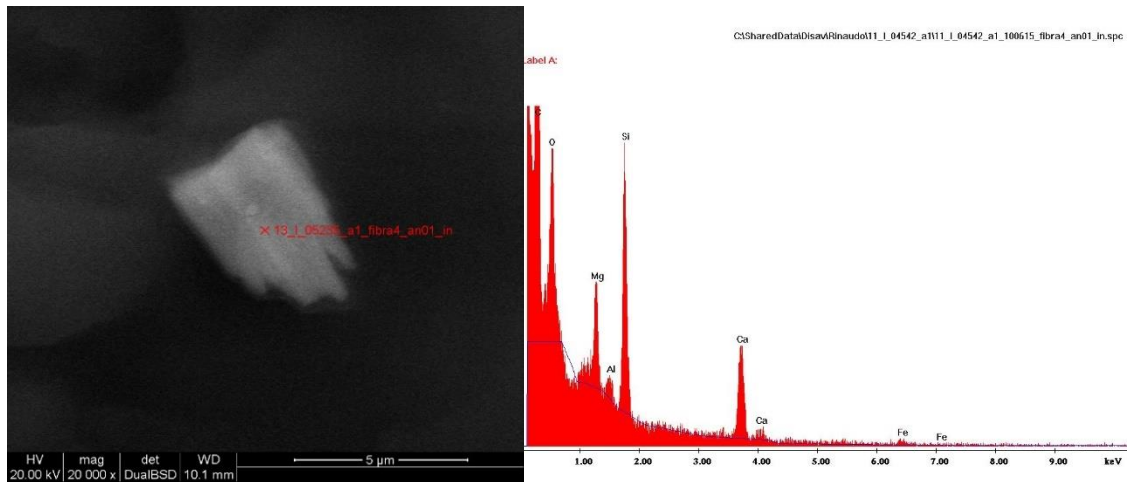


Figura 62: Primo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

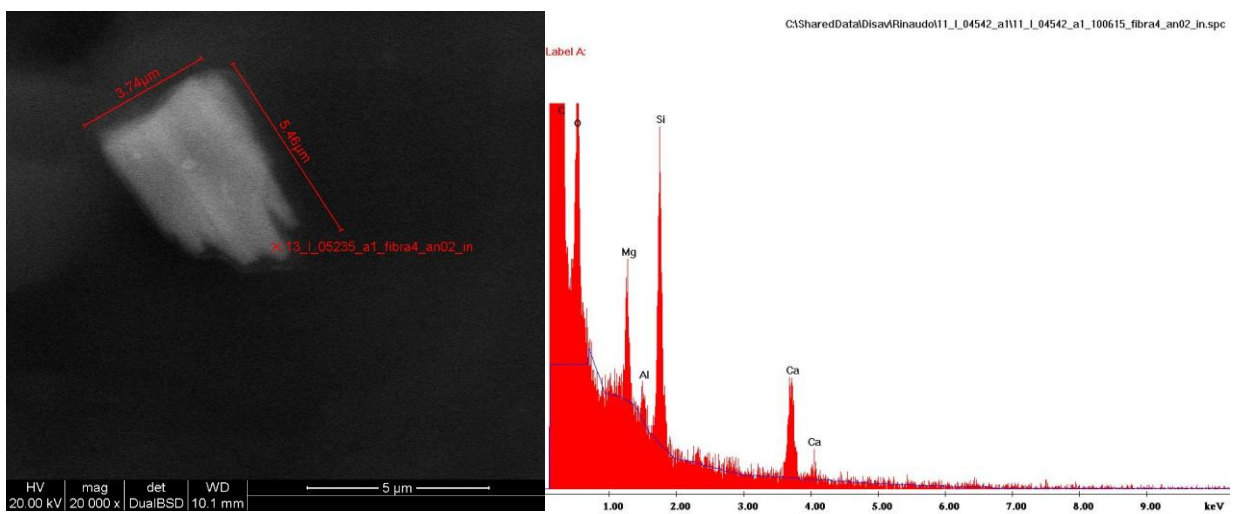


Figura 63: Secondo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

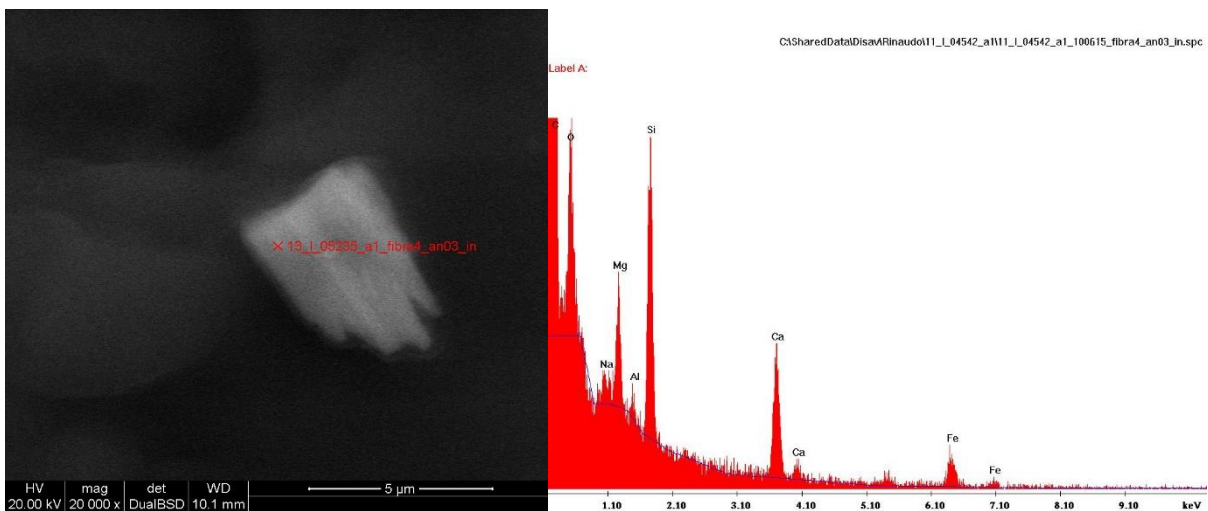


Figura 64: Terzo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

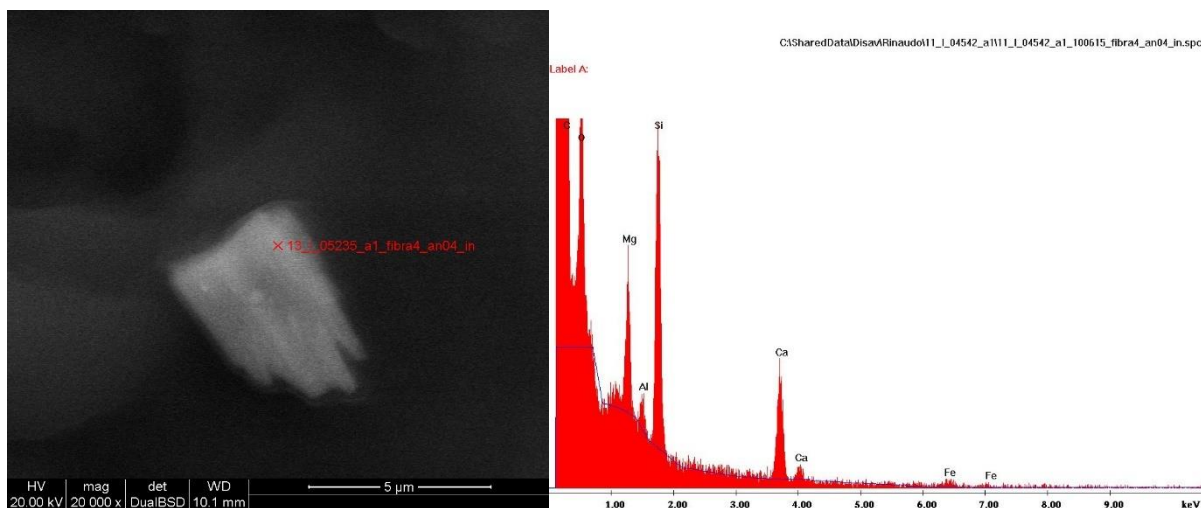


Figura 65: Quarto punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

Analisi	C	O	Mg	Al	Si	Ca	Fe
Particella4_an01_in	78,73%	16,20%	1,31%	0,22%	2,26%	1,14%	0,14%
Particella4_an02_in	86,03%	11,76%	0,57%	0,12%	1,02%	0,50%	
Particella4_an03_in	84,30%	11,23%	0,35%	0,91%	0,14%	0,89%	0,48%
Particella4_an04_in	82,11%	14,23%	0,97%	0,18%	1,67%	0,74%	0,10%

Tabella 7: Composizione semi-quantitativa in percentuali atomiche relative al punto di analisi.

Dalle analisi riportate sopra, e dai valori numerici in percentuali atomiche ottenuti mediante le analisi chimiche, si può osservare che la particella risulta essere composta principalmente da silicio, seguito in quantità decrescenti da magnesio e calcio, con tracce di alluminio e ferro. Andando ad effettuare un confronto tra gli spettri della particella incognita con quelli dei minerali standard presenti presso il gruppo di ricerca ed in bibliografia, la composizione chimica appare confrontabile con quella della tremolite. Perciò, questa particella appare composizionalmente come minerale di amianto, tuttavia le caratteristiche dimensionali non permettono di conteggiarla come “fibra respirabile”: questo è quindi un esempio di una particella con composizione chimica paragonabile all’asbesto, che successivamente nell’elaborato verrà definita “particella con composizione chimica amianto”.

7.2 CASO 2

Anche in questo caso sono state eseguite le analisi su un campione di fegato di un paziente affetto da colangiocarcinoma. La particella riscontrata, riportata in figura 66, può essere definita “fibra”, in quanto ha una lunghezza di 8,14 μm , un diametro di 2,66 μm e un rapporto lunghezza/diametro di 3,06. La fibra è stata analizzata in diversi punti e di seguito ne vengono riportati i risultati.

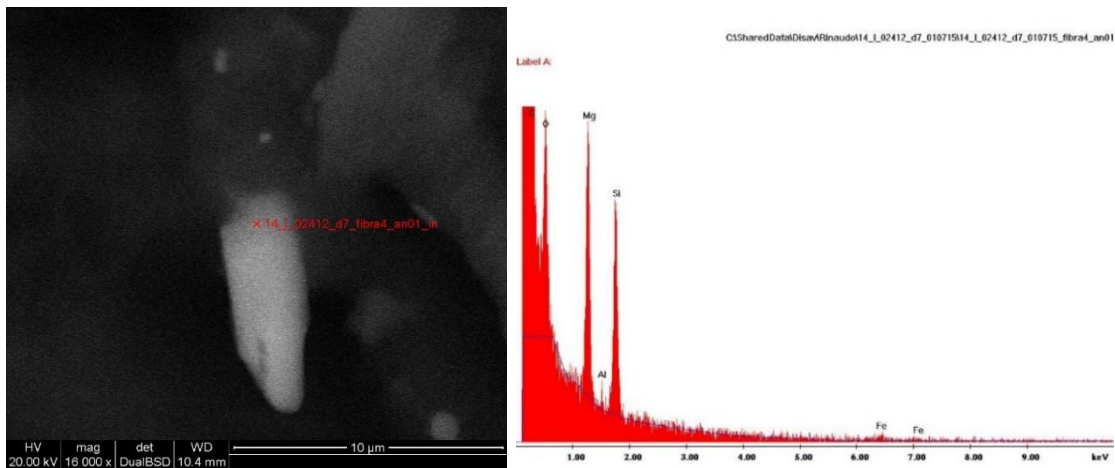


Figura 66: Primo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

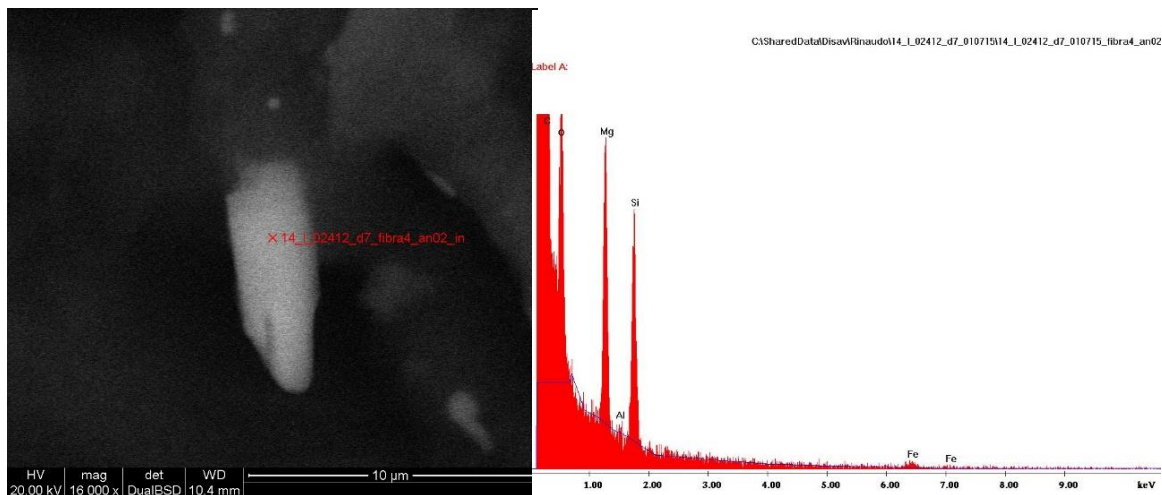


Figura 67: Secondo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

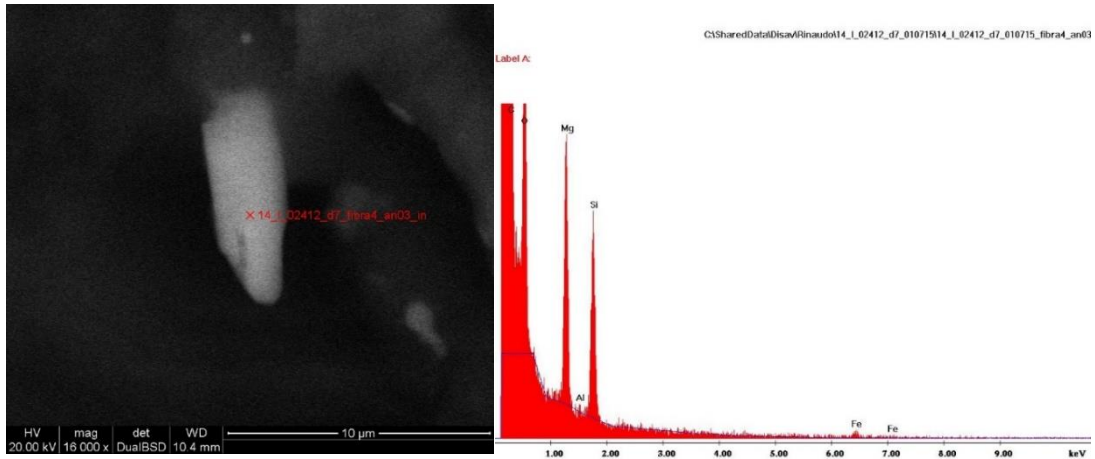


Figura 68: Terzo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

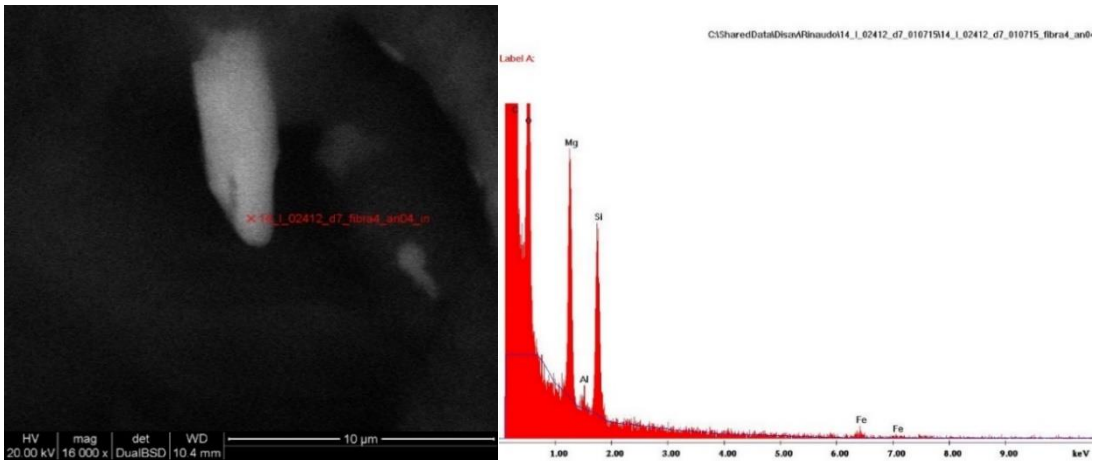


Figura 69: Quarto punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

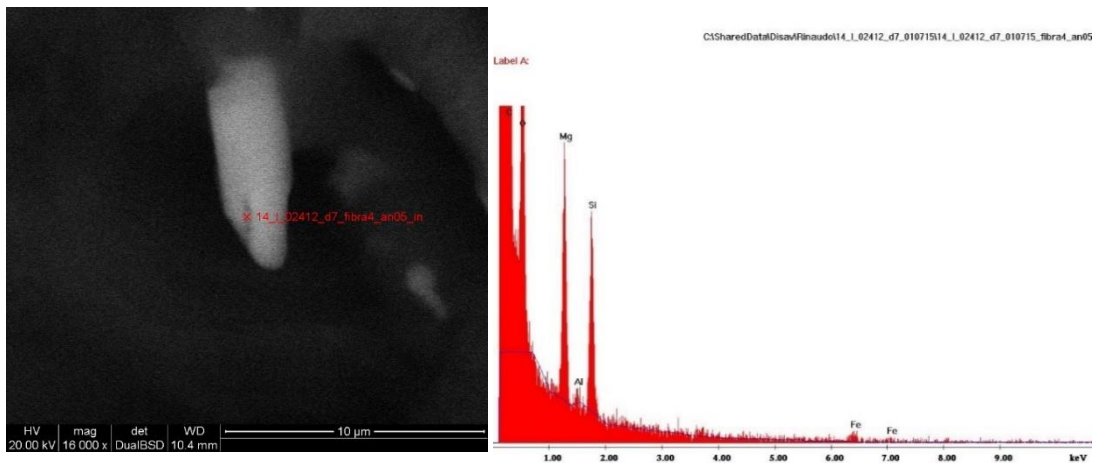


Figura 70: Quinto punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

Analisi	C	O	Mg	Al	Si	Fe
Fibra4_an01_in	88,09%	9,34%	1,50%	0,05%	0,93%	0,08%
Fibra4_an02_in	81,97%	14,63%	2,04%	0,02%	1,24%	0,10%
Fibra4_an03_in	77,17%	19,10%	2,29%	0,02%	1,31%	0,11%
Fibra4_an04_in	80,18%	17,18%	1,56%	0,06%	0,94%	0,08%
Fibra4_an05_in	83,12%	14,53%	1,36%	0,05%	0,82%	0,11%

Tabella 8: Composizione semi-quantitativa in percentuali atomiche relative al punto di analisi.

Dal punto di vista chimico, si può vedere come tale fibra sia composta da magnesio e silicio, con tracce di ferro. La presenza di un picco di magnesio maggiore rispetto a quello del silicio è un chiaro indizio che permette di attribuire questa particella a una fase di serpentino. Tuttavia, la discriminazione tra crisotilo, antigorite o lizardite appare impossibile, in quanto la morfologia non permette di escludere nessuna delle tre fasi (neanche il crisotilo, in quanto la rigidità potrebbe essere conferita dal fatto che la particella sia inglobata nei tessuti organici). In questo caso, le dimensioni e la composizione chimica possono essere indizio di una fibra respirabile di amianto; soltanto una tecnica aggiuntiva come la spettroscopia micro-Raman potrebbe dare una risposta definitiva sulla natura mineralogica di questa fase inorganica riscontrata nel tessuto.

7.3 CASO 3

Sono state eseguite le analisi su un campione di cistifellea. La particella riscontrata, riportata in figura 71, non può essere definita “fibra respirabile”, in quanto ha una lunghezza di 4,12 μm , un diametro di 0,62 μm e un rapporto lunghezza/diametro di 6,64. La particella è stata analizzata in diversi punti e di seguito ne vengono riportati i risultati.

