

PROGETTO: OMEOSTASI DEL FERRO A LIVELLO POLMONARE E PATOLOGIE ASBESTO CORRELATE: NUOVI APPROCCI PER LO SCREENING DELLA POPOLAZIONE DEGLI ESPOSTI.

-Premesse e Razionale (“Background”)

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un tumore raro ma estremamente aggressivo e lo scarso successo terapeutico fa della diagnosi precoce e dell'identificazione dei fattori di rischio individuali una pressante priorità.

Lo sviluppo del mesotelioma è legato all'inalazione di asbesto, con un periodo di latenza molto lungo dall'inizio dell'esposizione alla manifestazione clinica di questa patologia. Recentemente diversi studi suggeriscono che la suscettibilità a sviluppare il MPM possa essere trasmessa geneticamente (Neri et al, Mutat Res. 2008, 659:126-136; Matullo et al, PLoS One 2013, 8:e61253; Cadby et al. 2013, 82:1-8).

Recentemente il nostro gruppo di ricerca ha identificato tre geni associati al metabolismo del ferro che risultano significativamente associati alla protezione nei confronti dello sviluppo del MPM, confermando il potenziale ruolo che il sovraccarico di ferro polmonare svolge nella patogenesi del mesotelioma e suggerendo un loro possibile ruolo come marcatori di protezione nei confronti di questo tumore aggressivo (Crovella et al. 2016, J Toxicol Environ Health A, 79:129-141).

-Ipotesi scientifica alla base del progetto

Il nostro precedente studio si è avvalso della casistica presente negli archivi dell'Anatomia patologica degli Ospedali di Monfalcone e Gorizia, che ci ha consentito di esaminare ottantasei varianti (polimorfismi a singolo nucleotide=SNPs) di 10 geni del metabolismo del ferro, in campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina (residui di indagini autoptiche) di due gruppi di individui (con segni obiettivi di esposizione all'amianto): un gruppo costituito da individui esposti all'amianto e deceduti per MPM ed un altro gruppo costituito da individui che sono stati ugualmente esposti all'amianto, ma non hanno sviluppato MPM e sono deceduti in tarda età per patologie non amianto correlate.

Dal confronto fra questi due gruppi sono state identificate delle varianti genetiche, localizzate nel gene per la catena pesante della ferritina, nel gene per la transferrina e in quello per l'efestina, le cui frequenze risultano diversamente distribuite nei due gruppi e che sono risultate associate in modo significativo alla protezione nei confronti del MPM e che potrebbero quindi essere considerate possibili marcatori genetici di protezione.

Questo studio pilota si è avvalso di solo una piccola parte dell'amplicissima casistica presente negli archivi dell'Anatomia Patologica degli Ospedali di Monfalcone e Gorizia, le cui enormi potenzialità potrebbero essere ulteriormente sfruttate da un più ampio studio di epidemiologia molecolare esteso anche al carcinoma polmonare (CP), un'altra neoplasia amianto- correlata per la quale la predisposizione genetica risulta ancora non ben definita.

- Obiettivi, descritti come obiettivi generali del progetto

Il tema che il presente progetto intende affrontare si articola in due obiettivi principali.

- 1) Screening genetico e biologico per l'individuazione di soggetti a rischio di sviluppare neoplasie amianto-correlate (MPM e CA) in seguito all'esposizione all'amianto: genetica della ferritina, transferrina ed efestina (e di altri geni coinvolti nell'omeostasi del ferro) e di possibili geni candidati per essere correlati all'attivazione di carcinogeni.

Individuare un'associazione tra determinate varianti genetiche e la suscettibilità individuale di sviluppare neoplasie amianto-correlate consentirebbe di programmare la sorveglianza sanitaria degli ex-esposti all'amianto (circa 7000 in FVG, concentrati nelle province di Gorizia e Trieste) secondo uno schema graduato.

- 2) Analisi dei cambiamenti metabolici indotti dalle mutazioni nel gene per l'efestina, recentemente associate ad una protezione nei confronti dello sviluppo del mesotelioma pleurico in seguito all'esposizione all'amianto e loro possibili implicazioni terapeutiche.

L'individuazione del ruolo funzionale della variante genetica dell'efestina associata alla protezione nei confronti del MPM, potrebbe permettere il concepimento di un nuovo approccio terapeutico di prevenzione negli individui ex-esposti, basato sull'impiego di chelanti del ferro e antiossidanti, come recentemente proposto da alcuni studi preclinici [Nagai et al, 2013, Cancer Prev Res (Phila), 6:1222-1230; Toyokuni, 2011, Free Radic Res., 45:906-917 e 2014, Redox Rep. 19:1-7].

