

WORKSHOP

*“CANC TUM 2021 – WORKSHOP DI AGGIORNAMENTO SUI CANCEROGENI
OCCUPAZIONALI E SUI TUMORI CHE AD ESSI CONSEGUONO – TUMORI -”*

23 giugno 2021

Studio SEM-EDS sul contenuto polmonare di 72 soggetti esposti ad amianto durante l'attività di una ditta produttrice di manufatti in cemento amianto del Nord Italia: risultati ottenuti e prospettive di ricerca.

Silvia Damiana Visonà

Sezione di Medicina Legale e Scienze Forensi (Università di Pavia)

MESOTELIOMA MALIGNO

- Agente eziopatologico noto: AMIANTO.
- Ampia diffusione dell'amianto su scala mondiale (Russia, Asia centrale, Cina, Sudamerica).
- Prognosi infausta nonostante i progressi nella terapia antitumorale.
- Latenza estremamente lunga (30-40 anni).

FATTORI PREDISPONENTI ALLO SVILUPPO DI MESOTELIOMA

- 5%-17% delle persone esposte ad amianto sviluppano mesotelioma.
- Alcune persone esposte a dosi di amianto molto basse (o con anamnesi negativa per esposizione) sviluppano mesotelioma.

PERCHÈ?

SUSCETTIBILITÀ GENETICA ALLO SVILUPPO DI MESOTELIOMA MALIGNO

- Mutazioni germline di **BAP-1** (BRCA1-associated protein 1).
- SNPs in alcuni geni coinvolti nella detossificazione dei radicali dell'ossigeno, nei meccanismi di riparazione del DNA, nel metabolismo del ferro.
- **Studi GWAS**

PARTE 1

Analisi SEM-EDS delle fibre inorganiche in campioni autoptici di polmone

SOGGETTI DELLO STUDIO

- 188 casi di decesso per ARDS (MM, asbestosi e k polmonare) nell'area di Broni (PV) sottoposti ad autopsia giudiziaria presso la Sezione di Medicina Legale di Pavia (2005-2018).
- Per ciascun caso:
 - ✓ Esame istologico e immunoistochimico
 - ✓ Prelievo dei polmoni in toto, fissati in formalina e conservati.
 - ✓ Anamnesi patologica e lavorativa disponibile dall'archivio.



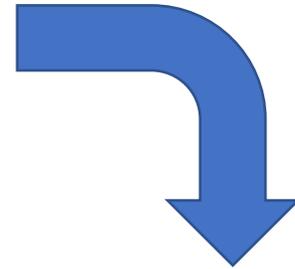
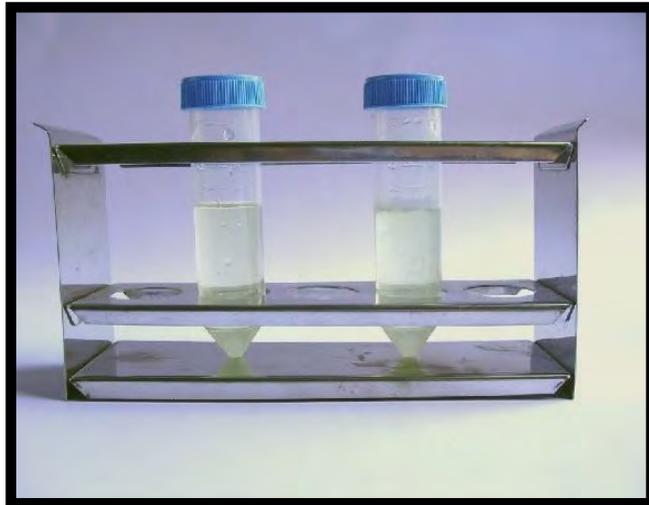
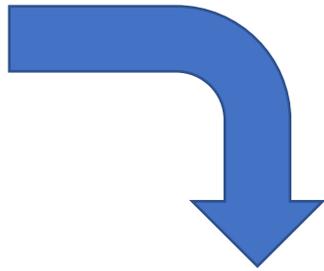
SCOPO DELLO STUDIO (1)

Analisi sistematica del residuo polmonare inorganico su tutti i casi autoptici di malattie amianto-correlate afferenti alla Sezione di Medicina Legale e Scienze Forensi dell'Università di Pavia (n=188) mediante microscopia elettronica a scansione analitica.

- Concentrazione fibre di amianto per grammo di tessuto polmonare secco
 - Dimensioni fibre (lunghezza e larghezza)
 - Determinazione della specie mineralogica

PREPARAZIONE DEI CAMPIONI:

digestione chimica della frazione organica (sodio ipoclorito) e filtrazione della sospensione ottenuta attraverso una membrana di policarbonato con pori di 0,4 micron.