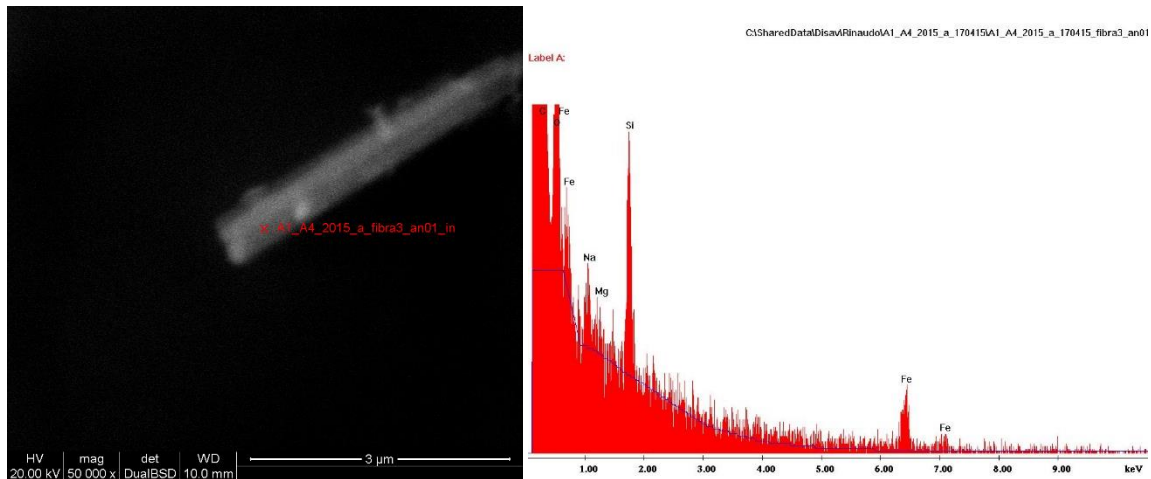


Figura 71: Primo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

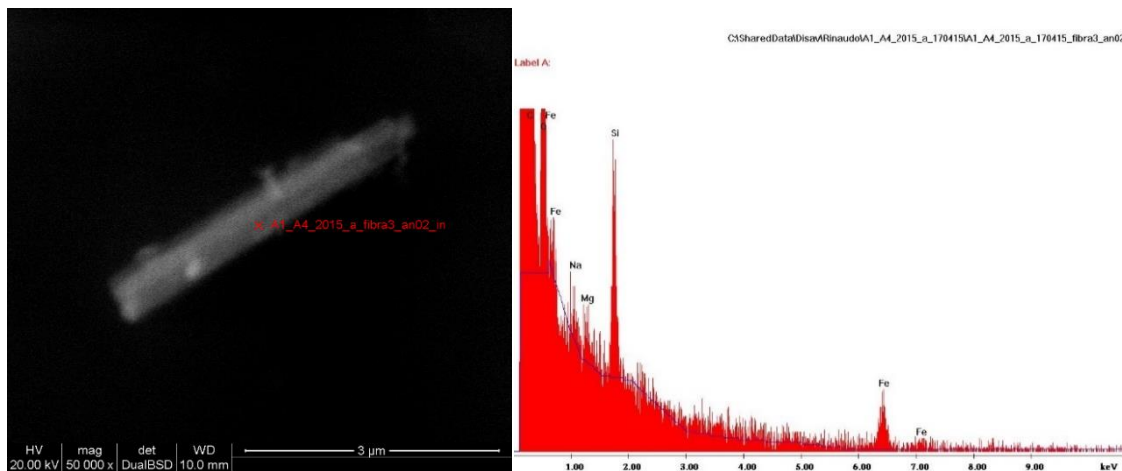


Figura 72: Secondo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

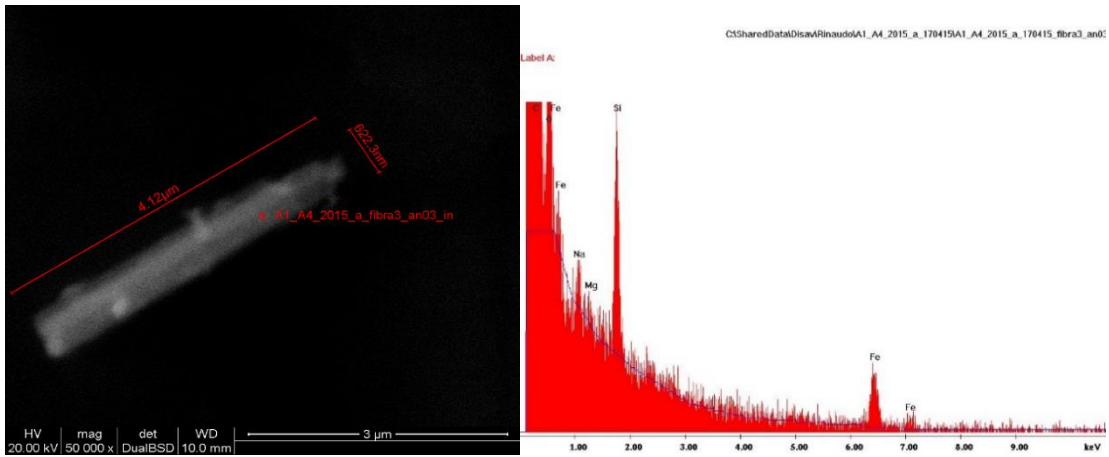


Figura 73: Terzo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

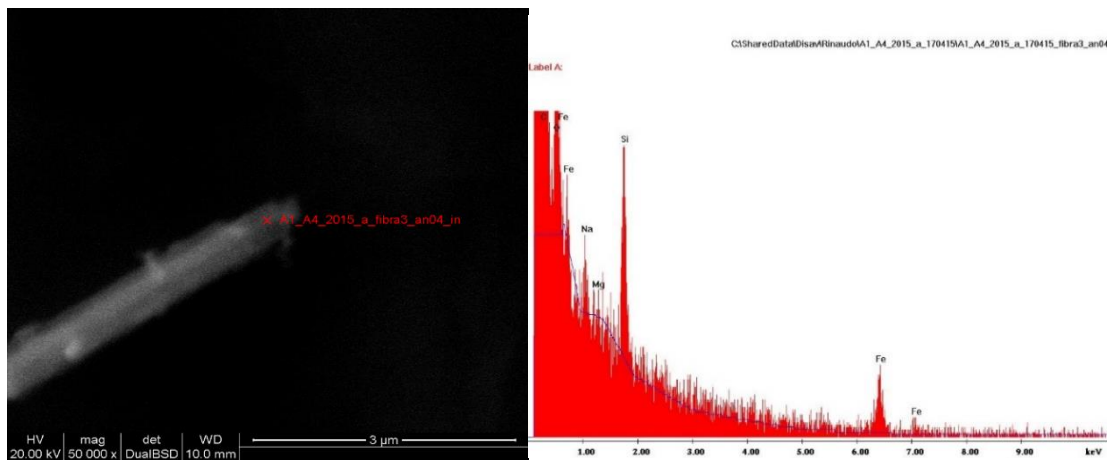


Figura 74: Quarto punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

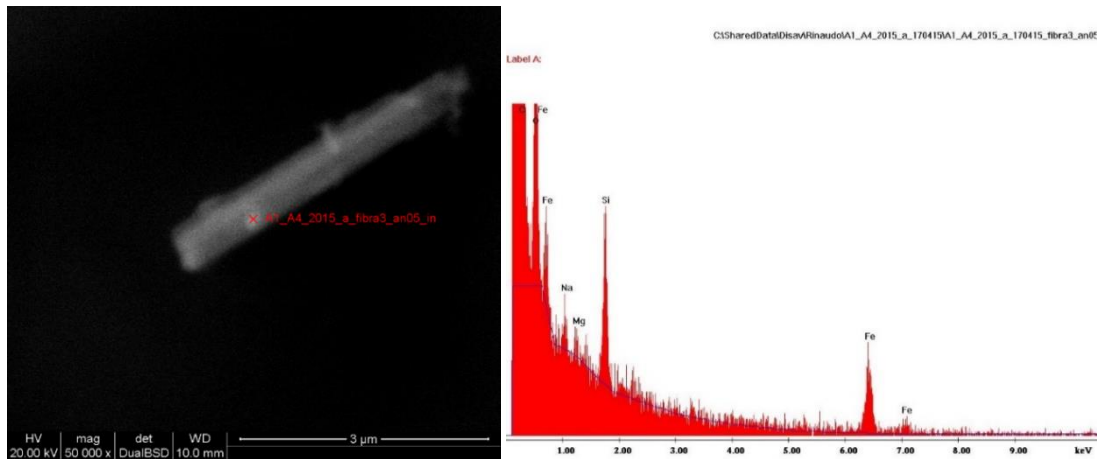


Figura 75: Quinto punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

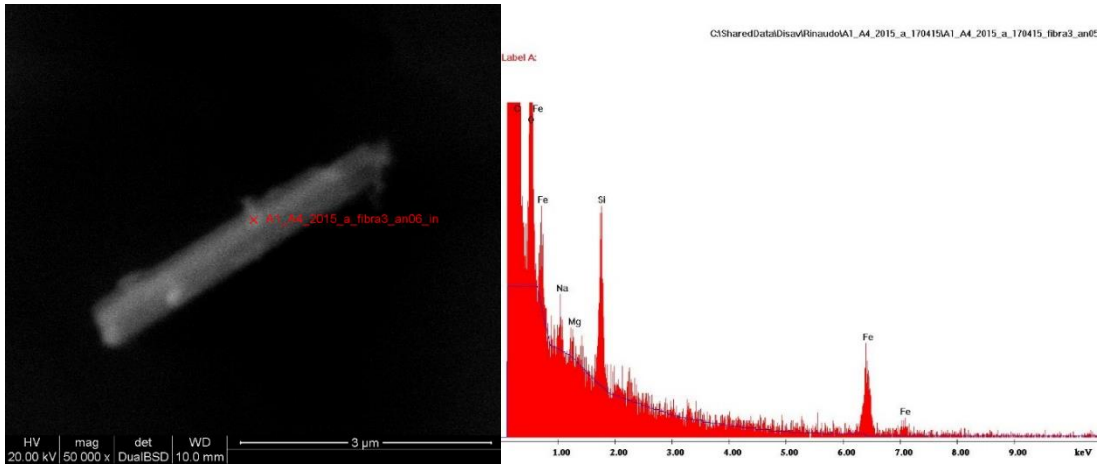


Figura 76: Sesto punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

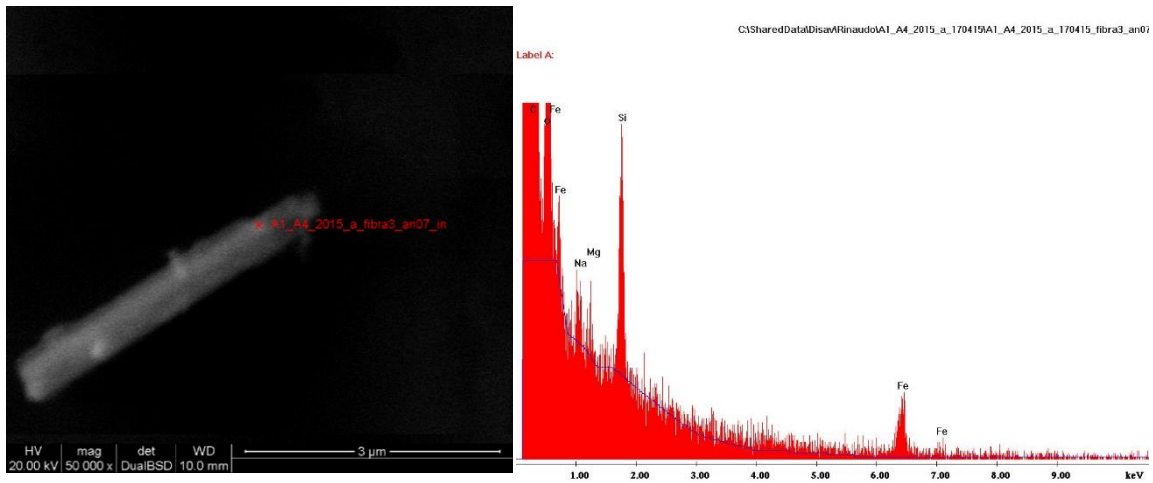


Figura 77: Settimo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

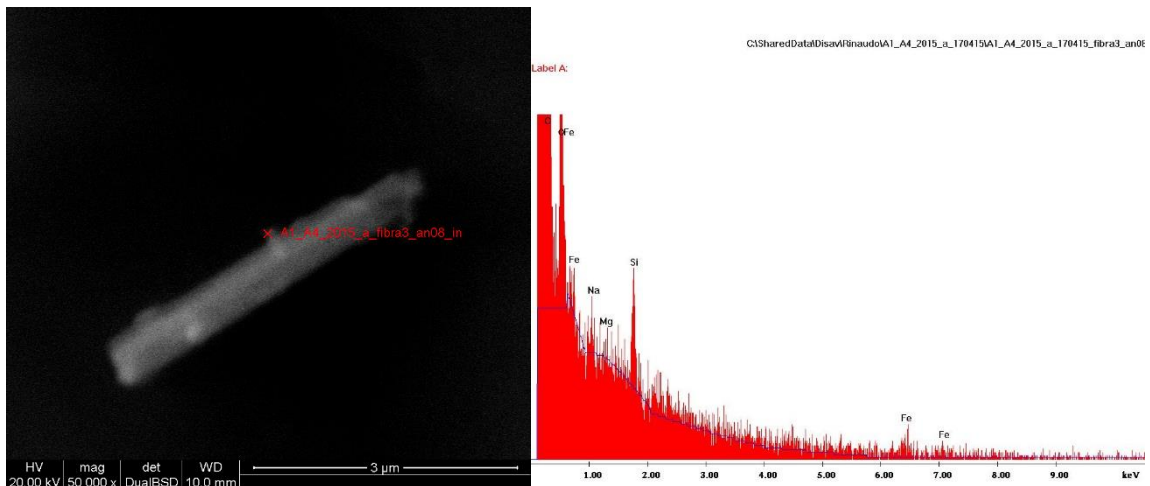


Figura 78: Ottavo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

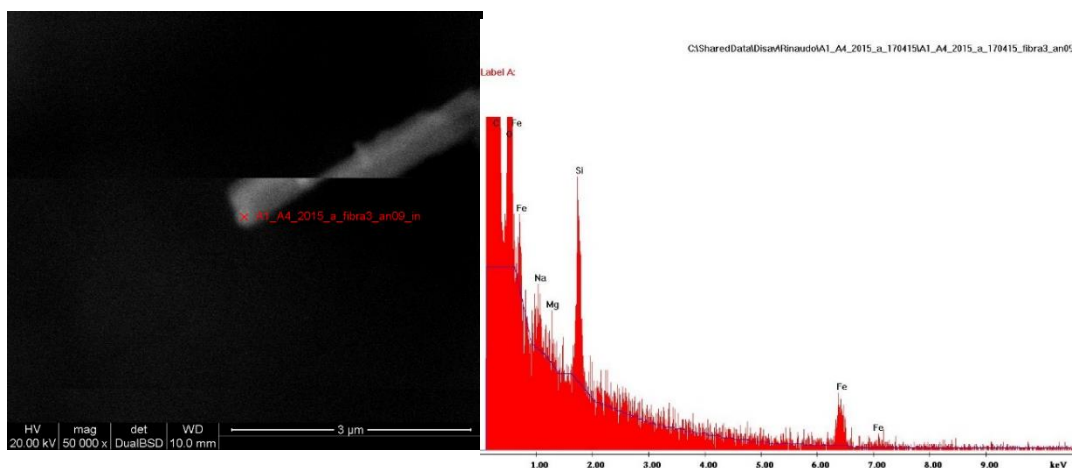


Figura 79: Nono punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

Analisi	C	O	Na	Mg	Si	Fe
Particella4_an01_in	92,24%	6,79%	0,21%	0,07%	0,40%	0,30%
Particella4_an02_in	91,20%	7,95%	0,10%	0,10%	0,39%	0,26%
Particella4_an03_in	92,09%	7,05%	0,12%	0,05%	0,40%	0,28%
Particella4_an04_in	92,41%	6,86%	0,15%	0,00%	0,34%	0,25%
Particella4_an05_in	89,55%	9,35%	0,16%	0,03%	0,41%	0,50%
Particella4_an06_in	88,75%	10,21%	0,19%	0,06%	0,46%	0,33%
Particella4_an07_in	90,16%	8,85%	0,18%	0,09%	0,42%	0,30%
Particella4_an08_in	93,37%	6,20%	0,11%	0,00%	0,21%	0,12%
Particella4_an09_in	91,33%	7,81%	0,17%	0,06%	0,37%	0,26%

Tabella 9: Composizione semi-quantitativa in percentuali atomiche relative al punto di analisi.

Dalle analisi riportate sopra, si può osservare che la particella risulta essere composta principalmente da silicio e in quantità decrescenti da ferro, sodio e magnesio. Confrontando gli spettri della particella incognita con gli spettri dei minerali standard presenti presso il gruppo di ricerca ed in bibliografia, la composizione chimica appare confrontabile con quella della crocidolite. Perciò, questa particella appare composizionalmente come minerale di amianto, tuttavia le caratteristiche dimensionali non permettono di conteggiarla come “fibra respirabile” e quindi la catalogheremo come “fibra non respirabile”.

7.4 CASO 4

Il caso 4 riguarda un campione di tessuto sano di stomaco. In questo caso, la particella osservata, riportata in figura 80, rappresenta due fibre ravvicinate non riconducibili ad amianto sia per la composizione chimica dell'analisi, riportata in seguito, sia per le dimensioni in quanto non rientrano nei parametri delle fibre respirabili di amianto. La lunghezza della prima fibra è di 4,19 μm , il diametro di 0,32 μm , con un rapporto lunghezza/diametro di 13. La lunghezza della seconda fibra è di 3,13 μm , il diametro di 0,48 μm , con un rapporto lunghezza/diametro di 6,5.

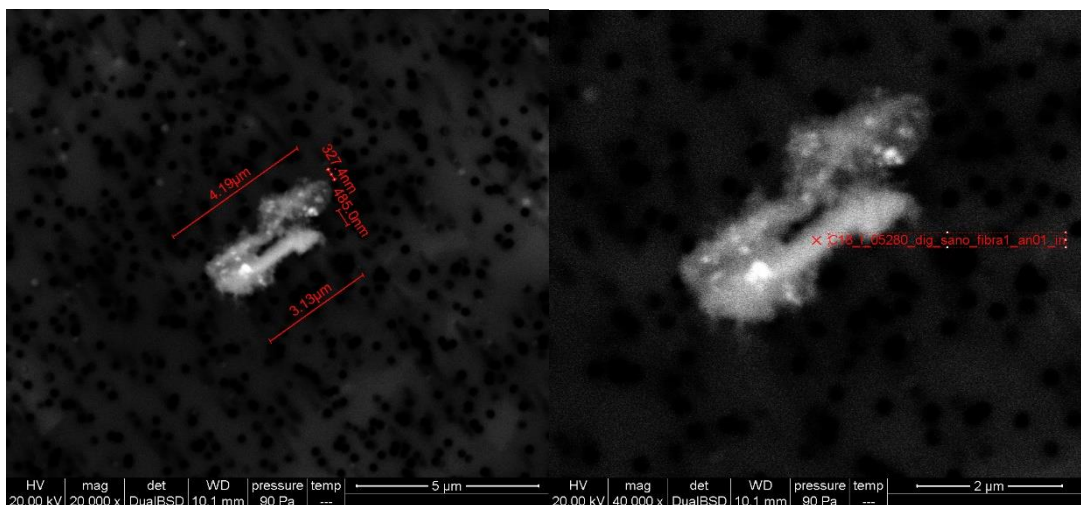


Figura 80: Punto analizzato della fibra e le corrispondenti misure.

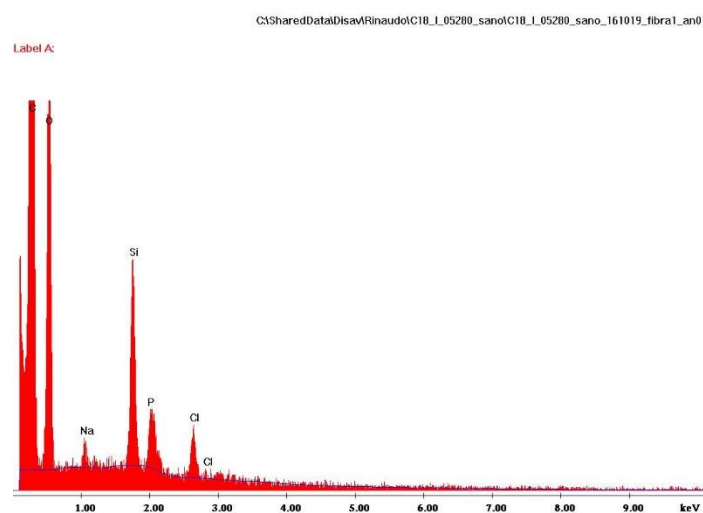


Figura 81: Spettro EDS non riconducibile ad amianto della fibra analizzata.

Analisi	C	O	Na	Si	P	Cl
Fibra4_an01_in	84,75%	13,95%	0,16%	0,73%	0,23%	0,18%

Tabella 10: Composizione semi-quantitativa in percentuali atomiche relative al punto di analisi.

Da un punto di vista chimico, l'aggregato composto dalle due fibre, non presenta gli elementi caratteristici degli amianti. Le percentuali atomiche riportate in tabella di Na e Cl sono riconducibili alla cristallizzazione del NaClO, depositatosi dopo la digestione chimica del tessuto per mezzo dell'ipoclorito di sodio. Pertanto, possiamo considerare l'aggregato una particella non amianto, in quanto non rientra né nei parametri della composizione chimica né in quelli delle caratteristiche dimensionali.

7.5 CASO 5

Sono state eseguite le analisi su un campione di colon di un paziente affetto da adenocarcinoma. La particella riscontrata, riportata in figura 82, può essere definita “fibra respirabile”, in quanto ha una lunghezza di 11,50 μm , un diametro di 1,20 μm e un rapporto lunghezza/diametro di 9,5. La particella è stata analizzata in diversi punti e di seguito ne vengono riportati i risultati.