-Materiali e metodi, comprensivi del materiale oggetto dello studio, degli esami e delle analisi necessari per condurre lo studio, delle metodologie di ricerca (descrizione del metodo di laboratorio o del questionario o dell'indagine o delle attività, eccetera).

Epidemiologia molecolare

Intendiamo analizzare ottantasei varianti di 10 geni del metabolismo del ferro e 2 varianti di un gene coinvolto nel metabolismo dei carcinogeni (fumo di sigaretta) in campioni di DNA ottenuti da tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina (residui di indagini autoptiche presso l'Anatomia Patologica degli Ospedali di Monfalcone e Gorizia) di due gruppi di individui con segni obiettivi di esposizione all'amianto e sua caratterizzazione:

- Gruppo di studio, individui esposti deceduti per mesotelioma pleurico o carcinoma polmonare (diagnosi ottenuta mediante esame istologico e/o analisi immunostochimica).

- Gruppo di controllo: individui esposti deceduti in tarda età (>75 anni) per patologie non amianto-correlate appartenenti allo stesso gruppo etnico e residenti nella medesima regione del gruppo di studio. I controlli dovranno essere altrettanto numerosi quanto i il gruppo di studio.

In entrambe i gruppi l'esposizione è determinata dalla storia lavorativa, dalla presenza di placche ialine della pleura di diametro superiore ai 4cm e dalla caratterizzazione mineralogica del contenuto di amianto polmonare. In particolare verrà determinata la conta del numero dei corpi dell'asbesto per grammo di tessuto polmonare secco, effettuata con metodologie standardizzate (Istituto Superiore di Sanità, *Asbestos bodies in human lung tissue and biological fluids: analytical method and photo atlas*. Biofibre Working group 2017, iv, 58 p. Rapporti ISTISAN 17/12) al fine di stabilire post-mortem il tipo di esposizione (elevata/occupazionale o non elevata/ambientale) e la conta del numero e della tipologia di fibre (a carico polmonare di amianto).

La raccolta e la processazione del materiale avverrà nel totale rispetto della legge sulla "privacy". Lo studio è stato già approvato dal Comitato Etico Indipendente dell'ASS2 (Prot. N. 8830) e dal comitato etico regionale (CEUR 2016-Os-079-UnivTS). Si allega (Allegato a) la scheda di raccolta dati.

Campioni: prelievi autoptici (di tessuto incluso in paraffina non interessato dalla neoplasia) disponibili quali residui delle analisi autoptiche.

Analisi genetiche

Per quello che la variabilità dei geni legati al metabolismo del ferro verranno individuati grazie alla tecnica di real-time PCR, che permette di visualizzare le variazioni di singole basi in modo veloce e poco costoso.

Una seconda parte dello studio di epidemiologia molecolare consisterà nell'utilizzo del materiale genetico ottenuto nel precedente studio al fine di individuare altri possibili marcatori genetici della suscettibilità al MPM a seguito di esposizione all'amianto. Per questo verranno utilizzati i kit Infinium Multi-Ethnic EUR/EAS/SAS-8 che permettono una copertura di più di 1,4 milioni di loci diversi. Questi kit sono focalizzati su una popolazione etnicamente mista, fornisce la possibilità di identificare associazioni genetiche con tratti comuni e rari. Nel kit sono stati selezionati una serie di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) individuati come rappresentativi di regioni del genoma (TAG SNPs). In questo modo è possibile identificare variazioni genetiche senza genotipizzare l'intero genoma, riducendo il tempo e il costo necessario all'analisi.

Lo studio si propone quindi di utilizzare questi kit per individuare regioni del genoma associate con minore o maggiore rischio di MPM, utilizzando un numero preliminare di individui (50). L'analisi preliminare di questi 50 individui permetterebbe di determinare quali regioni del genoma sono possibili associate con una variabilità del rischio per MPM, fornendo la base per un successivo screening con un numero maggiore di individui in queste regioni.

Trasfezione di linee cellulari con la proteina Heph

L'obiettivo di questo progetto è l'analisi dei cambiamenti a carico del metabolismo del ferro indotti da mutazioni nel gene per l'efestina (Heph). A questo scopo verranno utilizzate due linee cellulari per simulare il tessuto polmonare: le A549, una linea di adenocarcinoma di cellule alveolari basali e le MeT5A, una linea di mesotelio immortalizzata. In queste due linee cellulari sarà overespressa, in modo transiente, la proteina Heph, sia in forma wild-type che in forma mutata.

All'inizio verrà verificato che la proteina wild-type soverespressa non sia tossica per le cellule, controllando la vitalità cellulare con il saggio MTT. Lo stesso test verrà ripetuto con la proteina mutata; questo saggio serve anche per ottimizzare le condizioni di trasfezione. Successivamente, nelle due linee cellulari trasfettate transientemente con Heph wild-type o mutata, verrà valutato lo stato di ossidazione del ferro [misurando la quantità di ione ferroso (Fe^{2+}) o ferrico (Fe^{3+})] utilizzando saggi colorimetrici. Questa serie iniziale di esperimenti determinerà gli effetti nel metabolismo cellulare di una variazione di attività della Heph.

Se il saggio MTT avrà messo in evidenza un'augmentata tossicità della Heph mutata, questo dato sarà ulteriormente perfezionato utilizzando il test dell'annessina/propidio per determinare se la morte cellulare è di tipo apoptotico.

Questi esperimenti verranno ripetuti in presenza di diverse fibre di amianto (crisotilo, amosite, crocidolite, antofillite) caratterizzate da un diverso contenuto di ferro, allo scopo specifico di analizzare il ruolo di questo elemento in presenza di Heph mutata. In particolare si determinerà se le diverse forme di amianto giocano un ruolo importante nel cambiamento del metabolismo cellulare indotto da Heph mutata. In correlazione con questi esperimenti, il ruolo delle specie reattive dell'ossigeno (ROS) verrà esaminato; i ROS possono essere generati da Fe^{2+} attraverso reazioni di Fenton o simili, quindi, in caso di sovraccarico di ione ferroso, è ipotizzabile un aumento di ROS.

Attraverso l'uso di specifici coloranti, come la 2',7'-dichlorodidrossifluoresceina o il diidroetidio, è possibile quantificare l'aumento di ROS indotti da sovraccarico di ferro. Questi esperimenti permetteranno dunque di correlare l'aumento di ROS con l'accumulo di ioni ferroso e ferrico, dando la possibilità di verificare l'ipotesi patogenetica (presenza di Heph mutata con o senza fibre di asbesto → accumulo ioni Fe^{2+} e Fe^{3+} → aumento ROS → morte apoptotica).

Al fine di migliorare la comprensione dei meccanismi patogenetici coinvolti, nelle due linee cellulari esperimenti transientemente la proteina Heph (wild-type o mutata) verrà valutata la presenza di marcatori dell'infiammazione, specificamente interleuchina 1-b, TNF-a e IL-6, dopo esposizione ai diversi tipi di fibre di amianto. Un aumento di ROS

può infatti determinare un aumento dei mediatori infiammatori, causando uno stato cronico di infiammazione, risultante in un aumentato danno tissutale.

Inoltre, considerando il ruolo fondamentali dei mitocondri nel rendere il Fe biodisponibili attraverso i centri Fe-S presenti nella catena respiratoria e l'attività di produzione di ROS propria del metabolismo mitocondriale, verrà esaminata la morfologia e la distribuzione di questi organelli, attraverso tecniche di microscopia confocale.

- Modalità di misurazione dei risultati

Per quello che riguarda l'analisi genetica, la variabilità dei geni legati al metabolismo del ferro verranno individuati grazie alla tecnica di real-time PCR, che permette di visualizzare le variazioni di singole basi in modo veloce e poco costoso. Invece, per quello che riguarda l'analisi a più ampio raggio di epidemiologia molecolare, la tecnologia Illumina è già ampiamente descritta da diverse fonti. In breve, questa tecnologia consiste nell'utilizzo di "biglie" del diametro di circa 3 μ m su cui sono immobilizzate centinaia di migliaia di copie di uno specifico oligonucleotide che agiscono come una sorta di "trappola" per le sequenze di DNA genomico. Le biglie sono disposte su un chip ad alta densità e quando "catturano" una specifica sequenza emettono fluorescenza. In questo modo è possibile identificare milioni di loci di DNA in un singolo esperimento. La trasfezione della proteina Heph verrà effettuata con tecnologie di trasferimento genico ampiamente utilizzate, ovvero l'utilizzo di liposomi. Per l'analisi della vitalità cellulare, con il metodo MTT, verrà utilizzato uno specifico lettore di piastre che consente la determinazione dell'assorbanza a diverse lunghezze d'onda, mentre l'analisi di annessina-propidio verrà effettuata utilizzando un citofluorimetro. Per determinare la concentrazione di Fe verrà utilizzato un colorante (Phen Green FL) la cui fluorescenza diminuisce all'aumentare della concentrazione dello ione. Invece, per determinare le concentrazioni di ROS verranno usati due coloranti diversi, la 2',7'-dichlorodidrofluoresceina e il diidroetidio, la cui fluorescenza verrà misurata con citofluorimetro.