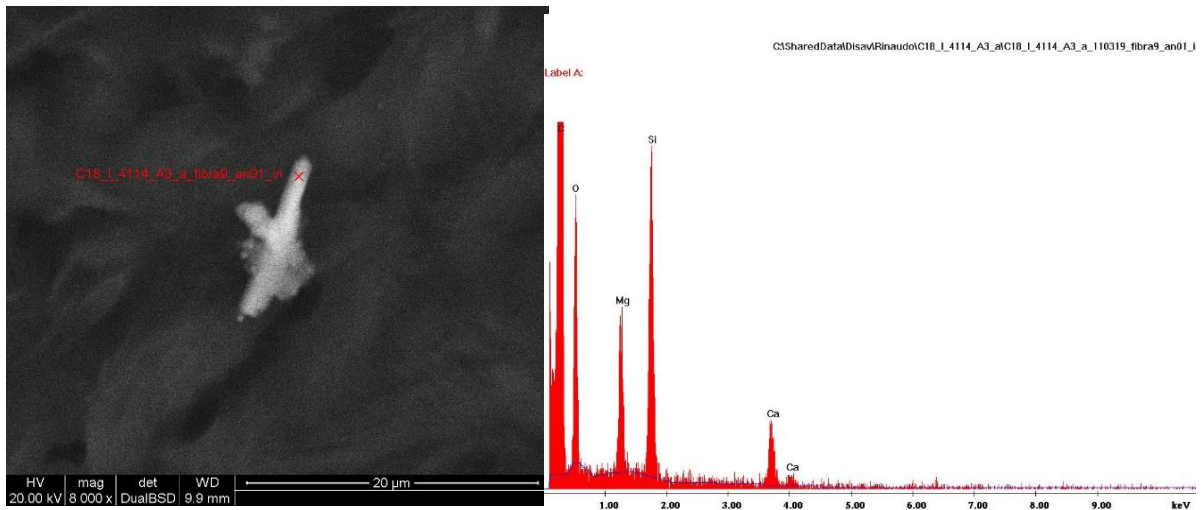


Figura 82: Primo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

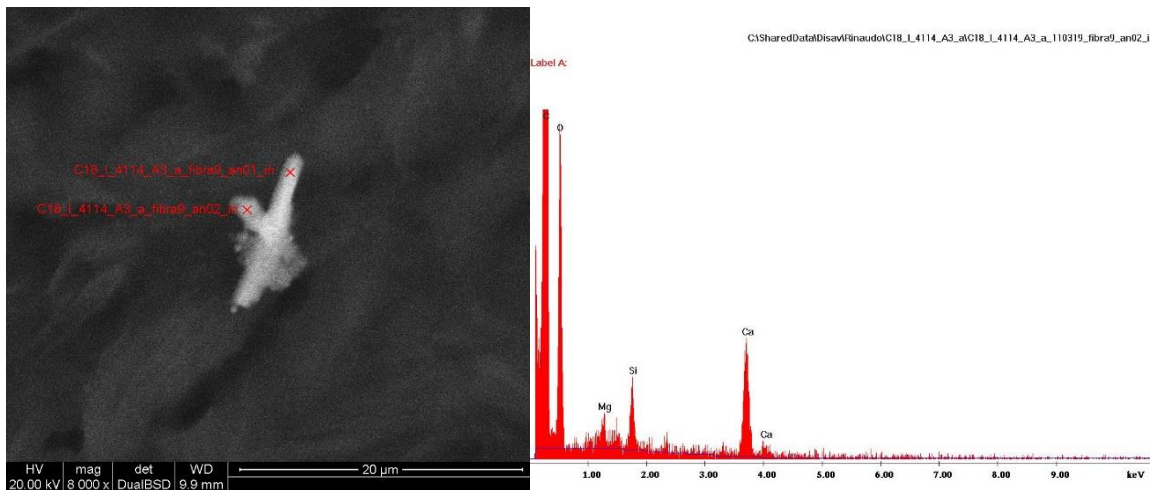


Figura 83: Secondo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

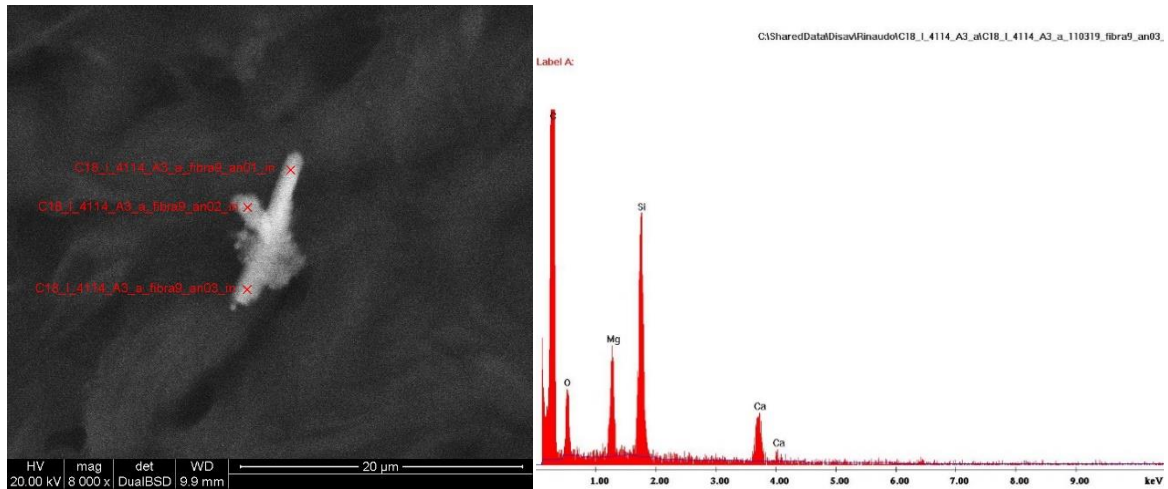


Figura 84: Terzo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

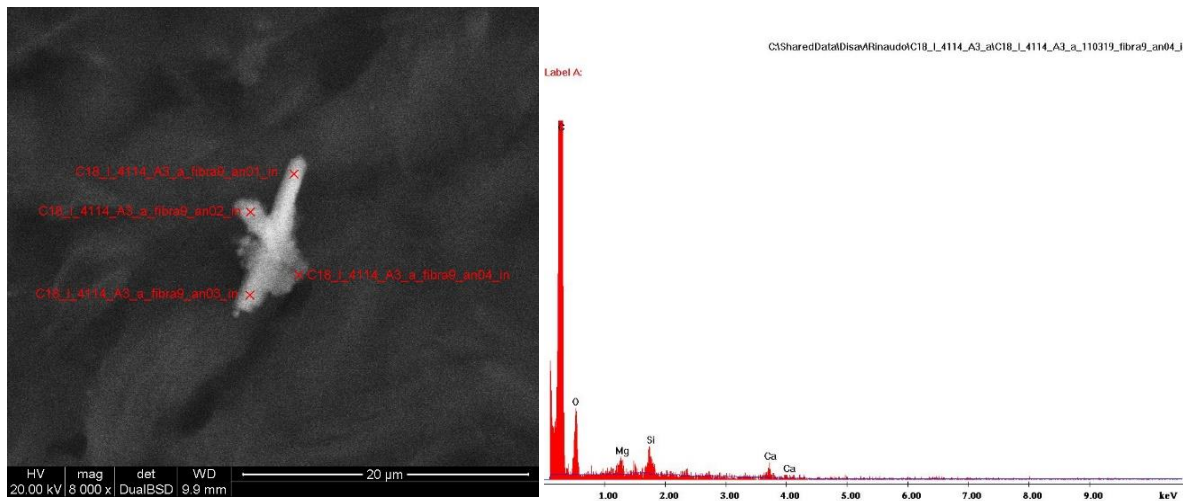


Figura 85: Quarto punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

Analisi	C	O	Mg	Si	Ca
Fibra4_an01_in	87,91%	9,65%	0,84%	1,27%	0,33%
Fibra4_an02_in	84,47%	14,26%	0,23%	0,31%	0,73%
Fibra4_an03_in	90,97%	5,65%	1,05%	1,82%	0,51%
Fibra4_an04_in	92,14%	7,26%	0,23%	0,24%	0,13%

Tabella 11: Composizione semi-quantitativa in percentuali atomiche relative al punto di analisi.

Dalle analisi sopra riportate, in particolar modo nell'analisi 2, si osserva come tale fibra sia composta da magnesio, silicio e calcio. La presenza del picco di calcio permette di attribuire questa particella alla tipica composizione chimica della tremolite. In questo caso, le dimensioni e la composizione chimica possono essere indizio di una fibra respirabile di amianto.

7.6 CASO 6

Anche nel caso 6 sono state eseguite le analisi su un tessuto sano di colon di un paziente affetto da adenocarcinoma. La particella riscontrata, riportata in figura 86, è un tipico “corpuscolo dell’asbesto”; in cui la fibra contenuta all’interno mostra una lunghezza di 25 μm , un diametro di 0,3 μm e un rapporto lunghezza/diametro di 83. L’immagine mostra anche le tipiche “perle” di ferroproteine globulari e tondeggianti intorno alla fase inorganica, che si formano quando il macrofago tenta di inglobare la fibra. (Rinaudo et al., 2021; Simoniello A., 2022).

Di seguito vengono riportati i punti di analisi collezionati in diversi punti del corpuscolo e la relativa tabella compositiva.

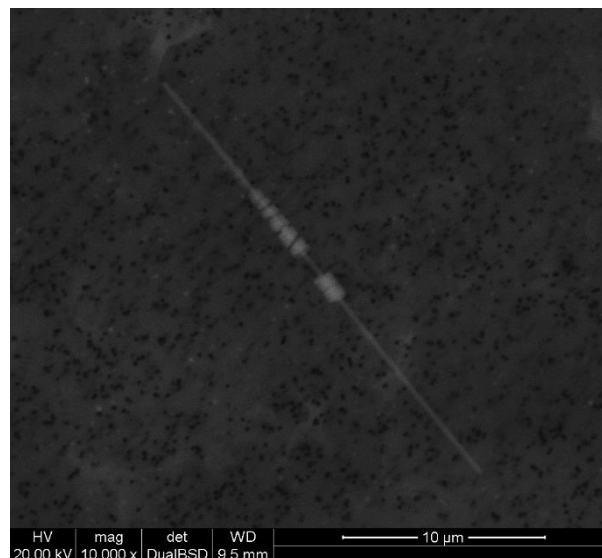


Figura 86: Fibra di amianto con corpuscoli. (Rinaudo et al., 2021; Simoniello A., 2022)

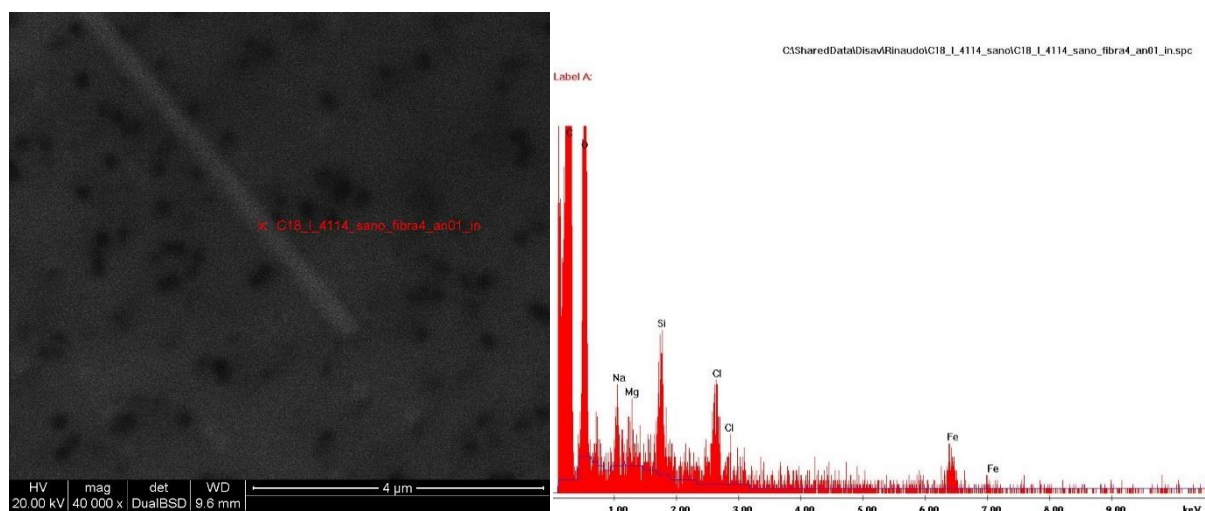


Figura 87: Primo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

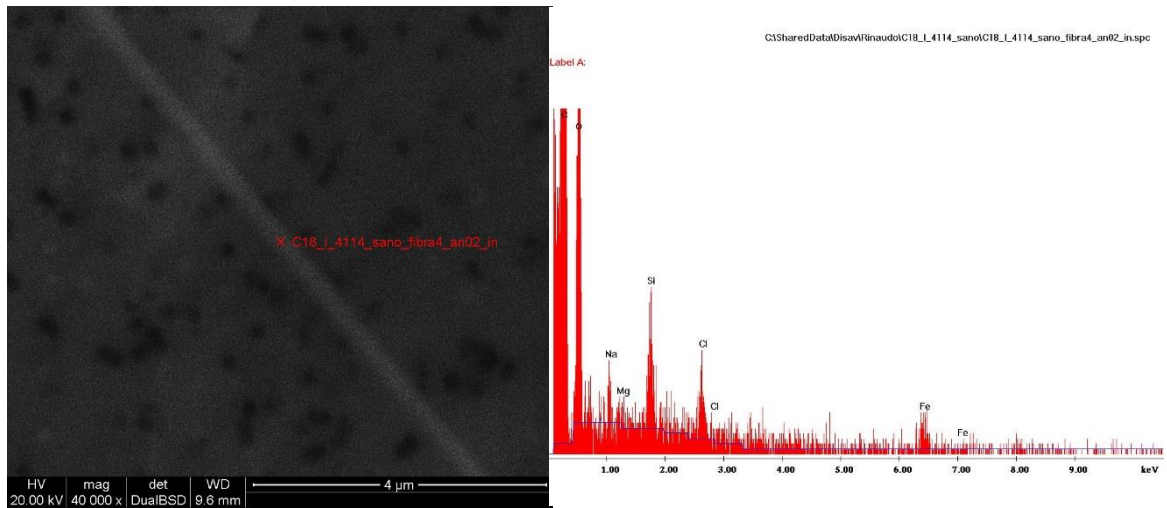


Figura 88: Secondo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

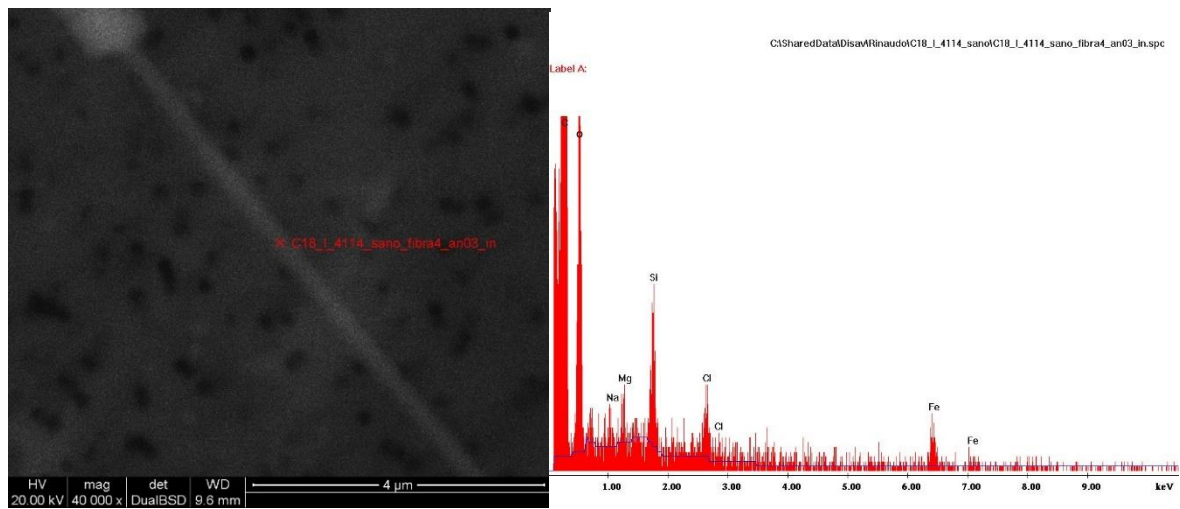


Figura 89: Terzo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

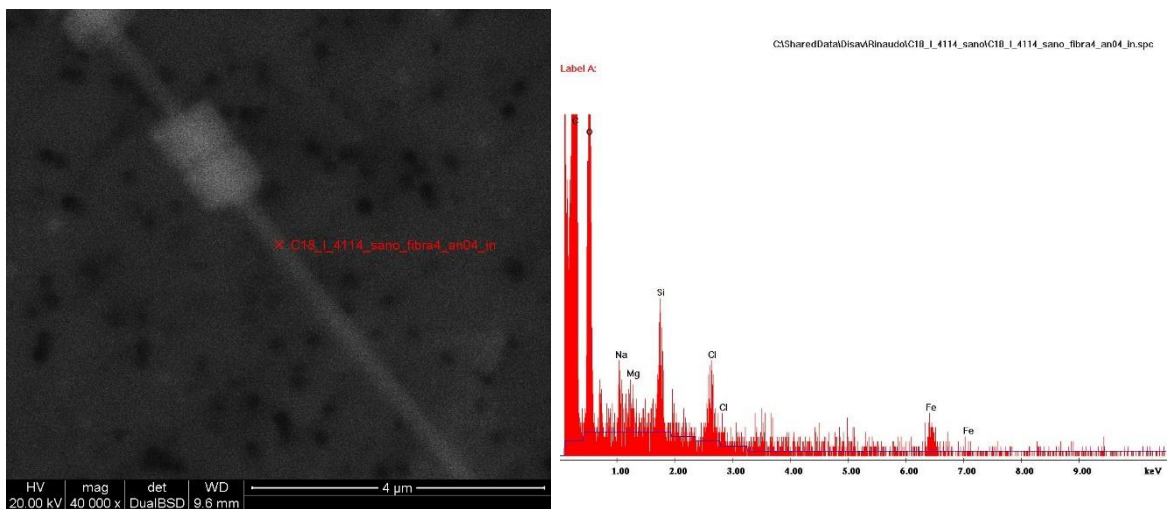


Figura 90: Quarto punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

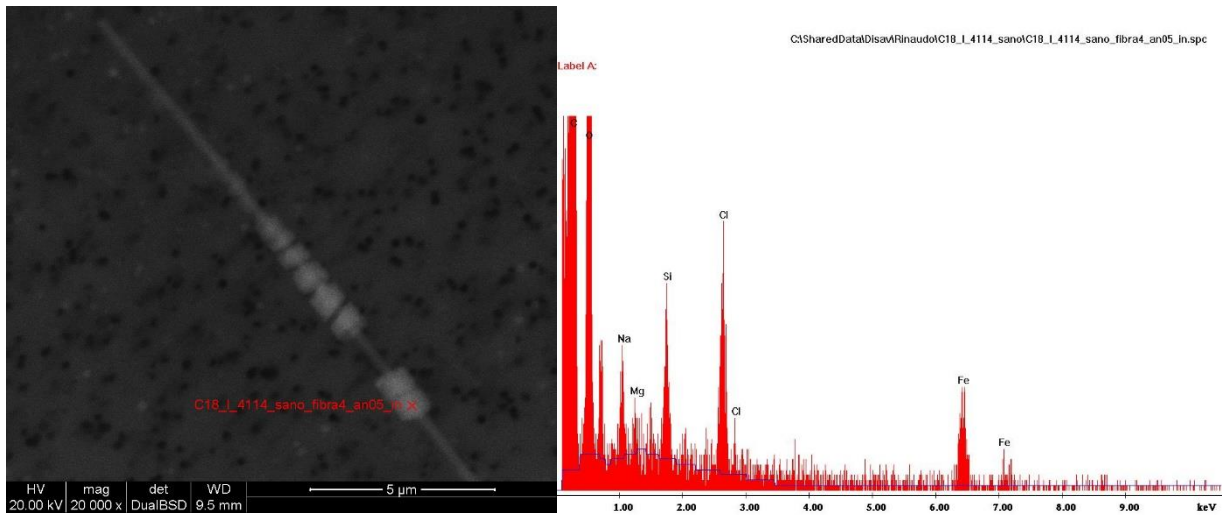


Figura 91: Quinto punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

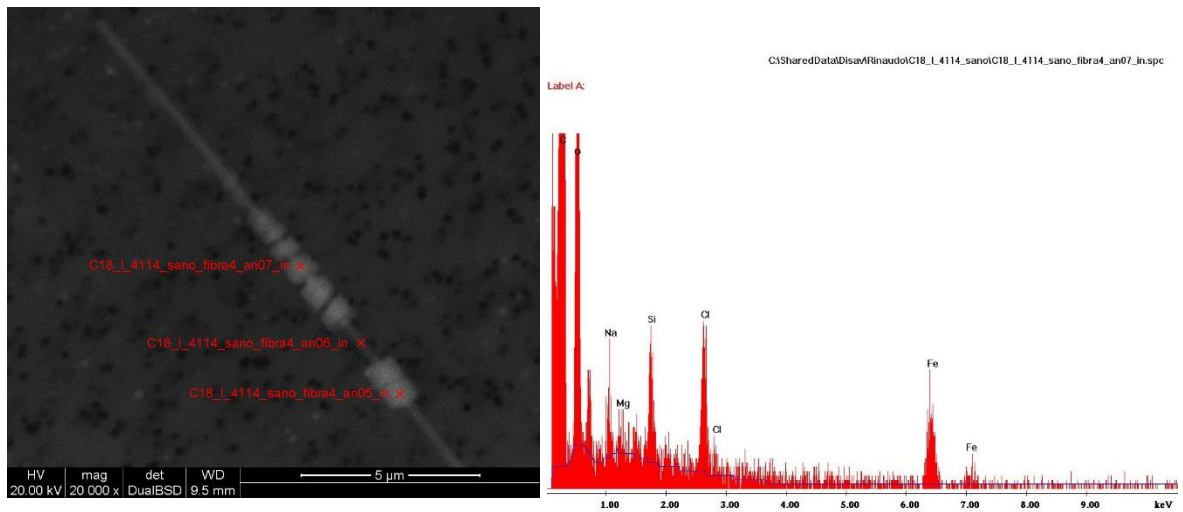


Figura 92: Sesto punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

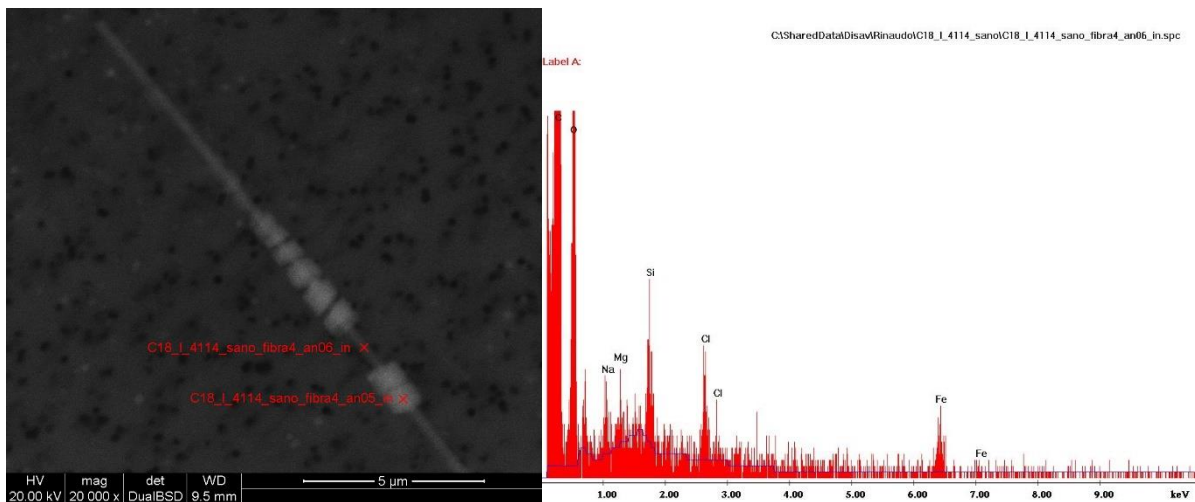


Figura 93: Settimo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

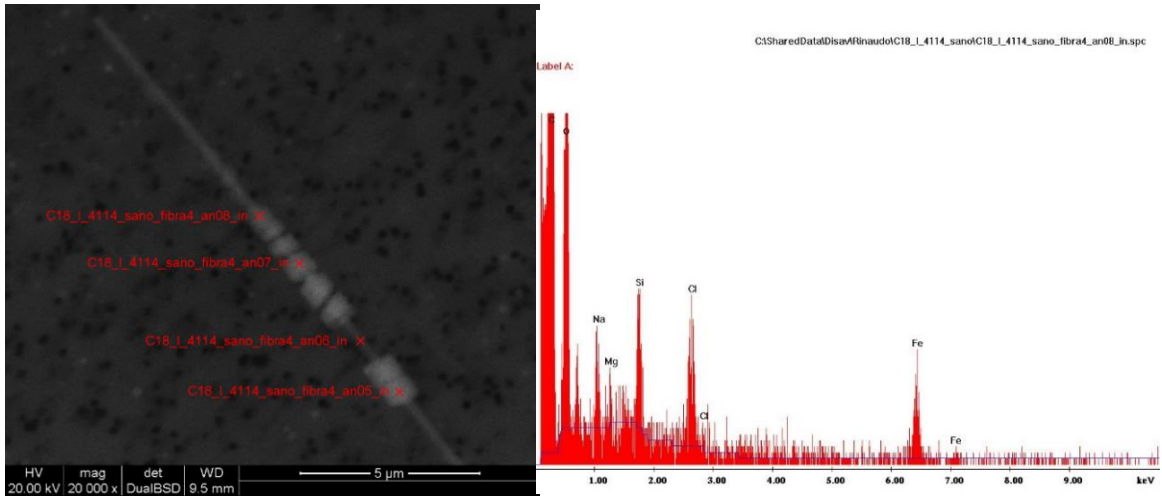


Figura 94: Ottavo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

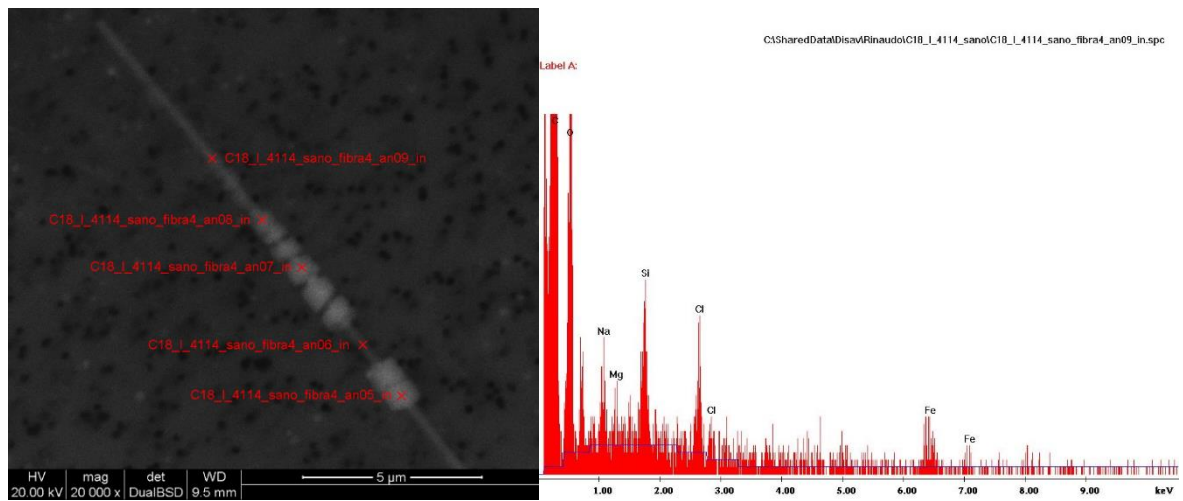


Figura 95: Nono punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

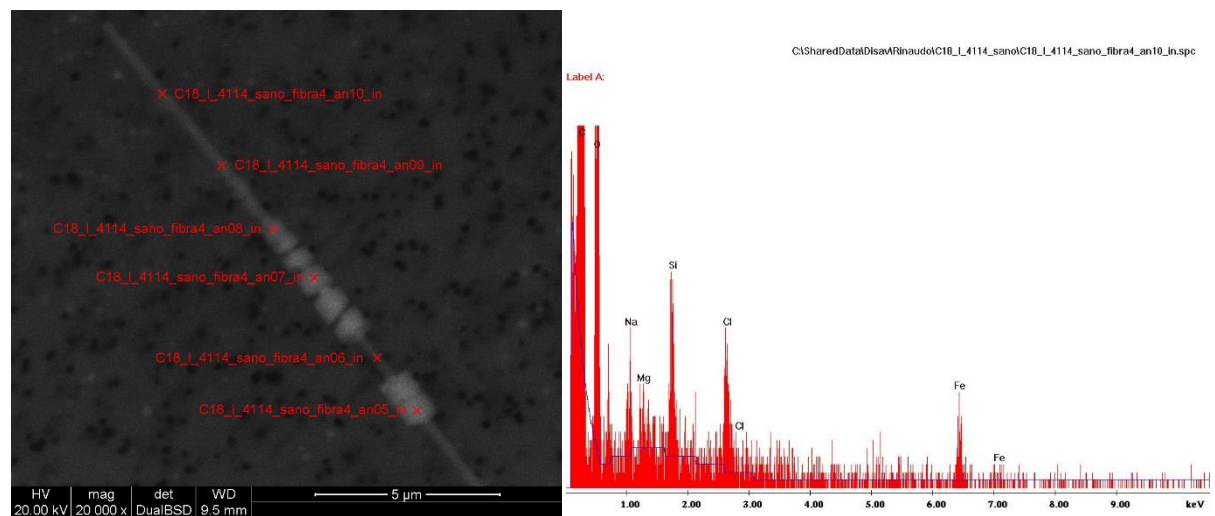


Figura 96: Decimo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

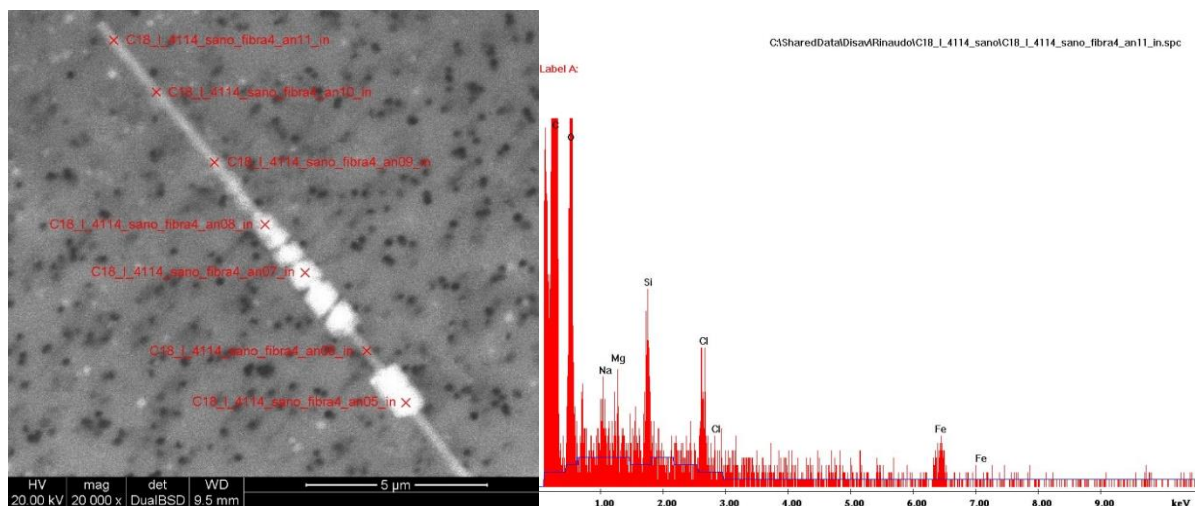


Figura 97: Undicesimo punto analizzato della fibra e il relativo spettro EDS.

Analisi	C	O	Na	Mg	Si	Cl	Fe
Fibra4_an01_in	87,26%	11,48%	0,28%	0,13%	0,34%	0,26%	0,25%
Fibra4_an02_in	87,85%	11,13%	0,20%	0,07%	0,33%	0,17%	0,23%
Fibra4_an03_in	88,90%	9,99%	0,16%	0,15%	0,38%	0,16%	0,26%
Fibra4_an04_in	87,62%	11,28%	0,28%	0,14%	0,30%	0,20%	0,19%
Fibra4_an05_in	85,41%	12,90%	0,37%	0,11%	0,30%	0,43%	0,48%
Fibra4_an06_in	88,57%	10,25%	0,26%	0,14%	0,29%	0,21%	0,29%
Fibra4_an07_in	86,92%	11,47%	0,31%	0,09%	0,29%	0,37%	0,55%
Fibra4_an08_in	85,86%	12,54%	0,39%	0,11%	0,33%	0,32%	0,45%
Fibra4_an09_in	87,43%	11,34%	0,33%	0,09%	0,35%	0,23%	0,23%
Fibra4_an10_in	87,20%	11,23%	0,38%	0,16%	0,40%	0,32%	0,31%
Fibra4_an11_in	87,76%	10,95%	0,25%	0,17%	0,36%	0,27%	0,24%

Tabella 12: Composizione semi-quantitativa in percentuali atomiche relative al punto di analisi.

Negli spettri EDS, precedentemente riportati, si possono osservare i picchi di silicio, ferro e magnesio, in ordine decrescente, prodotti dalla fibra stessa, mentre i picchi di sodio e cloro sono gli unici ioni rilevati, derivanti dalla cristallizzazione di NaClO durante il processo di digestione. Il picco maggiore, presente nelle analisi, è il ferro, risultato coerente con il fatto che la fibra è rivestita da ferropoteine. Il corpuscolo presente nelle immagini del SEM è il classico marker di esposizione all'amianto e tramite le sostanze chimiche rilevate possiamo

definire la fase minerale della fibra, riconducibile all'amosite. La fibra mostra sia a livello compositivo, sia a livello dimensionale le caratteristiche "per eccellenza" delle fibre d'amianto considerate "respirabili"; pertanto, possiamo affermare che si tratta di amianto.

Di seguito, in tabella 13, vengono riportati i dati degli ultimi 10 anni ottenuti su casi presentati precedentemente e su altri campioni relativi a tumori extraripiratori, suddivisi per organo. Nella tabella vengono riportati i dati relativi al numero totale di fibre riscontrate. Sono state conteggiate in questa fase del lavoro soltanto le morfologie allungate che presentassero composizione chimica riconducibile a fasi di asbesto. Infatti, come evidenziato in tesi precedenti (Merati I., 2021), spesse volte sono state osservate anche fibre con composizione chimica differente, come ad esempio fasi inorganiche di titanio o di ferro. A partire da questo valore, si sono poi distinte, mediante misurazione dei parametri di lunghezza, diametro ed *aspect ratio*, le fibre in "fibre respirabili di amianto" e "fibre non respirabili di amianto". Le fibre non respirabili non indicano il fatto che le fibre non vengono respirate, bensì, che non rispecchiano le caratteristiche dimensionali per definirle "fibre amianto". Infine, nell'ultima colonna, vengono riportate le fasi inorganiche che mostravano una composizione chimica riconducibile ad una delle fasi minerali classificate come "amianto", ma che non presentavano il rapporto lunghezza/ diametro >3.

NOME	PARTICELLE ALLUNGATE CON COMPOSIZIONE CHIMICA AMIANTO TOTALI	FIBRE RESPIRABILI DI AMIANTO	FIBRE CON ASPECT RATIO > 3, MA CON L < 5 µm E/O d > 3 µm	PARTICELLE CON COMPOSIZIONE CHIMICA AMIANTO
Fegato 1	4	1	3	2
Fegato 2	1	1	-	1
Fegato 3	1	-	-	4
Fegato 4	2	-	1	4
Fegato 5	-	-	-	2
Fegato 6	2	-	1	-
Fegato 7	3	-	2	3
Fegato 8	2	-	1	-
Fegato 9	7	7	-	4
Fegato 10	2	-	2	3

Colecisti 1	3	2	1	10
Colecisti 2	-	-	-	6
Colecisti 3	-	-	-	7
Colecisti 4	2	1	1	3
Colecisti 5	1	-	1	4
Colecisti 6	-	-	-	2
Colecisti 7	1	-	1	-
Colecisti 8	5	1	3	5
Colecisti 9	6	2	4	3
Colecisti 10	9	4	5	3
Stomaco 1	6	3	3	6
Stomaco 2	2	-	-	-
Stomaco 3	-	-	-	3
Stomaco 4	-	-	-	1
Stomaco 5	2	2	-	-
Colon 1	9	7	2	1
Colon 2	5	1	3	-
Colon 3	2	2	-	-
Colon 4	7 (di cui 1 corpuscolo)	3 (di cui un corpuscolo)	2	-
Colon 5	3	2	1	-
Colon 6	5	5	-	-
Colon 7	2	2	-	-
Colon 8	4	2	2	1
Colon 9	2	2	-	-
Colon 10	4	2	2	-

Tabella 13: Vengono riportate le fibre e le particelle con composizione chimica amianto, riscontrate negli ultimi 10 anni.

Di tutti i casi analizzati nei 10 anni, solo alcuni sono stati trattati in questo elaborato, precisamente sono stati presi in considerazione 35 campioni di cui:

- 10 campioni di tessuto del colon;
- 10 campioni di tessuto della colecisti;
- 10 campioni di tessuto del fegato;

- 5 campioni di tessuto dello stomaco.

Dei 35 casi riportati in tabella 13, sono stati estrapolati i 6 casi descritti precedentemente. Dai dati collezionati nel tempo, appare che le fibre respirabili sono state riscontrate principalmente nel colon e nella colecisti, con maggior incidenza nel colon, mentre le particelle hanno maggior incidenza in colecisti, stomaco e fegato. Inoltre, un numero significativo di fibre con aspect ratio > 3 , ma con $L < 5 \mu\text{m}$ e/o $d > 3 \mu\text{m}$ (non classificate come fibre respirabili dalla legislazione, D.L.gs. 277 del 1991) sono state osservate nel colon, colecisti e fegato. La presenza delle particelle può indicare il fatto che la contaminazione può essere avvenuta per l'ingestione di materiale inquinato tramite il cavo orale, e pertanto, le sostanze non coincidono con le dimensioni delle fibre respirabili che raggiungono gli alveoli, bensì con particelle ingeribili, di dimensioni maggiori. (Vedere allegato N3).

8 CONCLUSIONI

L'asbestosi, di cui abbiamo parlato nei capitoli precedenti, viene considerata dall'INAIL di origine professionale perché è causata da esposizioni elevate a polveri e fibre di asbesto; altri tumori asbesto associati come il tumore al polmone, il mesotelioma, il cancro alla laringe, all'ovaio e al testicolo sono stati inseriti nella lista I dall'INAIL, (ovvero patologie causate da esposizione professionale all'amianto con alta probabilità). Sono state create anche le liste II e III: nella lista II sono state inserite le patologie correlate all'amianto che hanno una limitata probabilità di insorgenza per ragioni professionali, mentre nella lista III sono state inserite le malattie da amianto che hanno una possibile causa nell'esposizione (<https://vittime-del-dovere.it>).

PATOLOGIE	LISTA
Asbestosi polmonare	Origine professionale
Mesotelioma pleurico	Lista I
Tumore del polmone	Lista I
Mesotelioma della tunica vaginale del testicolo	Lista I
Tumore della laringe	Lista I
Cancro alle ovaie	Lista I
Tumore della faringe	Lista II
Cancro dello stomaco	Lista II
Tumore del colon-retto	Lista II
Tumore dell'esofago	Lista III
Tumore della trachea	Lista III

Tabella 13: Patologie asbesto correlate e le liste di associazione secondo l'INAIL.

Le fibre di amianto possono essere ingerite per via orale, ma la via principale è quella inalatoria attraverso l'aria inquinata da questi minerali. Una volta che la polvere viene inalata, una parte non giunge neanche ai polmoni perché viene eliminata attraverso la tosse; le fibre che entrano nel polmone vengono attaccate dalla seconda linea di difesa dell'organismo umano, quella dei macrofagi alveolari. I macrofagi avvolgono le fibre nel processo di fagocitosi, e anche qui una ulteriore parte, frammista al muco prodotto dalle ghiandole bronchiali, viene eliminata attraverso la clearance muco-ciliare. Le fibre che non vengono eliminate dai polmoni rimangono nel contesto del parenchima, libere o rivestite da materiale ferro proteico per opera dei macrofagi (i classici corpuscoli dell'asbesto).

Rimanendo libere possono entrare nell'interstizio polmonare o a livello pleurico in sede subpleurica ed essere traslocate nel fluido linfatico e da lì in tutte le parti del corpo.

Il sistema linfatico svolge un ruolo importante nella risposta immunitaria all'amianto, poiché le cellule immunitarie si muovono attraverso i vasi linfatici, maturano e lì si attivano. Alcune particelle sono altamente reattive e tossiche per le cellule macrofagiche; inoltre possono verificarsi delle condizioni di "sovraccarico" laddove il numero di particelle inalate supera la capacità dei macrofagi alveolari di eliminare le fibre dagli alveoli. Inoltre, i macrofagi potrebbero non essere in grado di fagocitare particelle più grandi negli alveoli e questo provoca una "fagocitosi frustrata" (DeStefano et al., 2017).

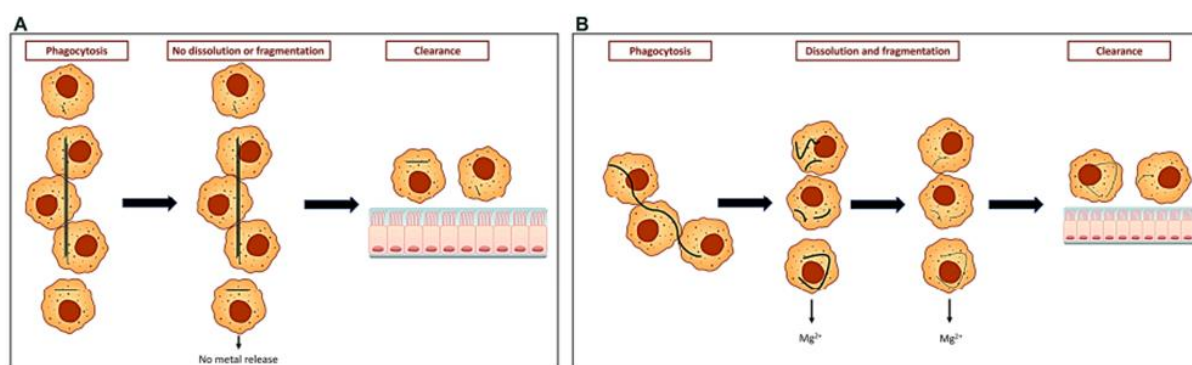


Figura 97: Eliminazione dell'amianto dal tratto respiratorio inferiore. L'esposizione a fibre di anfibolo più lunghe può provocare una "fagocitosi frustrata" e di conseguenza il fallimento delle vie di eliminazione, mentre le fibre più corte e i frammenti possono essere fagocitati con successo e rimossi attraverso la via mucociliare. Con la via fagosomiale non si verifica degradazione dell'anfibolo con rilascio di metalli (A). Al contrario, le fibre di crisotilo essendo più lunghe vengono fagocitate e lo strato di brucite viene distrutto in ambiente acido con rilascio di costituenti metallici (ad esempio magnesio). Ciò si traduce in frammenti che possono essere eliminati dalla parte inferiore tratto respiratorio attraverso la via di clearance mucociliare (B) (Ghio et al., 2023).

Inoltre, la superficie dell'amianto può acquisire ferro; le concentrazioni di ferro mitocondriale diminuiscono dopo l'esposizione delle cellule respiratorie all'amianto poiché la superficie sequestra questo metallo ospite. I mitocondri sono particolarmente vulnerabili in quanto dimostrano una dipendenza significativa dalla disponibilità del ferro (ad esempio, per il ciclo di Krebs e per il sistema di trasporto degli elettroni) e, di conseguenza, i gruppi funzionali sulla superficie della fibra competono per il ferro utilizzato dalla cellula ospite in funzioni critiche per la sopravvivenza. In seguito alla carenza funzionale di ferro segue l'infiammazione dell'ospite con il rilascio di mediatori dell'infiammazione. La carenza di ferro

dovuta all'esposizione delle fibre attivano chinasi e fattori di trascrizione, e molti di questi fattori controllano anche la morte cellulare; infatti, qualora i sistemi compensativi atti a ripristinare il livello di ferro non dovessero bastare, la cellula andrebbe incontro ad apoptosi (Ghio et al., 2023).

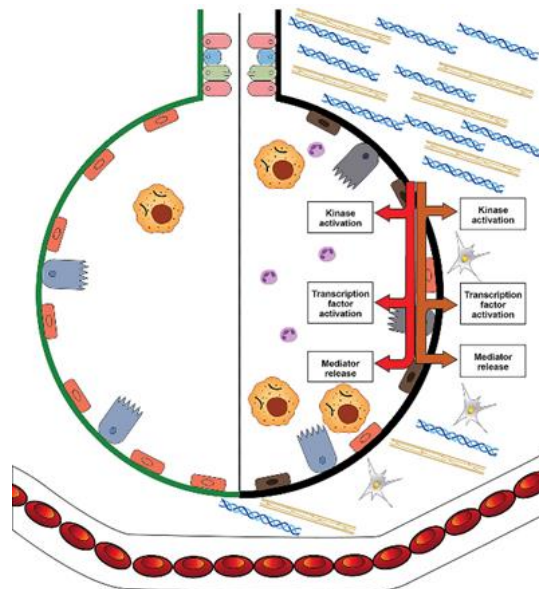


FIGURA 98: Gli effetti biologici dell'amianto e del ferro. La ridotta disponibilità di ferro influisce sulla chinasi e attivazione dei fattori di trascrizione, che coordinano il rilascio di mediatori rilevanti per l'infiammazione e risposte fibrotiche. Corrisponde un afflusso di cellule infiammatorie (ad esempio, macrofagi e neutrofilii) con la diminuzione della disponibilità di metallo. C'è anche un aumento del numero di fibroblasti e una deposizione di collagene (rappresentato da unità elicoidali blu), elastina (rappresentata da unità gialle) e sostanze polimeriche-extracellulari, che corrispondono alla carenza funzionale di ferro (Ghio et al., 2023)

Uno studio (DeStefano et al., 2017) presenta uno schema a blocchi che separa la traslocazione delle fibre negli spazi pleurici e nei vasi linfatici. Viene utilizzata una notazione standard per lo studio:

- X descrive la condizione locale della particella: Libera (F), All'interno di un macrofago (MI), incorporato all'interno di una cellula del tessuto umano (H), depositato o adsorbito nel tessuto (L).
- Y descrive la posizione delle particelle nel corpo: polmoni (L), linfatico (Y), cavità pleurica (P), mesotelio (M), Sangue (B), Tessuti molli (S).