La valutazione dei marcatori infiammatori verrà effettuata con real-time PCR effettuata sul RNA messaggero delle cellule sovraesprimenti la Heph, così da ottenere una misura semiquantitativa dell'espressione dei geni collegati all'infiammazione.

Inoltre, l'analisi della morfologia mitocondriale sarà effettuata grazie all'utilizzo di un colorante specifico per i mitocondri; dopo successiva fissazione, la morfologia sarà valutata grazie all'utilizzo di un microscopio confocale, che permette di ricostruire tridimensionalmente la struttura dei mitocondri.

- Analisi statistica.

L'analisi di 250 campioni sia del gruppo di studio che del gruppo di controllo permetterà di ottenere una differenza statisticamente significativa sui 10 geni del metabolismo del ferro con una probabilità del 80%, considerando un aumento/diminuzione del rischio di 2 volte. (Menashe I, Rosenberg PS, Chen BE. PGA: power calculator for case-control genetic association analyses. BMC Genetics. 2008). In questo modo lo studio avrà la possibilità di ottenere alcuni possibili marcatori per valutare la suscettibilità al MPM.

La successiva analisi di marcatori genici su tutto il genoma, utilizzando 50 individui, permetterà di ottenere risultati statisticamente significativi con una probabilità del 90% con un aumento/diminuzione del rischio di 3 volte per marcatori con una frequenza dell'allele minore $> 0,1$. (Menashe I, Rosenberg PS, Chen BE. PGA: power calculator for case-control genetic association analyses. BMC Genetics. 2008) Considerando che verranno analizzati un numero di marcatori > 1.7 milioni, le probabilità di trovare alcuni marcatori associati con un cambiamento del rischio di sviluppare MPM appaiono statisticamente positive.

Per l'analisi dei cambiamenti metabolici indotti da Heph, verrà utilizzato il test di Kruskal-Wallis, in quanto dato il ridotto numero di osservazioni, è improbabile che i dati abbiano una distribuzione normale; questo sarà seguito dal test di Dunn (non-parametrico) per individuare in modo obiettivo le differenze fra i gruppi.

Allegato a

SCHEMA RACCOLTA DATI

STUDIO: Omeostasi del ferro a livello polmonare e patologie asbesto correlate: nuovi approcci per lo screening della popolazione degli esposti

Scheda raccolta dati

paziente n°

Data di nascita .../.../.....

Data di morte .../.../.....

Sesso M F

Professione (se disponibile) nella scheda relativa all'autopsia

Fumo SI NO se si N° sigarette/die.....

Criteri di inclusione per i soggetti appartenenti al gruppo di controllo

- Il soggetto afferente al gruppo di controllo è arruolabile solo se è deceduto ad un'età anagrafica ≥ 75 aa
- Presenza di placche pleuriche di grado ≥ 2 grado 2 grado 3
- Presenza di corpi dell'asbesto nelle sezioni istologiche polmonari: SI NO
- Carico di corpi dell'asbesto a livello polmonare (valutati secondo il protocollo messo a unto dal gruppo di studio *Biofibre* afferente all'Istituto Superiore di Sanità).
N°corpi/gr tessuto polmonare secco =
- Decesso per patologie diverse dalle seguenti patologie asbesto correlate: mesotelioma (pleurico, peritoneale e pericardico) carcinoma polmonare, carcinoma della laringe, carcinoma dell'ovaio ed asbestosi. Causa del decesso (specificare)

Criteri di inclusione per i soggetti appartenenti al gruppo di studio

- Presenza di placche pleuriche di grado ≥ 2 grado 2 grado 3
- Presenza di corpi dell'asbesto nelle sezioni istologiche polmonari: SI NO
- Carico di corpi dell'asbesto a livello polmonare (valutati secondo il protocollo messo a unto dal gruppo di studio *Biofibre* afferente all'Istituto Superiore di sanità).
N°corpi/gr tessuto polmonare secco =
- Decesso attribuito alle seguenti patologie asbesto correlate:
mesotelioma pleurico maligno carcinoma polmonare
- Diagnosi istologica di:
mesotelioma pleurico maligno carcinoma polmonare