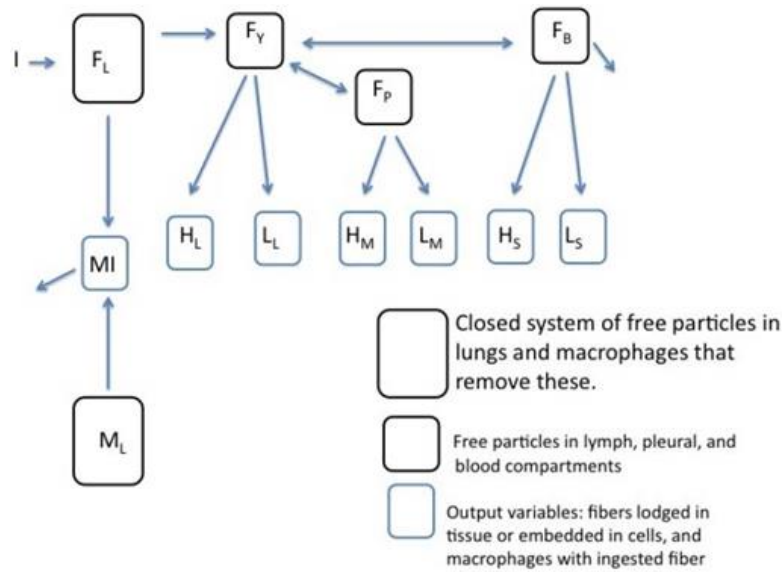


Figura 99 : Modello a scompartimento (DeStefano et al., 2017).

Le particelle libere nei polmoni (FL) entrano ad una certa velocità e da lì passano nel sistema linfatico o vengono rimosse dai macrofagi a una velocità GLM non lineare.

$$F_L = I - pLYFL - GLM.$$

I macrofagi arrivano ai polmoni a una velocità costante c_1 e ingeriscono una fibra in modo non lineare (GLM) o vengono liquidati naturalmente.

$$M_L = c_1 - GLM + GI - c_2ML.$$

Quelle particelle libere che vengono traslocate nel sistema linfatico non ritorneranno ai polmoni ma circoleranno in tutto il corpo (DeStefano et al., 2017).

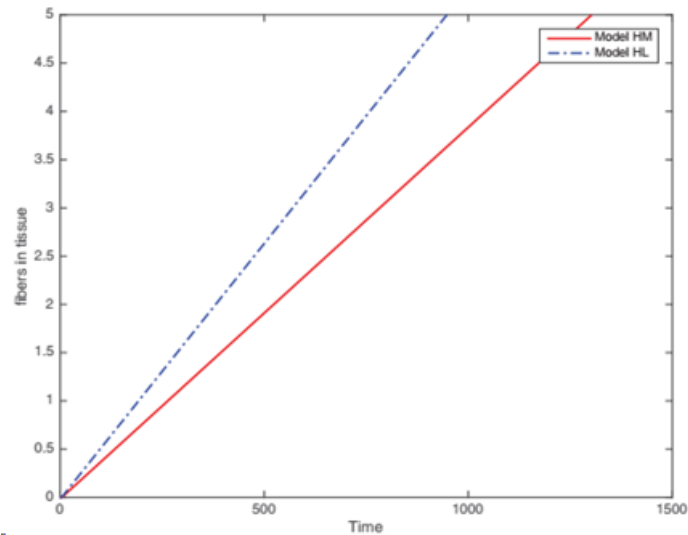


Figura 100: Accumulo di fibre nel tessuto umano per i polmoni rispetto al mesotelio. HM rappresenta il numero di fibre incorporate all'interno di una cellula del tessuto umano nel mesotelio al tempo t e HL rappresenta il numero di fibre incorporate all'interno di una cellula del tessuto umano nei polmoni al tempo t . Il grafico mostra che entrambe le quantità crescono linearmente con $HL > HM$ nel tempo (DeStefano et al., 2017).

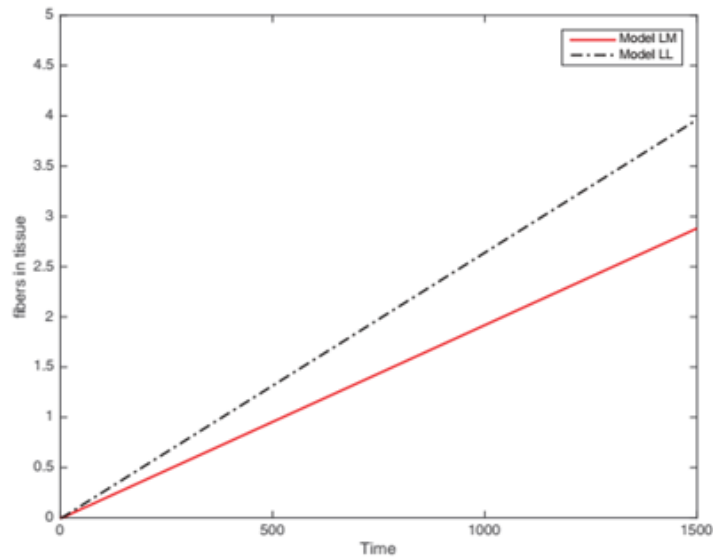


Figura 101: Accumulo di fibre alloggiato nel tempo per i polmoni rispetto al mesotelio. LM rappresenta il numero di fibre alloggiato tra le cellule o nel tessuto del mesotelio al tempo t , e LL rappresenta il numero di fibre alloggiato tra le cellule o nel tessuto polmonare al tempo t . Il grafico mostra che entrambe le quantità crescono linearmente con $LL > LM$ nel tempo (DeStefano et al., 2017).

Questo meccanismo è di fondamentale importanza perché una volta che le fibre di amianto raggiungono organi diversi del corpo possono effettuare il loro effetto cancerogeno ed indurre una neoplasia.

Il primo postulato di Cock per il nesso casuale tra neoplasia e agente eziologico è l'identificazione dell'agente nell'organo in cui è insorta la neoplasia (www.quadernodiepidemiologia.it). In questo caso diventa vitale trovare una tecnica con una alta sensibilità e specificità per l'identificazione dell'amianto nei tessuti.

L'obiettivo di questo lavoro è stato, infatti, quello di verificare con il microscopio ottico e con il microscopio elettronico a scansione (SEM) con annessa microsonda per l'analisi chimica (EDS) la presenza di fasi minerali riconducibili all'amianto in campioni di pazienti affetti da tumore nell'apparato gastrointestinale, residenti nel SIN di Casale Monferrato, Alessandria. Dalle analisi dei tessuti riguardanti tutti i casi considerati in questo studio e dai dati acquisiti in termini di composizione atomica % di ciascuna fase, effettuate tramite il SEM, è stato possibile confermare la presenza di diverse fasi minerali inorganiche. Tra queste sono state osservate sia particelle di composizione assolutamente non riconducibile a fasi di amianto, sia fasi fibrose allungate presentanti la composizione tipica degli "amianti".

Sono state identificate alcune particelle, che non potevano essere definite fibre respirabili, ma la loro composizione chimica era comunque riconducibile a spettri tipici dell'amianto con picchi di Mg, Fe, Al, Si. Pertanto, queste particelle sono state definite "non fibre amianto". Altre fasi allungate invece sono state definite "fibre" sia per le caratteristiche dimensionali, sia per le caratteristiche composizionali, come nel Caso N°2 e nel Caso N°6. In particolar modo, nel Caso N°6, si può osservare un tipico corpuscolo dell'asbesto, formati da una sostanza proteica e ferritina e dalla fibra di amianto stessa.

Diversi studi sperimentali ed epidemiologici indicano che il rischio di tumori dell'apparato digerente derivante dall'esposizione all'amianto può essere originato attraverso diverse vie, compresa l'ingestione, ed è possibile anche nel caso di ingestione quotidiana e prolungata di acqua potabile contaminata da una quantità ancora indeterminata di fibre di amianto. Studi definitivi mirati all'identificazione di un rischio soglia nelle coorti non professionali mancano, finora, principalmente a causa dei limiti metodologici derivanti:

- dal lungo periodo di latenza;
- dalla coesistenza di altri fattori di rischio;
- dalle variabili fisiologiche (età, sesso);

- dall'assenza di un monitoraggio geografico adeguato;
- dalle difficoltà nel valutare l'inizio dell'esposizione dell'individuo, che potrebbe iniziare anche durante la vita fetale.

Tuttavia, i dati disponibili necessitano certamente di essere ampliati con ulteriori ricerche in termini sia di modelli animali che di studi epidemiologici, al fine di raggiungere risultati conclusivi finalizzati alla conferma o alla smentita di correlazione delle esposizioni all'amianto e insorgenza di patologie a livello di diversi organi gastrointestinali, a spiegare meglio i meccanismi di traslocazione dell'amianto dal tratto gastrointestinale al fegato e alle vie biliari (Di Ciaula A., 2017).

Dai dati della mia ricerca vengono confermati i risultati delle ricerche a livello internazionale/nazionale circa la migrazione delle fibre di amianto dalle vie respiratorie all'interno dell'apparato gastro-intestinale e del sistema epatobiliare. Sulla base dei dati ottenuti si può dedurre che le fibre di amianto possono giungere anche in altri organi, oltre al polmone, vedasi il caso di tumore del fegato e di tumore del colon. Esse possono migrare dal tessuto polmonare mediante la via transdiaframmatica per quanto riguarda il tumore al fegato oppure dal polmone o direttamente da cibi o acqua inquinata per il carcinoma del colon. I dati ottenuti quindi ottemperano al primo principio per la definizione del nesso causale, non potendosi pertanto escludere l'ipotesi che il rischio del cancro gastrointestinale possa derivare dall'ingestione delle fibre di amianto. Esiste in letteratura, infatti, una comprovata relazione diretta tra l'ingestione delle fibre, la loro deposizione e l'aumento del rischio di sviluppo della patologia. Pertanto, l'identificazione delle fibre di amianto nei campioni analizzati si configura come risultato positivo. Sarebbe opportuno in futuro, per la ricerca, estendere il numero di campioni al fine di ottenere dati statisticamente rilevanti.

9 ALLEGATO 1: Microscopia ottica, Ematossilina-Eosina

❖ ID12

Sezione di valvola ileo-cecale; è possibile notare nel campione il passaggio dalla porzione sana a quella malata. Dalle analisi in luce diretta non sono emerse strutture minerali ad abito fibroso. Con l'utilizzo della luce polarizzata si può osservare la birifrangenza del collagene (luce grigia) e polvere da inquinamento dei vetri utilizzati per l'allestimento del vetrino. Non si sono osservate particelle minerali birifrangenti.

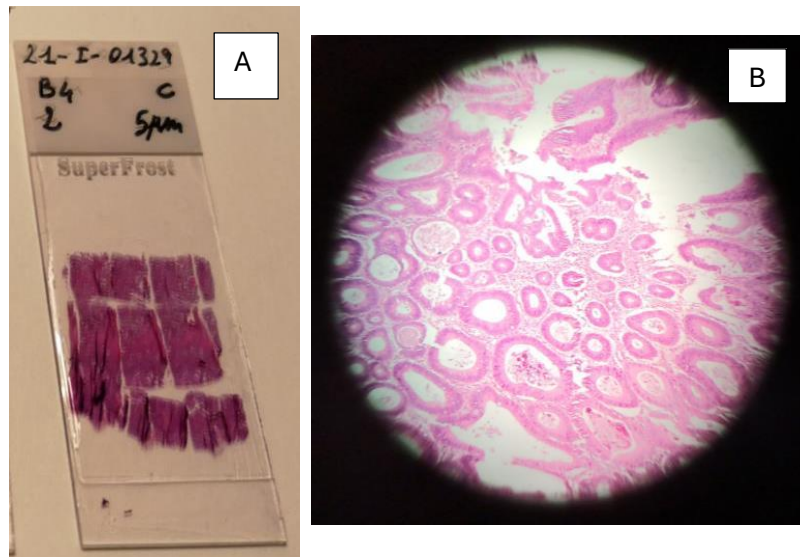


Figura 102: Nella figura 102 A si osserva la sezione colorata in ematossilina eosina. Nella figura 102 B osservazione della sezione istologica al microscopio ottico a luce diretta, ad un ingrandimento di 5X. Si osserva il punto di passaggio fra mucosa colica e neoplasia.

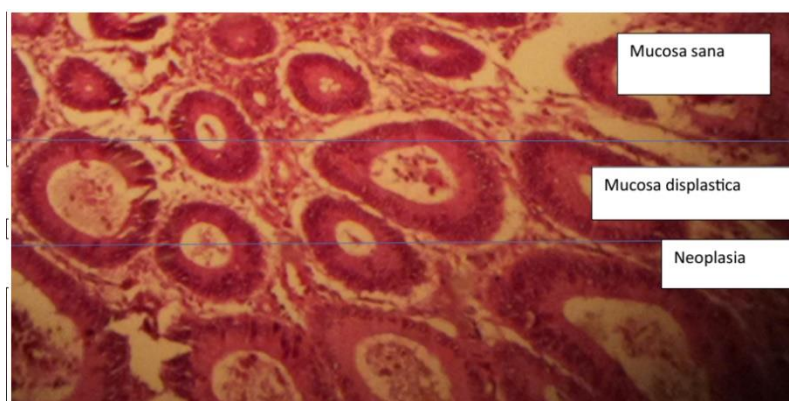


Figura 103: Stessa immagine della figura 103 B ma ad un ingrandimento maggiore di 25X. (Opezzo A., 2023).

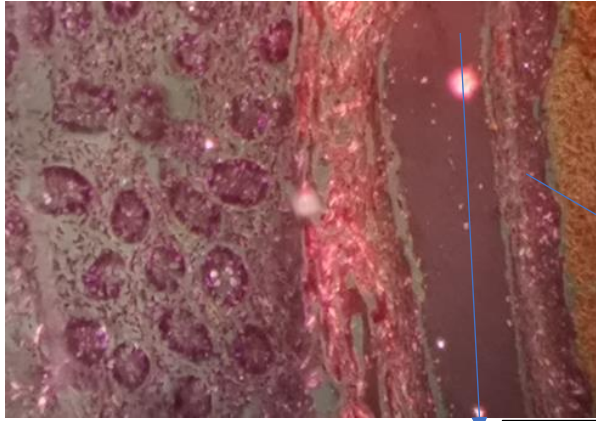


Figura 104: Osservazione al microscopio ottico a luce polarizzata con ingrandimento 20X. (Opezzo A., 2023).

Birifrangenza in luce grigia del collagene

Polvere di vetro da inquinamento del vetrino coprioggetto

❖ ID13

Preparato istologico costituito da un tratto di mucosa colica. Si possono osservare tutti gli strati della parete (mucosa, sottomucosa, parete muscolare, tessuto fibroadiposo periviscerale). In ogni sede sono state ricercate eventuali particelle e/o strutture fibrose minerali. Anche in questo caso l'analisi non mostra la presenza di minerali fibrosi né con l'utilizzo della luce diretta né con quello della luce polarizzata, sia a livello di tessuto colico sano che neoplastico.

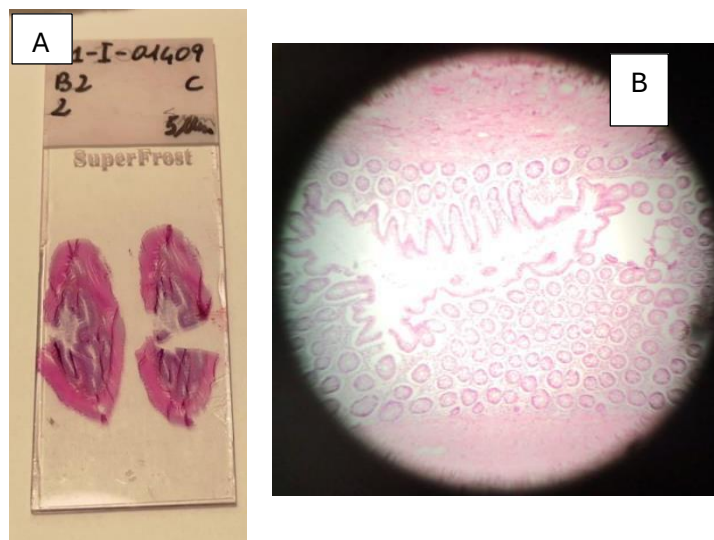


Figura 105: Figura 105 A preparato istologico; figura 105 B osservazione al microscopio ottico a luce diretta ad un ingrandimento di 5X. Si tratta di tessuto colico sano. Si osserva solo la mucosa e la sottomucosa.

Preparato istologico su tessuto neoplastico.

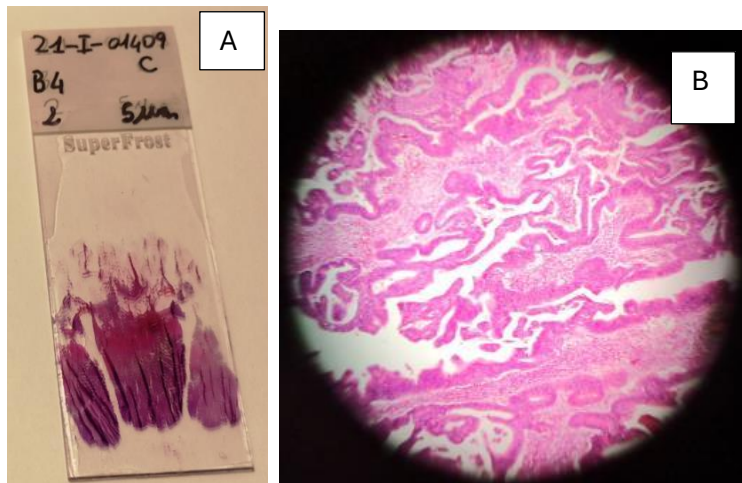


Figura 106: Figura 106 A sezione istologica eseguita su tessuto neoplastico. Figura 106 B osservazione al microscopio ottico a luce diretta ad un ingrandimento 5X. Come si può vedere si tratta di un adenocarcinoma.

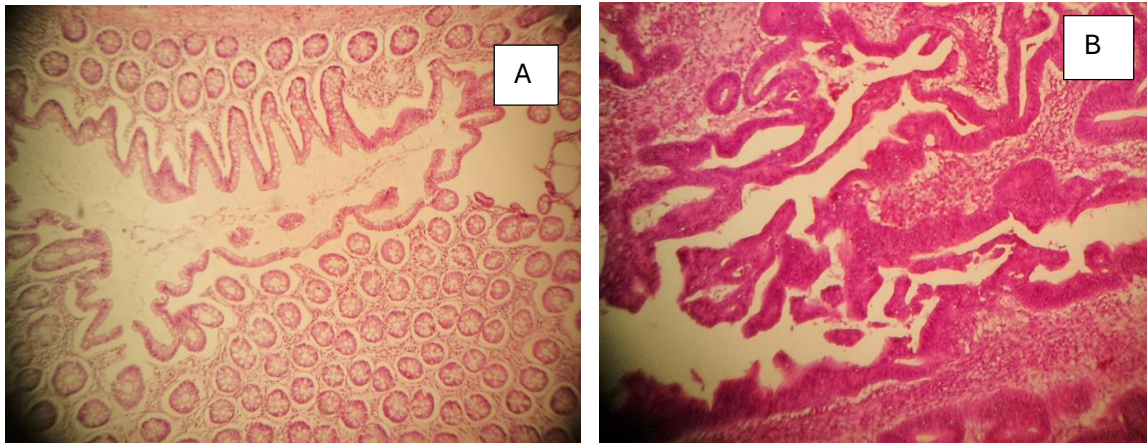


Figura 107: Figura 107 A tessuto colico sano e Figura 107 B tessuto colico neoplastico, entrambi con ingrandimento 20X. (Opezzo A., 2023)

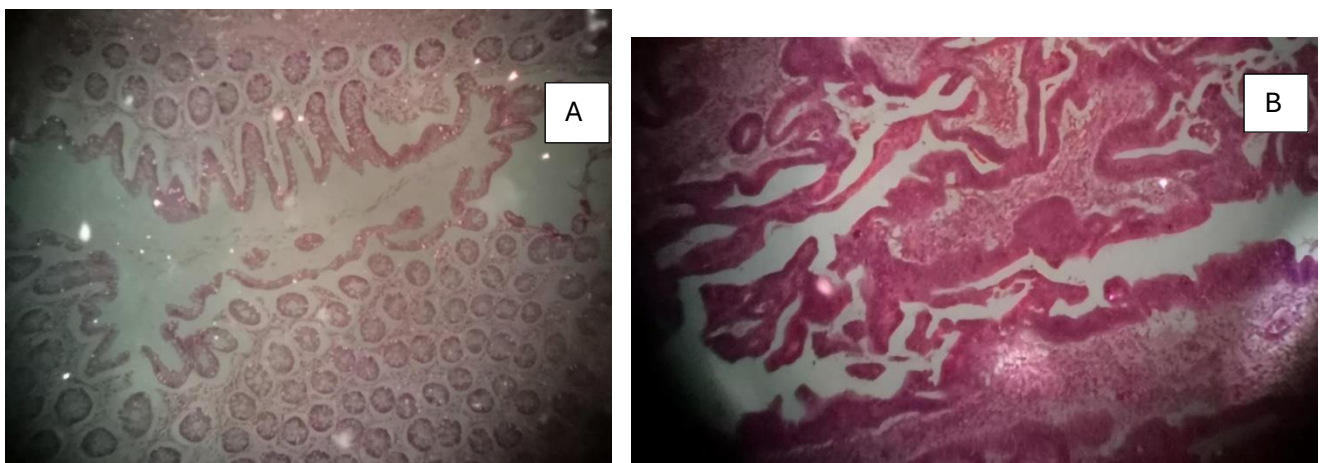


Figura 108: Stessi preparati con l'osservazione al microscopio ottico e a luce polarizzata. Figura 108 A tessuto sano; Figura 108 B tessuto neoplastico. Ingrandimento 20X.

❖ ID14

L'analisi di questo campione, sviluppatasi su due sezioni mostra nella prima sezione un adenocarcinoma e nella seconda sezione un'intensa flogosi linfoplasmacellulare della mucosa e un'iperplasia del tessuto mucoso associato. Tuttavia, non sono presenti strutture minerali fibrose ma si può osservare una zona di collagene recente e sporadiche particelle minerali birfrangenti a luce polarizzata riferibili a fillosilicati.

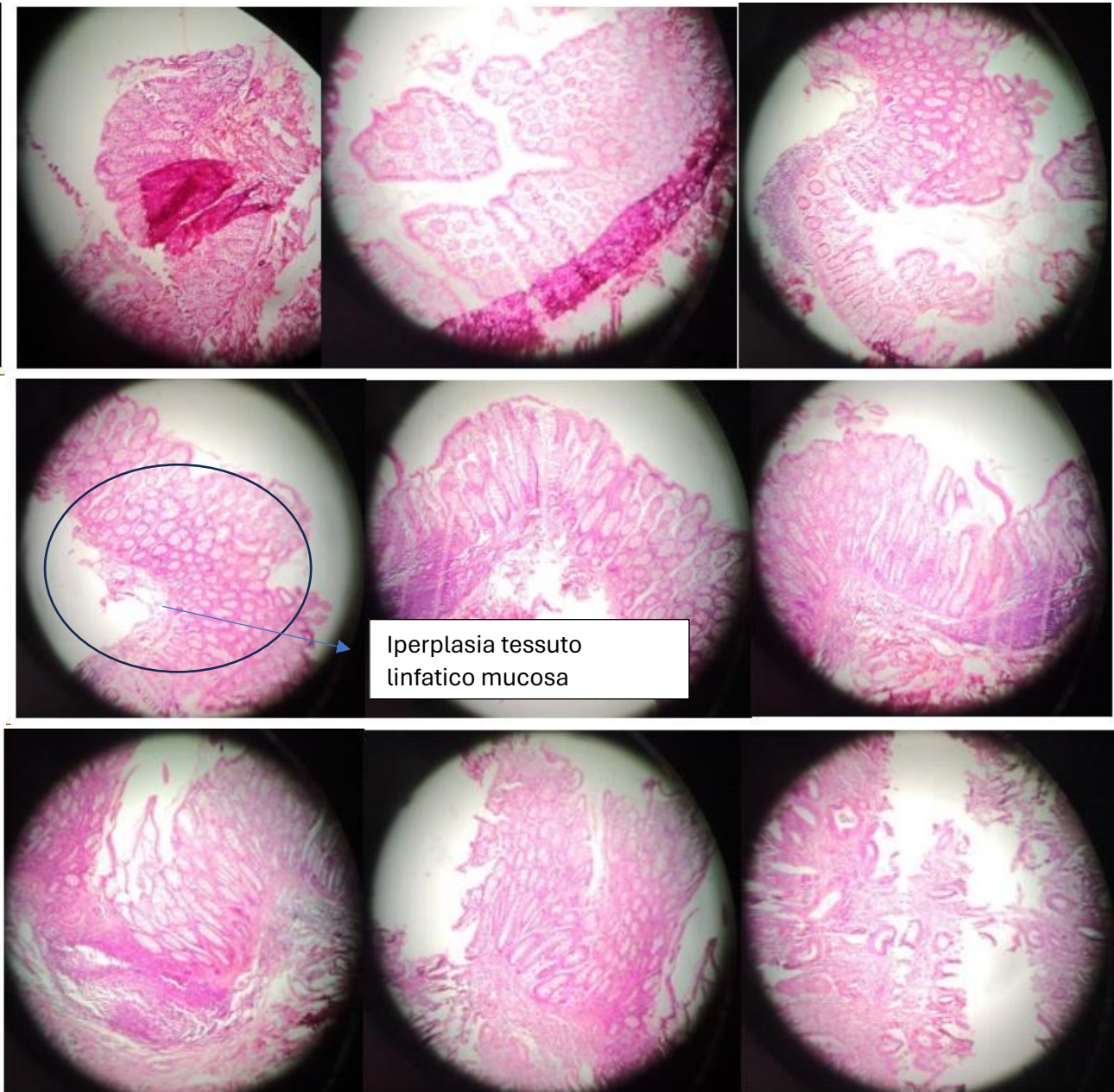


Figura 109: Sequenza di immagini che mostrano il passaggio dal tessuto sano a quello neoplastico con la presenza di iperplasia linfoide del tessuto della mucosa associato, ingrandimento 5X.

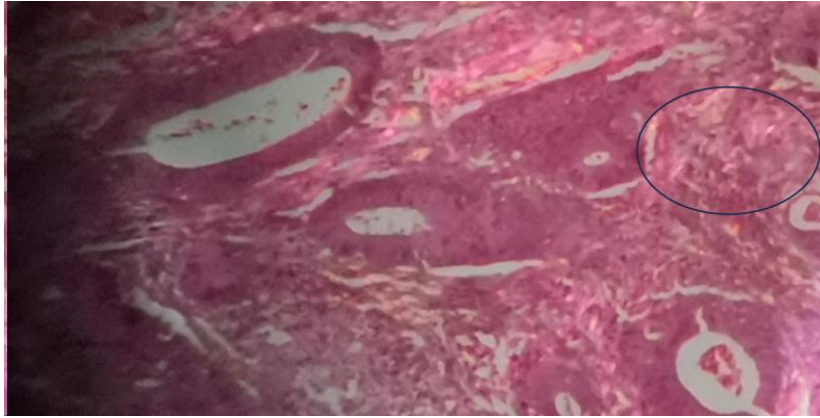


Figura 110: Osservazione a luce polarizzata. Non si osserva contaminazione, Presenza di collagene recente (birifrangenza rosata) e di sporadiche strutture con birifrangenza lattescente, probabilmente particelle di silicio. Ingrandimento 25X. (Opezzo A., 2023)

❖ **ID15**

L'analisi al microscopio ottico sia a luce diretta che a luce polarizzata non mostra particelle o fibre minerali. Nella mucosa sana si osserva un infiltrato infiammatorio misto ad impronta linfocitaria con granulociti eosinofili.

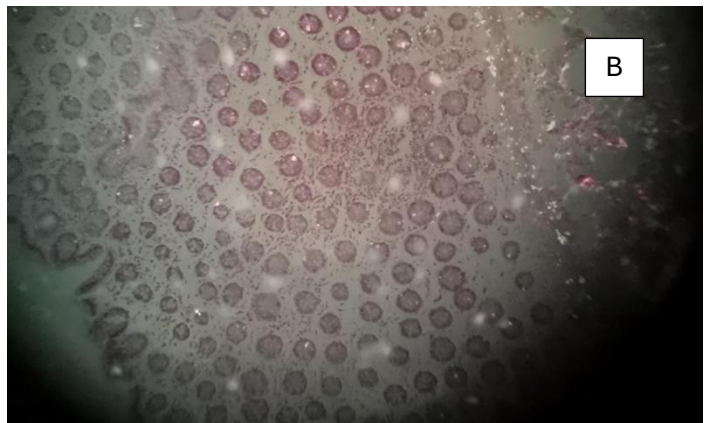
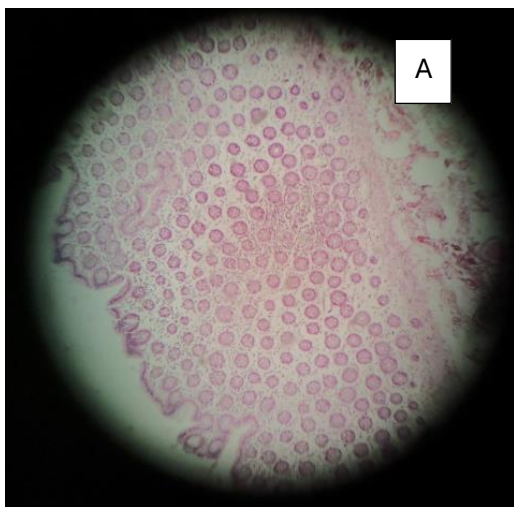


Figura 111: Figura 111 A tessuto colico sano ad un ingrandimento di 5X; Figura 111 B Stessa sezione istologica a luce polarizzata e ad un ingrandimento maggiore di 20X.

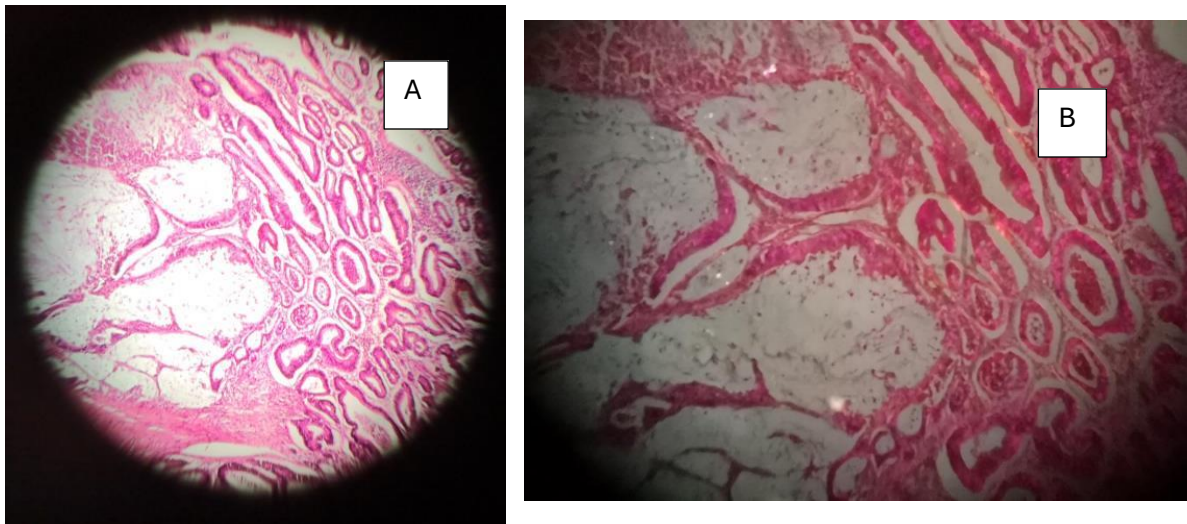


Figura 112: Adenocarcinoma mucinoso del colon. Figura 112 A ingrandimento 5X; Figura 112 B stessa sezione istologica a luce polarizzata e ad un ingrandimento maggiore, di 20X.

❖ ID16

L'analisi al microscopio ottico non evidenzia né a luce polarizzata, né a luce diretta particelle minerali anche ad abito fibroso. L'istotipo della neoplasia colica è quello di un'adenocarcinoma mucinoso. Con il microscopio a luce diretta si nota un aggregato, probabilmente di calcio.

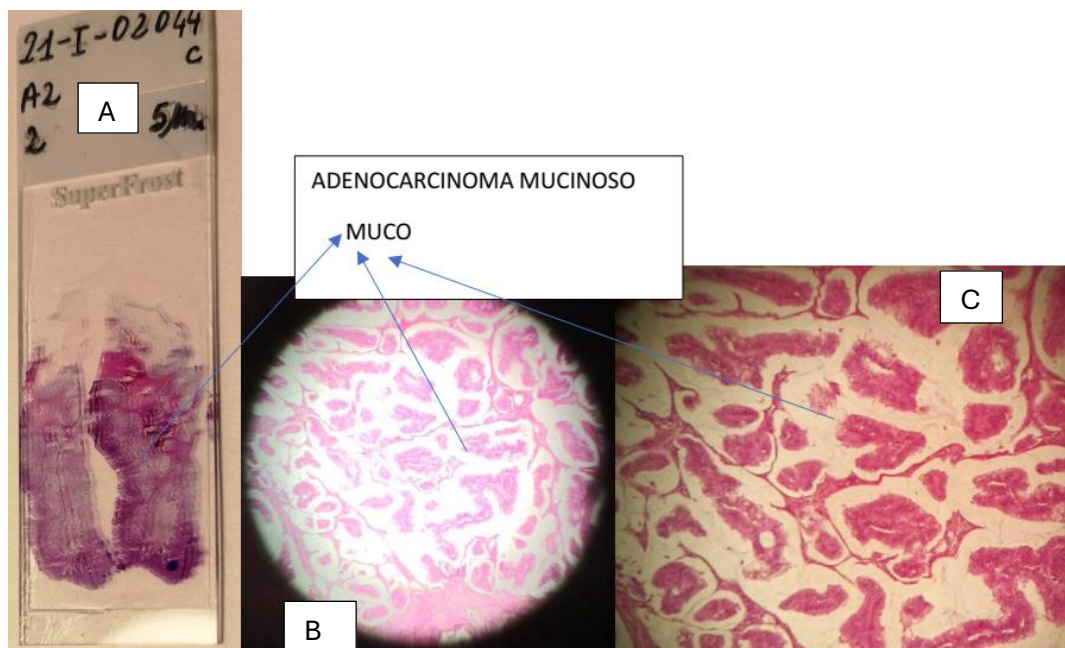


Figura 113: Figura 113 A sezione istologica della neoplasia. Già così è visibile l'abbondante muco. Figura 113 B ingrandimento 5X; Figura 113 C ingrandimento 20X.

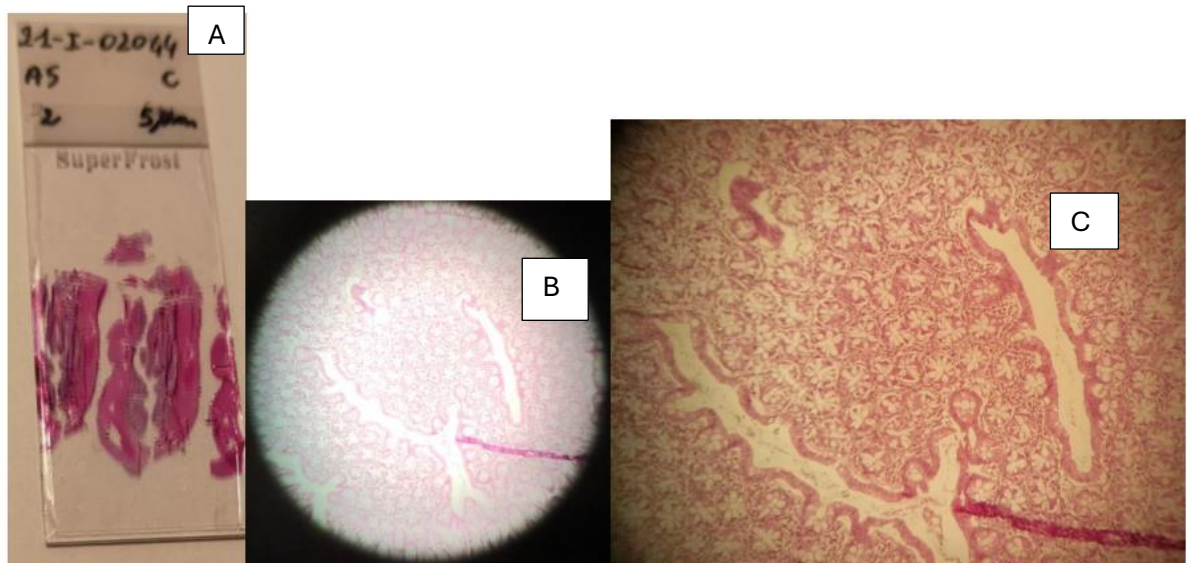


Figura 114: Stesso caso ma sezioni istologiche su tessuto sano. Figura 114 A preparato istologico; Figura 114 B ingrandimento 5X; Figura 114 C ingrandimento 20X.

❖ ID17

Nella sezione di tessuto sano si osserva un'iperplasia linfoide del tessuto mucoso associato; nella porzione di tessuto neoplastico si osservano invece, delle possibili strutture fibrose amorphe in aree di necrosi colliquativa della neoplasia. L'osservazione a luce polarizzata non ha evidenziato strutture minerali birifrangenti.



Figura 115: Osservazione in microscopia ottica a luce polarizzata. Tessuto colico sano con iperplasia linfoide; ingrandimento 20X.

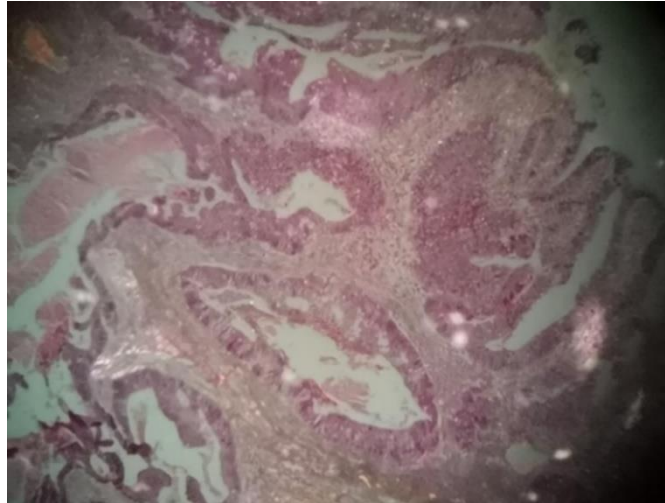


Figura 116: Osservazione in microscopia ottica a luce polarizzata del tessuto neoplastico. Si osserva connettivo di vecchia data con birifrangenza grigia, ingrandimento 20X. (Opezzo A., 2023).

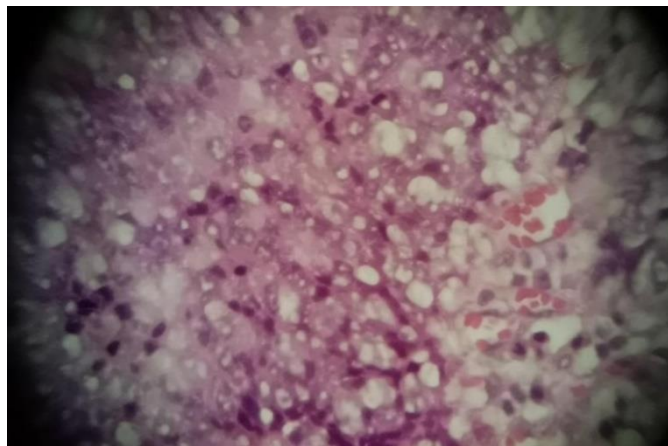


Figura 117: Necrosi intraneoplastica. Osservazione in microscopia ottica a luce polarizzata, ingrandimento 20X. (Opezzo A., 2023; Maccarini G., 2023).

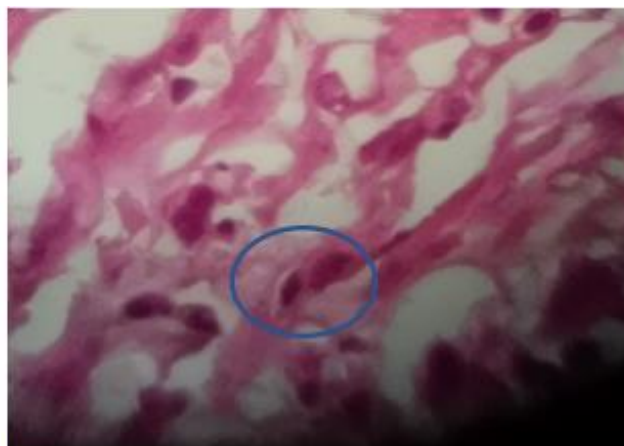


Figura 118: Struttura fibrosa amorfa a luce polarizzata, ingrandimento 40X. (Opezzo A., 2023; Maccarini G., 2023).

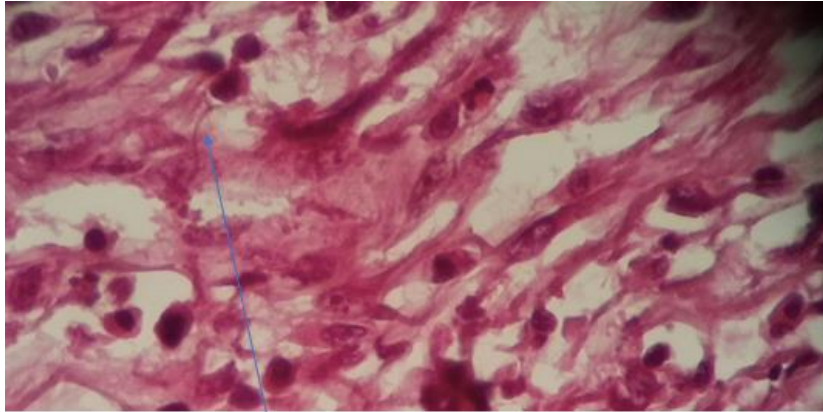


Figura 119: Osservazione a luce polarizzata di una struttura evidenziata dalla freccia, non è ben identificabile; tuttavia, alcuni aspetti morfologici fanno prendere in considerazione una struttura fibrosa che si sta inizialmente ricoprendo con materiale proteico. Non può però essere considerato un corpuscolo ferruginoso perché non si osserva materiale ferroso (assenza della colorazione giallo d'orata); ingrandimento 40x. (Maccarini G., 2023).

❖ ID18

L'analisi al microscopio ottico con luce diretta evidenzia tessuto flogistico in sede periviscerale con aree di fibrosi e atteggiamenti granulomatosi verso singoli elementi neoplastici. Non vi sono birifrangenze riconducibili a fibre minerali.

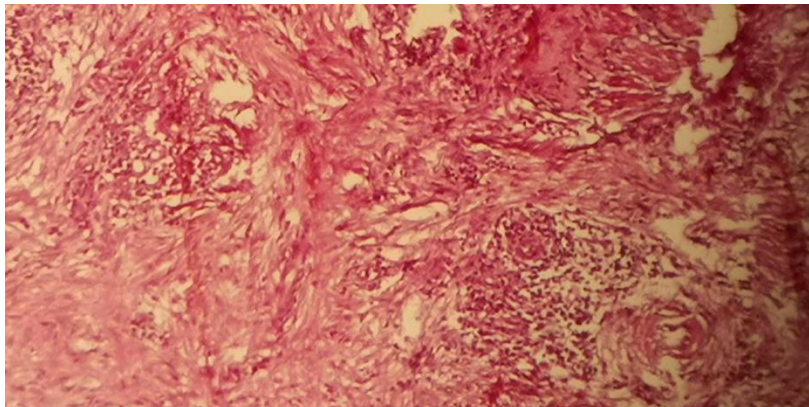


Figura 120: Tessuto flogistico in sede periviscerale con aree di fibrosi e atteggiamenti granulomatosi verso singoli elementi neoplastici, ingrandimento 20X. (Opezzo A., 2023; Maccarini G., 2023).

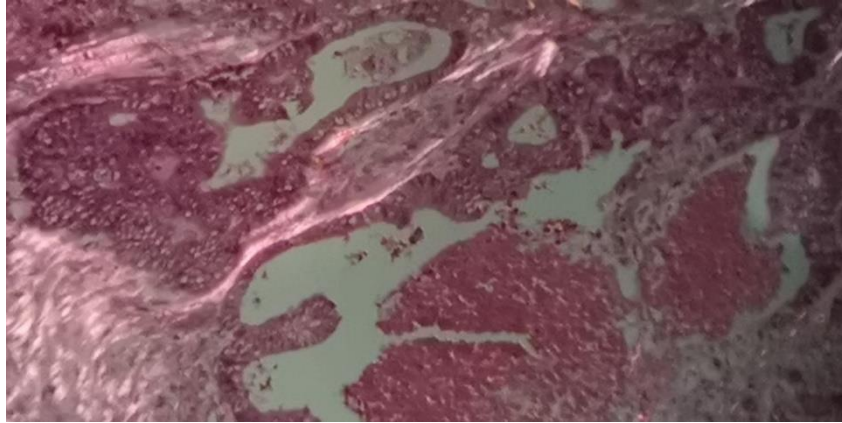


Figura 121: Osservazione a luce polarizzata. Non evidenzia nessuna birifrangenza riferibile a particelle minerali; birifrangenza del connettivo, abbondante nel tessuto periviscerale intra e perineoplastico, ingrandimento 20X. (Opezzo A., 2023; Maccarini G., 2023).

❖ ID19

Nella sezione è visibile il passaggio dalla mucosa sana a quella neoplastica. La neoplasia risulta solida e scarsamente differenziata. È presente anche un infiltrato infiammatorio ad impronta linfoplasmacellulare associato a granulociti eosinofili. Inoltre, con il microscopio a luce diretta, è stata ritrovata una struttura ad abito fibroso in area di necrosi colliquativa. Con l'osservazione a luce polarizzata non si sono evidenziate strutture minerali birifrangenti



PUNTO DI PASSAGGIO TRA LA MUCOSA SANA E QUELLA NEOPLASTICA

Figura 122: La freccia indica il punto di passaggio dalla mucosa sana a quella neoplastica.

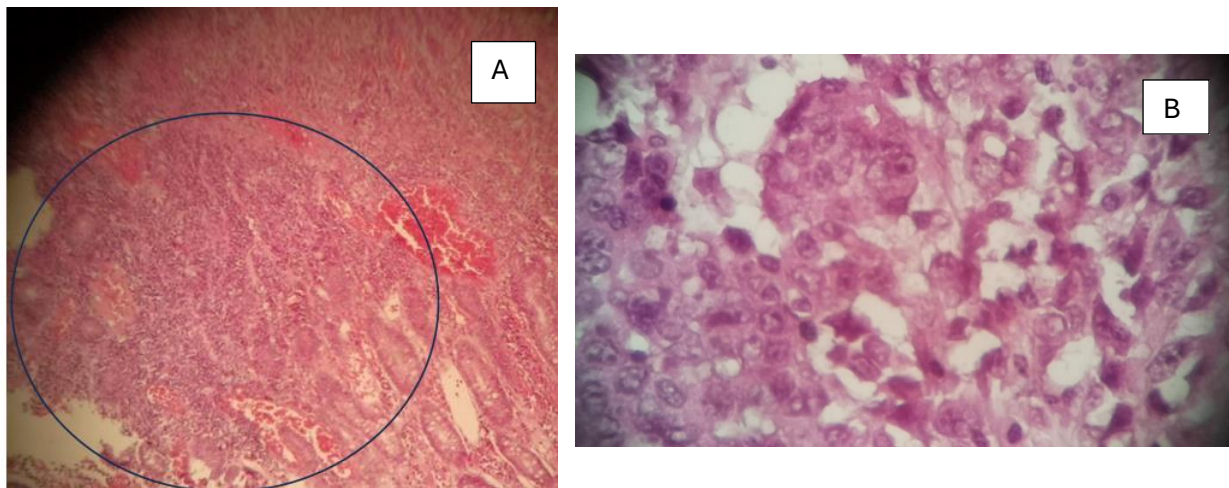


Figura 123: In entrambe le foto viene mostrata la zona di passaggio dal tessuto sano a quello neoplastico; la neoplasia è scarsamente differenziata. Fig. ...A ingrandimento 20X; Fig. ...B ingrandimento 40X. (Maccarini G., 2023).

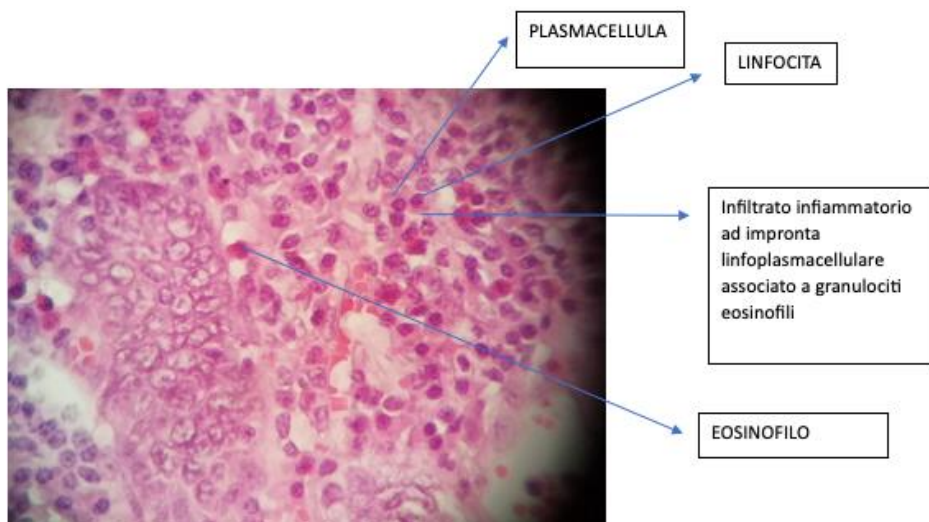


Figura 124: Descrizione delle strutture rilevate. Ingrandimento 40X. (Maccarini G., 2023).

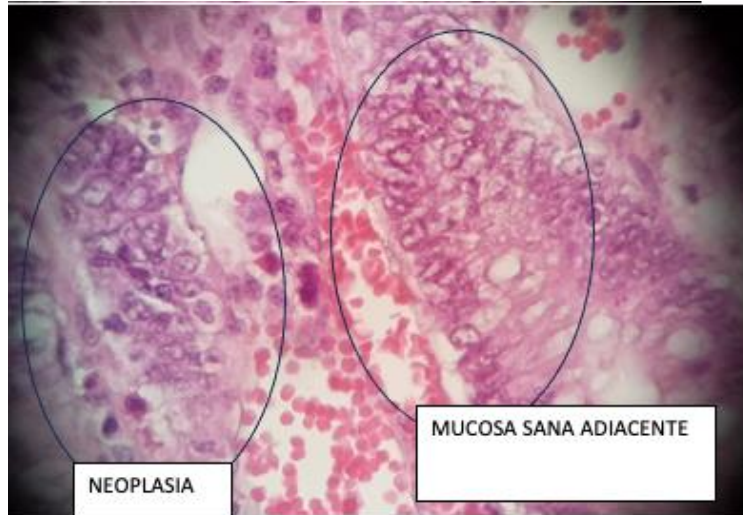


Figura 125: Passaggio da tessuto sano a neoplastico, ingrandimento 40X. (Opezzo A., 2023; Maccarini G., 2023).

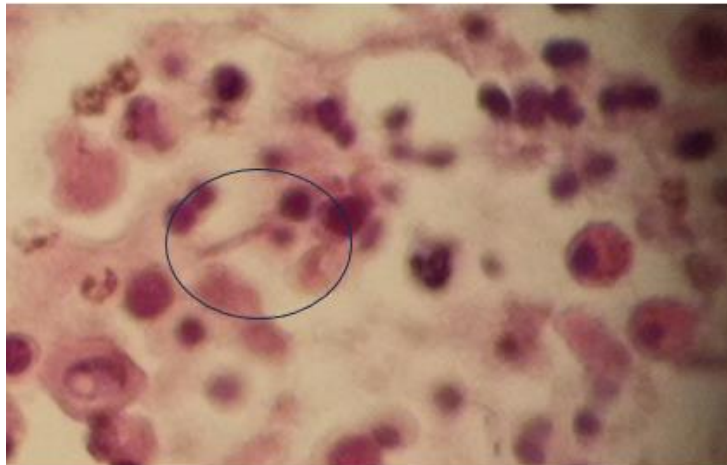


Figura 126: Osservazione tramite microscopia ottica a luce diretta di una struttura ad abito fibroso in area di necrosi colliquativa (Opezzo A., 2023; Maccarini G., 2023).

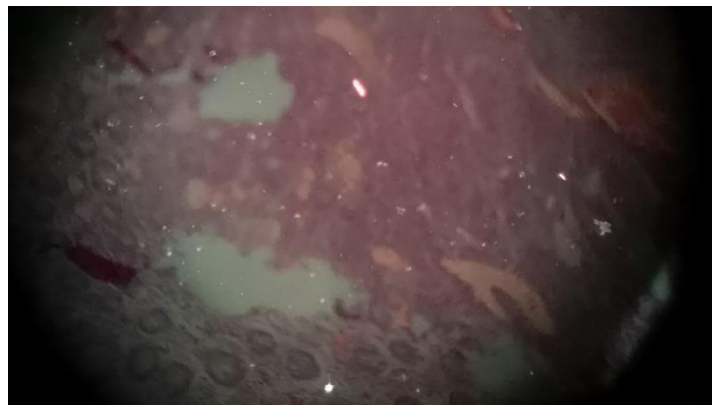


Figura 127: Il materiale birfrangente è solo da contaminazione. Ingrandimento 5X a luce polarizzata.

❖ ID20

Nelle sezioni sono state trovate aree di tessuto adiposo nella zona del rivestimento mesoteliale del peritoneo con abbondante flogosi e lieve iperplasia mesoteliale. Alla osservazione a luce polarizzata e a luce diretta non si osservano strutture minerali.

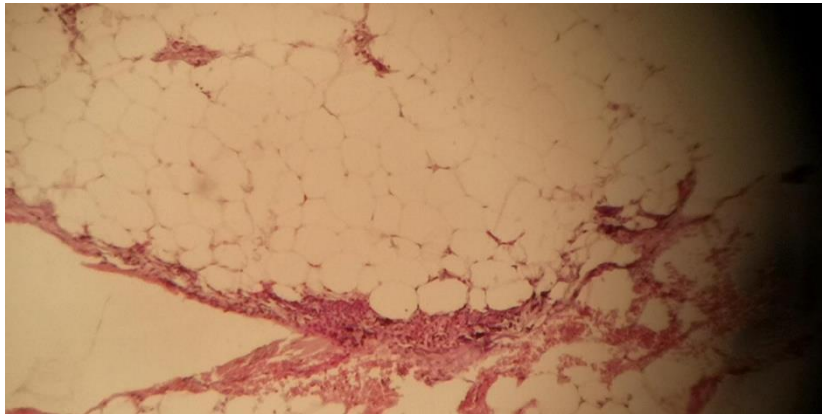


Figura 128: Tessuto adiposo a livello del rivestimento mesoteliale del peritoneo con focale flogosi cronica e lieve iperplasia mesoteliale, ingrandimento 40X. (Opezzo A., 2023; Maccarini G., 2023).

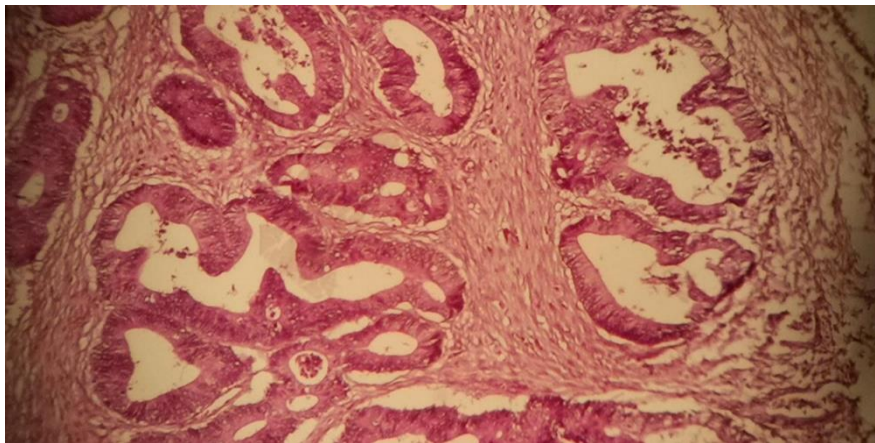


Figura 129: Adenocarcinoma colico, ingrandimento 25X.

10 ALLEGATO 2: Metodiche di colorazione istologiche per l'evidenziazione della sostanza amiloide

L'amiloidosi è una patologia causata da alcune proteine che ripiegandosi in modo anomalo assumono una configurazione alterata. Tali proteine aggregandosi formano le cosiddette fibrille di amiloide. Queste strutture si raggruppano e si accumulano in vari tessuti formando depositi di amiloidi che provocano disfunzioni, insufficienze organiche fino alla morte del soggetto. La gravità della patologia dipende dagli organi interessati dai depositi di amiloide che possono essere di tipo:

- sistemico (diffusi in tutto l'organismo);
- localizzato (interessano un solo organo o tessuto). (<https://www.msdmanuals.com>).

Amiloidosi sistemica

L'amiloidosi sistemica può essere classificata in quattro gruppi principali:

- 1) amiloidosi primaria (AL), o amiloidosi a catene leggere, caratterizzata dall'alterazione delle cellule plasmatiche che producono quantità eccessive di proteine anticorpali anomale.
- 2) amiloidosi secondaria (AA), può insorgere in seguito a diverse patologie che causano infiammazioni croniche come la tubercolosi o l'artrite reumatoide. L'amiloidosi secondaria colpisce principalmente i reni ma possono essere coinvolti anche altri organi.
- 3) amiloidosi familiare (AF), caratterizzata da una serie di patologie ereditarie e causa sintomi nell'età adulta. Le proteine mutate colpiscono principalmente reni, nervi e cuore.
- 4) Amiloidosi da transtiretina wild type (ATTRwt), è l'anomalia della proteina transtiretina normale che colpisce principalmente il cuore. (<https://www.msdmanuals.com>)

Amiloidosi Localizzata

L'amiloidosi localizzata insorge quando l'amiloide si deposita in determinati organi. Ad esempio, può causare l'Alzheimer se si deposita nel cervello. Quando la patologia colpisce i nervi il soggetto può presentare formicolio delle dita o vertigini, quando invece colpisce il cuore il soggetto può avvertire alterazioni del ritmo cardiaco o insufficienza cardiaca che causano affanno e debolezza. (<https://www.msdmanuals.com>).

Diagnosi

L'amiloidosi può risultare difficile da diagnosticare perché determina patologie fra loro diverse; tuttavia, un sintomo comune che può far sospettare il medico è la macroglossia (ingrossamento della lingua). Generalmente la diagnosi viene effettuata tramite biopsia del grasso periombelicale, in alcuni casi si può eseguire un'autopsia degli organi colpiti dalla patologia per sottoporli a specifiche colorazioni per poi analizzarli al microscopio. (<https://www.msmanuals.com>)

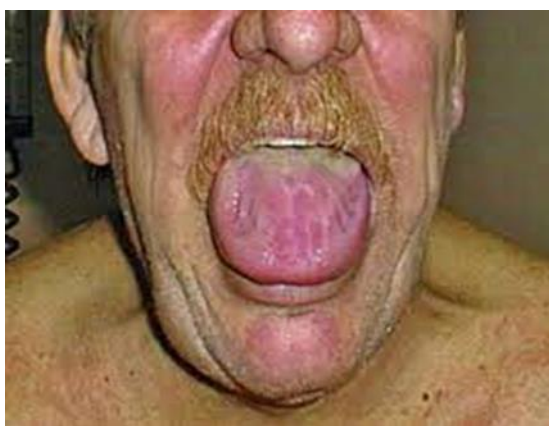


Figura 130: Macroglossia. (<https://www.msmanuals.com>)

Il colorante più utilizzato per evidenziare la sostanza amiloide è il Rosso Congo. Il microscopio ottico a luce polarizzata mostra tramite birifrangenza, una colorazione verde mela in corrispondenza dei depositi di amiloide, i quali assumono successivamente una colorazione rosso/rosa quando entrano a contatto con il colorante. Questa tecnica è molto efficace e permette di diagnosticare la patologia nel 70-80% dei casi. Nei casi di dubbia positività potrebbe essere utilizzato come secondo colorante la Tioflavina T, che permette osservazioni al microscopio ottico a fluorescenza. (<https://www.malattierarepiemonte.it>).

La Tioflavina T (ThT), è un sale benzotiazolico utilizzato come colorante per visualizzare la presenza degli accumuli di amiloide sia in vivo che in vitro. E' stato osservato che il colorante si localizza selettivamente nei depositi di amiloide aumentandone la fluorescenza permettendone così anche la quantificazione tramite il microscopio a fluorescenza. In combinazione con la Tioflavina T, viene utilizzato anche un colorante organico fluorescente, il DAPI, che lega regioni di DNA ricche di sequenze A-T e viene molto utilizzato per le contro-colorazioni in immunofluorescenza di materiale umano e botanico, e in flussocitometria.

Per la preparazione iniziale sono state utilizzate delle sezioni fissate in formalina ed incluse in paraffina con uno spessore di 3-4 micrometri. (Fasano, 2023).

I protocolli utilizzati sono stati:

- **Colorazione con Tioflavina T** (su paraffina con DAPI):

1. Sparaffinare il campione e reidratarlo
2. Lavaggi rapidi con acqua
3. Tioflavina T 1% (0,01 g in 1 mL) per 3 min
4. Lavaggi rapidi con acqua
5. Acido acetico 1 % (10 mL in 1 mL) per 20 min
6. 3 Lavaggi da 5 minuti con PBS 1X
7. DAPI 5 min
8. 3 Lavaggi da 5 min con PBS 1X
9. Chiusura con cityflour

- **Colorazione con Tioflavina T** (su paraffina più ematossilina)

1. Sparaffinare il campione e reidratarlo
2. Ematossilina 2 minuti
3. Lavaggi in acqua rapidi
4. Tioflavina T 1% (0,01 in 1m) per 3 minuti
5. Lavaggi in acqua rapidi
6. Acido acetico 1 % (10 mL in 1 m) per 20 min
7. 3 Lavaggi da 5 minuti con acqua
8. Scala di alcool (disidratare) rapidi
9. Eukitt

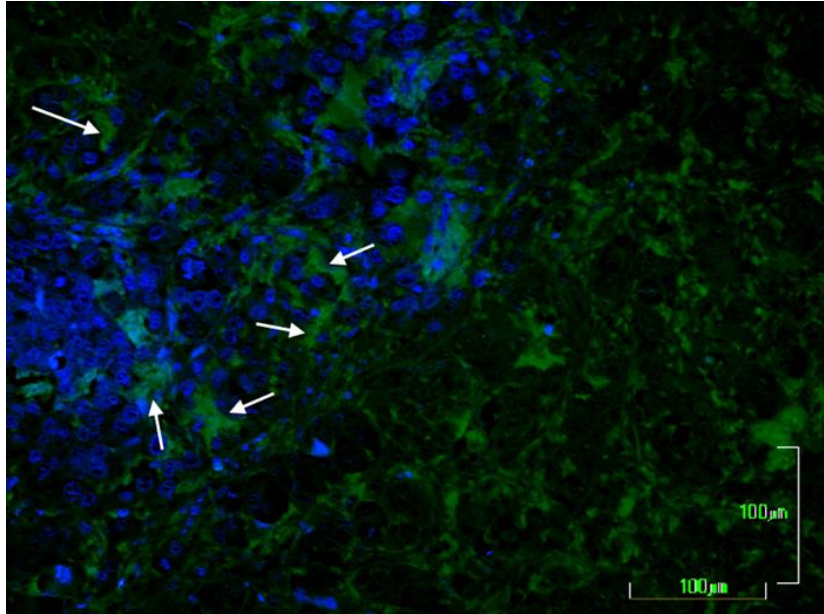


Figura 131: Colorazione con metodica Tioflavina-DAPI. La figura mostra una sezione di colon. In blu i nuclei colorati con DAPI, in verde la sostanza amiloide e le fibrille (frecce).

Trattamento

Per l'amiloidosi primaria, il principale trattamento è la chemioterapia con farmaci di nuova generazione e, se necessario, si interviene anche con il trapianto di cellule staminali periferiche. Questo trattamento può prevenire la progressione dei depositi e arrestare la malattia nel midollo osseo. Per l'amiloidosi secondaria si possono utilizzare dei medicinali per il trattamento della malattia di base, come la colchicina che risulta essere molto efficace. Nell'amiloidosi causata da depositi di transtiretina, vengono utilizzati farmaci come il tafamidis che stabilizzano la proteina e quindi rallentano la progressione della patologia. In alcuni casi è necessario intervenire con un trapianto di organi, tale pratica è risultata essere ottimale per prolungare la vita di alcuni soggetti affetti da insufficienza d'organo causata dalla malattia stessa. (<https://www.msdmanuals.com>).

11 ALLEGATO 3: Sintesi delle conoscenze relative all'esposizione e al profilo tossicologico dell'amianto

Nel 1986 l'OMS indicò come 'pericolose' tutte le fibre di amianto con lunghezza $>5 \mu\text{m}$, diametro $<3 \mu\text{m}$ e rapporto dimensionale lunghezza/diametro >3 . La pericolosità relativa all'inalazione delle fibre dipende dal grado di penetrazione nelle vie respiratorie a sua volta dipendente dalle dimensioni delle fibre: quelle a diametro aerodinamico minore (funzione della geometria e della densità della fibra) sono suscettibili di penetrare più a fondo nell'albero bronchiale fino agli alveoli.

Le fibre sono definite respirabili, ovvero in grado di giungere nella zona alveolare dell'albero respiratorio, quando abbiano diametro inferiore a $3 \mu\text{m}$, che nel caso del crisolito corrisponde ad un diametro aerodinamico di circa $10 \mu\text{m}$. Le particelle di diametro maggiore, che si depositano nelle vie aree superiori (nasali e tracheo-bronchiali), possono essere eliminate attraverso il trasporto mucociliare dell'epitelio. Riguardo alla lunghezza, è anche opinione diffusa che fibre di lunghezza superiore a $200-250 \mu\text{m}$ siano troppo grandi per depositarsi nei polmoni e quindi non respirabili a tutti gli effetti. I tre fattori principali che concorrono a determinare la pericolosità degli amianti per via inalatoria sono:

- ❖ forma e dimensioni, che condizionano respirabilità e deposizione;
- ❖ "clearance" e ritenzione, che determinano la biopersistenza, rilevante per gli effetti a lungo termine;
- ❖ composizione chimica e reattività di superficie, che condizionano una serie di reazioni chimiche, che si ritiene possano contribuire agli effetti tossici delle fibre.

Forma e dimensioni e, in particolare, il rapporto lunghezza/diametro determinano la capacità delle fibre di raggiungere gli spazi alveolari e l'attitudine ad esservi ritenute in forma non modificata: un elevato rapporto di allungamento consente un buon allineamento della fibra con la corrente e quindi una penetrazione polmonare più profonda. Numerosi studi hanno individuato una relazione tra dimensione e forma della fibra e induzione di effetti tossici, nota come ipotesi di Stanton, per cui fibre lunghe e sottili risultano le più pericolose. Le fibre respirabili possono depositarsi sia per sedimentazione sull'epitelio alveolare che per impatto ai siti di biforcazione dell'albero bronchiale, ma anche per incastro della punta della fibra sulla parete epiteliale. Le fibre depositate nelle vie aeree distali e negli alveoli, possono essere rimosse per fagocitosi ad opera dei macrofagi alveolari: la rapidità di rimozione dipende dalla lunghezza delle fibre: quelle più corte ($<5 \mu\text{m}$, spesso risultato di rottura o

modifica chimica di fibre più grandi) sono eliminate più velocemente delle fibre più lunghe. Si ritiene che i macrofagi non siano in grado di fagocitare efficientemente fibre aventi una lunghezza pari o superiore al loro diametro (7-14 μm), perfettamente compatibile con il diametro degli alveoli polmonari umani (circa 14–25 μm). Le fibre lunghe provocano una fagocitosi “frustrata” con conseguente danneggiamento della membrana citoplasmatica dei macrofagi e liberazione del contenuto lisosomiale. Ciò induce un complesso ciclo ingestione – re-ingestione delle fibre da parte dei macrofagi, che provoca un’inflammation persistente con conseguente danneggiamento delle cellule epiteliali. Le fibre considerate avere l’impatto maggiore per la salute sono quelle lunghe e sottili (con diametro < 1.5 μm e lunghezza maggiore di 8 μm). La biopersistenza, definita come la capacità delle fibre a permanere inalterate una volta depositate sull’epitelio polmonare, dipende oltre che dalla dimensione e forma della fibra, anche da composizione chimica, area superficiale, caratteristiche di superficie. Studi effettuati su un certo numero di differenti fibre minerali hanno mostrato una relazione tra la solubilità in vivo delle fibre e la loro composizione chimica, ed un aumento del potenziale di tossicità delle fibre al diminuire della loro solubilità. Un ulteriore fattore che concorre a determinare la capacità delle fibre di asbesto di indurre effetti tossici è la composizione mineralogica del solido (presenza di altri minerali, spesso in forma fibrosa), in termini sia di composizione chimica delle fibre che di caratteristiche della loro superficie. Numerosi studi hanno mostrato che la reattività di superficie delle fibre di amianto gioca un ruolo fondamentale nelle complesse reazioni chimiche che avvengono nelle interazioni tra le fibre e le strutture biologiche. Le proprietà di superficie influenzano il trasferimento delle fibre nei diversi compartimenti biologici, l’attivazione delle cellule dei macrofagi e la fagocitosi (ad esempio il rilascio di alcune specie radicaliche, mediato dalla presenza di Fe sulla superficie, incrementa l’uptake delle fibre di asbesto da parte delle cellule epiteliali tracheali). Si evince pertanto che il meccanismo alla base della tossicità dell’amianto prevede una complessa interazione tra le fibre minerali e i target cellulari, basata su estensione e reattività della superficie della fibra, la sua dimensione e la biopersistenza. Le fibre depositate possono penetrare negli spazi interstiziali da dove vengono traslocate alla pleura, al peritoneo o in distretti corporei più distanti. L’accumulo delle fibre nel tessuto polmonare, nella pleura e nei linfonodi è stato dimostrato in soggetti esposti professionalmente per inalazione a fibre di amianto. La via di traslocazione a distretti distanti dal polmone per indurre effetti in siti distanti dal punto di iniziale contatto (es: induzione di tumori ovarici) non è nota, anche se il coinvolgimento delle vie linfatiche per le fibre di amosite è stato dimostrato in sperimentazioni animali. Mediante studi in vivo su

roditori esposti cronicamente a fibre di amianto (principalmente crisotilo) per inalazione, è stata dimostrata una correlazione tra lunghezza e biopersistenza delle fibre con infiammazione, fibrosi interstiziale, cancro al polmone e mesotelioma maligno. Nella maggior parte dei casi è stata dimostrata anche una correlazione tra la comparsa di fibrosi e il tumore al polmone. (NB: si osservi che anche nell'uomo l'esposizione ad amianto causa una specifica fibrosi polmonare, l'asbestosi; i soggetti affetti da asbestosi hanno un'elevata incidenza di tumori polmonari e mesoteliomi in quanto l'asbestosi richiede una elevata esposizione cumulativa ad amianto. Tuttavia, l'eccesso di rischio per entrambi questi tumori si manifesta anche in soggetti con esposizioni cumulative ad amianto meno elevate, che non hanno la potenzialità di causare l'asbestosi). Lo stesso tipo di effetti (fibrosi e tumore polmonare), con chiara dose-dipendenza, è stato evidenziato anche a seguito di esposizioni per istillazione intratracheale, o iniezioni intrapleuriche e intraperitoneali (vie non rappresentative della esposizione umana e perciò poco utili nella valutazione dei rischi). Il meccanismo alla base della cancerogenicità dell'amianto prevede una complessa interazione tra le fibre minerali e i target cellulari. Le principali caratteristiche chimico-fisiche associate ai danni polmonari sono la estensione e reattività della superficie della fibra, la sua dimensione e la biopersistenza. (<https://www.salute.gov.it>)

12 BIBLIOGRAFIA

- AIOM - Associazione Italiana di Oncologia Medica. *Linee guida per il mesotelioma pleurico*. Edizione 2021.
- Airoldi C., Ferrante D., Miligi L., Piro S., Stoppa G., Migliore E., Chellini E., Romanelli A., Sciacchitano C., Mensi C., Cavone D., Romeo E., Massari S., Marinaccio A. & Magnani C. *Estimation of Occupational Exposure to Asbestos in Italy by the Linkage of Mesothelioma Registry (ReNaM) and National Insurance Archives*. *Methodology and Results*. (2020).
- Albonico C. *Struttura cristallina, morfologia e spettri eds dei minerali del gruppo del serpentino*. Valle d'Aosta: Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente. (2017)
- Azzolina D., Consonni D., Ferrante D., Mirabelli D., Silvestri S., Luberto F., Angelini A., Cuccaro F., Nannavecchia A., Oddone E., Vincentini M., Barone-Ardesi F., Cena T., Mangone L., Roncaglia F., Sala O., Menegozzi S., Pirastu R., Tunesi S., Chellini E., Miligi L., Perticaroli P., Pettinari A., Bressan V., Merler E., Girardi P., Bisceglia L., Marinaccio A., Massari S., Magnani C. *Rate Advancement measurement for lung cancer and pleural mesothelioma in asbestos-exposed workers* (2022).
- Barbone S. "Scienze integrate- Le scienze della vita: Il microscopio ottico", Seconda edizione- Zanichelli.; 1-3 (2010)
- Barboni, *Corso integrato di struttura e funzione del microscopio ottico*, Università degli studi di Teramo. (2014).
- Brandi G.; Tavolari S. *Asbestos and Intrahepatic Cholangiocarcinoma*. *Cells*, 9(2), 421. (2020)
- Compagnoni R., Groppo C. *Gli amianti in Val di Susa e le rocce che li contengono*. *Rendiconti Società Geologica Italiana*. 11: 21-28. (2006)
- Cossio R., Albonico C., Zanella A., Fraterrigo-Garofalo S., Avataneo C., Compagnoni R., Turci F. *Innovative unattended SEM-EDS analysis for asbestos fiber quantification*. (2018)

- Croce A. Appunti e materiale fornito a lezione durante il corso “*Cristalli e loro interazione nell’ambiente*”, Università del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”, A.A. 2021/2022.
- DeStefano A., Clyde F. Martin & Dorothy I. Wallace. *A dynamical model of the transport of asbestos fibres in the human body*, Journal of Biological Dynamics, 11:1, 365-377. (2017)
- Di Bona D., Licata A., Peralta S., Cammà C. *Il carcinoma del colon-retto: un approccio basato sulle evidenze*. Giornale Italiano Endoscopia Digestiva. 26: 33-36. (2003)
- Di Ciaula A.: *Asbestos ingestion and gastrointestinal cancer: a possible underestimated hazard*, Expert Review of Gastroenterology & Hepatology. (2017)
- Fasano F., (A.A 2022/2023). *L’amianto e la neoplasia del colon-retto: storia, biologia e ricerca indicatori morfologici di esposizione all’asbesto. La tecnica raman*. Alessandria: Università degli Studi del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica.
- Ghio A., Stewart M., Sangani R., Pavlisko E. & Victor L. Roggli V. *Asbestos and Iron*. (2023)
- Grosso F., Croce A., Libener R., Mariani N., Pastormerlo M., Maconi A., Rinaudo C. *Asbestos fiber identification in liver from cholangiocarcinoma patients living in an asbestos polluted area: a preliminary study*. Tumori, 105(5): 404-410. (2019)
- Gruppo biofibre. *Corpuscoli dell’asbesto nel tessuto polmonare umano e liquidi biologici: metodo analitico e atlante fotografico*. Roma: Istituto Superiore di Sanità. (2017).
- Kim S., Williams D., Cheres P., Kamp D. *Asbestos-Induced Gastrointestinal Cancer: An Update*. Department of Pulmonary & Critical Care Medicine, Northwestern University Feinberg School of Medicine, Chicago, USA. Journal of Gastrointestinal Digestive System. October. (2013)
- Kogan F.M; Vanchugova N.N; Frasch V.N. *Possibility of inducing glandular stomach cancer in rats exposed to asbestos*. Occupational and Environmental Medicine, 44(10), 682–686. (1987)

- Kwak K.; Paek D.; Zoh K.E. *Exposure to asbestos and the risk of colorectal cancer mortality: a systematic review and meta-analysis*. Occupational and Environmental Medicine, 76(11): 861-871.(2019).
- Maccarini G. *Il carcinoma del colon di tipo occupazionale. Ricerca su eventuali indicatori biomedici di esposizione all'asbesto*. Alessandria: Università degli Studi del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica. (A.A. 2022/2023).
- Magnani C.; Mensi C.; Binazzi A.; Marsili D.; Grosso F.; Ramos-Bonilla J.P.; Ferrante D.; Migliore E.; Mirabelli D.; Terracini B.; et al. *The Italian Experience in the Development of Mesothelioma Registries: A Pathway for Other Countries to Address the Negative Legacy of Asbestos*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 20, 936. (2023)
- Magnelli V. *Dispense del corso di Fisiologia Generale II*, Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica di Alessandria, A.A. 2021/2022.
- Merati I. *Analisi di fibre e particelle minerali in campioni istologici utilizzati per indagini geoforensi*. Alessandria Università degli Studi del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica. (A.A. 2020/2021).
- Ministero della Salute. *Quaderni del Ministero della Salute Stato dell'arte e prospettive in materia di contrasto alle patologie asbesto-correlate*. Roma: Testata di proprietà del Ministero della Salute. (2012)
- Nelson V.K., Sahoo N.K., Sahu M., Sudhan H.H., Pullaiah P.P., Muralikrishna K.S. *In vitro anticancer activity of Eclipta alba whole plant extract on colon cancer cell HCT-116*. Complement Medicine and Therapies 20:355. (2020)
- Opezzo A. *Carcinoma del colon da inquinanti ambientali: studio di correlazione tra presenza di inquinanti nei tessuti, referti istologici e dati di esposizione*. Alessandria: Università degli Studi del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica. (A.A. 2022/2023).
- Peng W.; Jia X.; Wei B.; Yang L.; Yu Y.Z.L. *Stomach cancer mortality among workers exposed to asbestos: a meta-analysis*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 141(7), 1141–1149. (2015)

- Ponziano, A. *Sviluppo e caratterizzazione di organoidi da mesotelioma maligno della pleura: risposta terapeutica e medicina di precisione*. Università politecnica delle Marche, facoltà di Medicina e Chirurgia. (A.A. 2021/2022)
- Rinaudo C., Croce A., Erra S., Nada E., Bertolotti M., Grosso F., Maconi A., Amisano M. *Asbestos Fibers and Ferruginous Bodies Detected by VP-SEM/EDS in Colon Tissues of a Patient Affected by Colon-Rectum Cancer: A Case Study*. (2021)
- Rinaudo C.; Croce A. *Appunti per biologi su cristalli e minerali, Metodi non distruttivi per la loro identificazione*. Tab edizioni, pp 168. (2020).
- Roca E. Rassegna bibliografia della letteratura scientifica: *Microparticelle pleuriche e Mesotelioma Maligno* (2022).
- Santibañez M., Vioque J., Alguacil J., García de la Hera M., Moreno-Osset E., Carrato A., Porta M., Kauppinen T. *Occupational exposures and risk of pancreatic cancer*. European Journal of Epidemiology. 17 July 2010. Volume 25, pages 721–730, (2010)
- Selikoff, I. & Seidman, H.. *Cancer of the pancreas among asbestos insulation workers*. Cancer, 47(Supplement S6), 1469–1473. (1981)
- Serio, G., Pezzuto, G., Fortarezza, F., Marzullo, A., Delfino, M., D'Amati, A., Romano, D., Maniglio, S., Caporusso, C., Lettini, T., Cavone, D., Vimercati, L. *Mesothelioma and Colorectal Cancer: Report of Four Cases with Synchronous and Metachronous*. (2022)
- Simoniello A. *Ricerca del ruolo dell'asbesto nella cancerogenesi non mesoteliale con particolare attenzione alla cancerogenesi coloretale*. Alessandria: Università degli Studi del Piemonte Orientale, Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica. (A.A. 2019/2020).
- Stahel R.A. et al. *Malignant pleural mesothelioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Annals of Oncology 21 (Supplement 5): v126-v128, (2010)
- Taddei S., Falco F., Galeone C., Piro R., Facciolongo N.C. *Mesotelioma pleurico maligno*. Italian Review of Respiratory Disease.; 33: fascicolo 5. (2018)
- Taglietti, V., Casella, C. *Fisiologia e Biofisica delle cellule*. Edises pp. 648. (2015)

- Visonà S., Capella S., Bodini S., Borelli P., Villani S., Crespi E., Frontini A., Colosio C., Belluso E. *Inorganic Fiber Lung Burden in Subjects with Occupational and/or Anthropogenic Environmental Asbestos Exposure in Broni (Pavia, Northern Italy): An SEM-EDS Study on Autoptic Samples.* (2021)
- Wigle, Donald T. *Cancer Mortality in Relation to Asbestos in Municipal Water Supplies.* *Archives of Environmental Health: An International Journal*, 32(4), 185–190. (1977)

13 SITOGRAFIA

- <https://bonifichesiticontaminati.mite.gov.it/sin-11/>
- https://it.wikipedia.org/wiki/Apparato_digerente
- <https://manualedelgeologo.it/riconoscimento-microscopico-dei-minerali/>
- <https://manualidimedicina.blogspot.com/2015/08/istologia-dellapparato-gastroenterico.html>
- <https://mazzavillani.blogspot.com/2011/01/le-parti-del-microscopio-ottico.html>
- <https://onanotiziarioamianto.it/anfiboli-amianto/>
- https://temi.camera.it/leg18/post/OCD15_14621/la-normativa-materia-amianto.html#:~:text=Riconosciuta%20la%20pericolosit%C3%A0%20dell'amianto,per%20il%20suo%20smaltimento%20controllato.
- <https://vittime-del-dovere.it/patologie-asbesto-correlate/>
- <https://www.aimac.it/libretti-tumore/il-mesotelioma/cos-e-mesotelioma>
- <https://www.aimac.it/libretti-tumore/il-mesotelioma/i-meccanismi-di-formazione-del-mesotelioma>
- <https://www.airc.it/cancro/informazioni-tumori/corretta-informazione/tutti-i-tipi-di-amianto-sonocancerogeni#:~:text=Il%20nome%20amianto%2C%20o%20asbesto,della%20larin ge%20e%20dell'ovaio>
- <https://www.comune.casale-monferrato.al.it/sin-territorio>
- https://www.disputer.unich.it/sites/st13/files/allegatiparagrafo/13-05-2016/apparato_digerente_2.pdf
- <https://www.funsci.it/files/o10-pol.pdf>
- https://www.gastroepato.it/stomaco_anatomia.htm
- <https://www.gavazzeni.it/enciclopedia/anatomia-corpo-umano/esofago/#:~:text=L'esofago%20%C3%A8%20composto%2C%20dall,sottomuco so%20che%20contiene%20ghiandole%20mucose>

- <https://www.infobuildenergia.it/approfondimenti/amianto-asbesto-storia-proprietadiffusione/#Le-patologie-sanitarie-derivanti-dall-esposizione-all-amianto>
- <https://www.jove.com/v/5656/scanning-electron-microscopy-sem-operation-image-analysis?language=Italian>
- https://www.malattierarepiemonte.it/obj/files/dcmt/2022.11.23.13.50.21_28-IT.pdf
- <https://www.microbiologiaitalia.it/microscopia/colorazione-ematossilina-eosina/>
- <https://www.mosaikosrl.net/normativa-smaltimento-eternit/#:~:text=257%3A%20la%20prima%20legge%20italiana,e%20la%20commercializzazione%20dell'amianto>
- <https://www.msmanuals.com/it-it/casa/disturbi-ormonali-e-metabolici/amiloidosi/amiloidosi#:~:text=L'amiloidosi%20%C3%A8%20una%20malattia,e%20la%20morte%20del%20soggetto>
- <https://www.my-personaltrainer.it/fisiologia/cistifellea-colecisti.html>
- <https://www.my-personaltrainer.it/salute-benessere/faringe.html>
- https://www.quadernodiepidemiologia.it/epi/cause/pos_hk.htm
- <https://www.regione.piemonte.it/web/sites/default/files/media/documenti/2019-03/SIN%20CASALE%20MONFERRATO.pdf>
- https://www.salute.gov.it/portale/temi/documenti/acquepotabili/parametri/Val_Amianto_documento_completo.pdf
- https://www.salute.gov.it/portale/temi/documenti/acquepotabili/parametri/Val_Amianto_documento_completo.pdf
- <https://www.sobrero.edu.it/wp-content/uploads/2017/05/LA-STRUTTURA-DEL-SERPENTINO.pdf>
- <https://www.spagliarisi.it/amianto/amianto-la-storia/>
- <https://www.unife.it/medicina/fisioterapia/minisiti-fe/anatomia-umana-e-istologia/modulo-di-anatomia-umana/digerente-2>

14 RINGRAZIAMENTI

Vorrei ringraziare in primis la mia famiglia, che mi ha sempre sostenuta nonostante le difficoltà che ho incontrato in questo percorso. A mia mamma e a mio papà che mi hanno sempre ascoltato e aiutato a trovare la soluzione migliore. Senza di voi non sarei riuscita a raggiungere questo traguardo tanto desiderato e sudato. A voi, specialmente, devo la mia seconda laurea.

Ai miei nonni che non ci sono più, soprattutto a mio nonno Paolo che ha assistito alla mia laurea triennale e non vedeva l'ora che io finissi gli studi. A te, posso dire finalmente di avercela fatta.

Ringrazio il mio relatore Alessandro Croce che mi ha permesso di svolgere il tirocinio, ed insieme a lui ringrazio anche il correlatore Antonio Calisi e la tutor esterna Donata Bellis. Ringrazio inoltre anche Laura, e i miei compagni Giada, Francesca ed Alessandro O. che hanno fatto parte del team di lavoro. Vi ringrazio per l'opportunità e per esservi resi sempre disponibili.

Ci tengo a ringraziare, in particolar modo, il mio ragazzo Alex, che mi ha sempre supportata e sopportata. Ti ringrazio per ogni volta che mi hai dato una spalla su cui piangere quando qualcosa mi turbava, per le domeniche pomeriggio passate ad aiutarmi a studiare e a ripetere anche se la maggior parte delle volte non sapevi neanche di cosa stessimo parlando, sacrificando il tuo tempo invece di uscire con gli amici, senza avermi mai fatto pesare nulla. Sei stato molto importante per il raggiungimento di questo mio traguardo.

Ringrazio anche la sua famiglia per avermi sempre incoraggiata a tenere duro.

Ai miei amici dell'università, specialmente ad Alice G. e Giada M. che hanno seguito le mie gioie, i miei scleri e i disagi fin dalla triennale, ma anche a tutte le altre persone che ho incontrato lungo il mio cammino, come quelli che io chiamo "i ragazzi del tirocinio", ovvero Francesco, Gaspar, Alessandra, Andrea, Igor che erano sempre lì pronti a darmi una mano quando più ne avevo bisogno. In realtà, avrei molte più persone da ringraziare ma sono talmente tante che preferisco ringraziare in modo generale tutti i miei colleghi che in un qualche modo hanno condiviso con me gioie, paure e ansie. Ammetto che tutto questo mi mancherà e porterò con me ogni ricordo possibile.

Ringrazio anche tutto il personale tecnico amministrativo che mi ha permesso di lavorare durante il mio periodo di studi. Ringrazio Marta, Paola, Marcella, Rosanna, Simona, Sabrina,

Giulia, Emanuela, Paolo, Alessandro, Valeria e Michela per l'opportunità, per i caffè, i tè, per le risate e per avermi fatta sentire parte del gruppo.

Infine, un ringraziamento lo voglio riservare a me stessa, per la mia resilienza, per non aver mollato nonostante ci siano stati periodi molto bui durante questo percorso, nel quale ho perso anche persone a me care. Ringrazio anche la mia testardaggine nel rifare gli esami millemila volte fino al raggiungimento del voto desiderato, arrivando allo sfinimento. Desideravo questo momento da tanto tempo e sono davvero fiera di aver dimostrato a me stessa di avercela fatta a pieni voti.

Ringrazio infine tutte le persone che hanno, fanno e faranno parte della mia vita. A tutti quelli che hanno creduto in me fin dall'inizio ma soprattutto a chi non ha mai creduto nelle mie capacità e mi ha sempre remato contro, a voi specialmente, dedico il mio traguardo.

Grazie a tutti per questo bellissimo viaggio insieme.