MATERIALI E METODI

Original Paper

Assessment of Inorganic Fibre Burden in Biological Samples by Scanning Electron Microscopy – Energy Dispersive Spectroscopy

**Elena Belluso^{1,3,4,*}, Donata Bellis^{2,3}, Elisa Fornero^{1,3}, Silvana Capella^{1,3},
Giovanni Ferraris^{1,3,4}, and Sergio Coverlizza²**

¹ Dipartimento di Scienze Mineralogiche e Petrologiche, Università degli Studi di Torino, I-10125 Torino, Italy

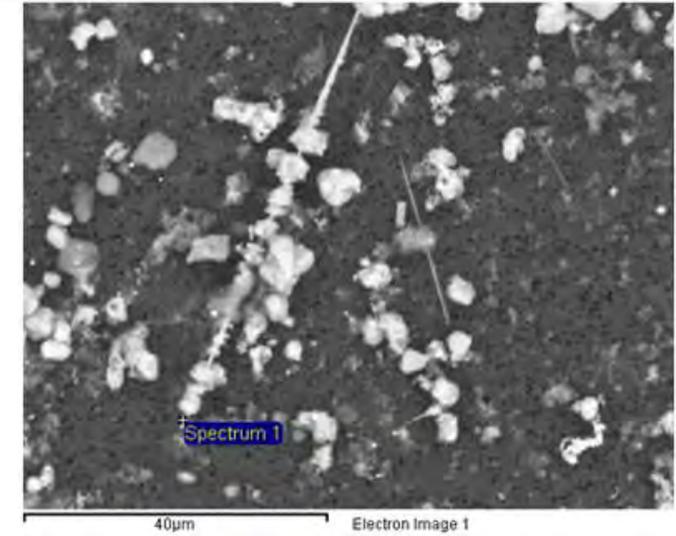
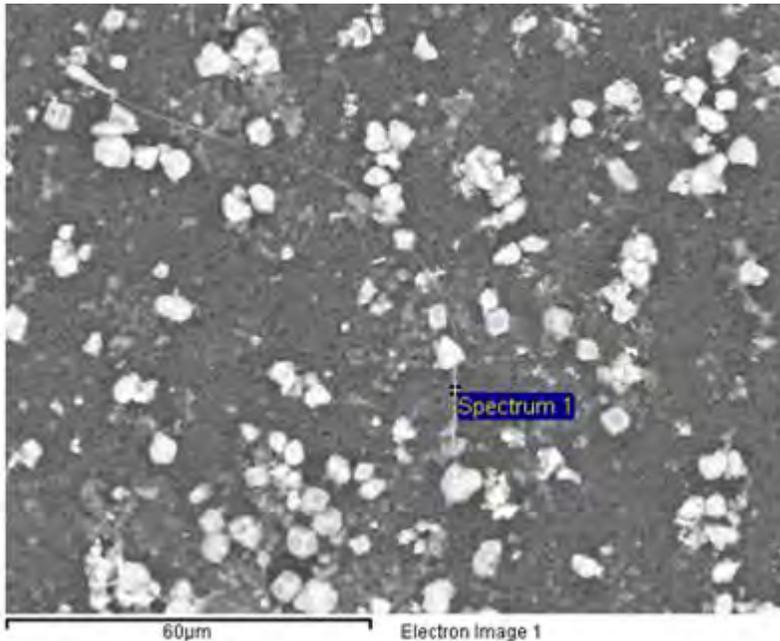
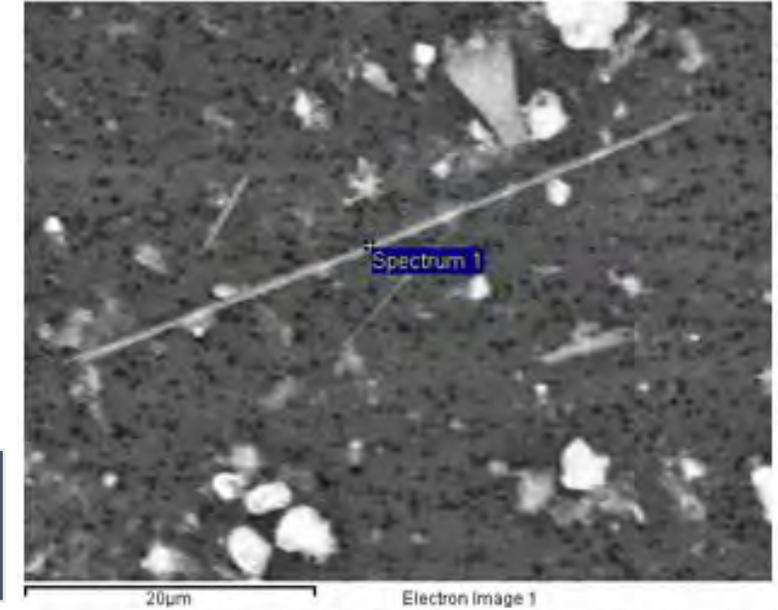
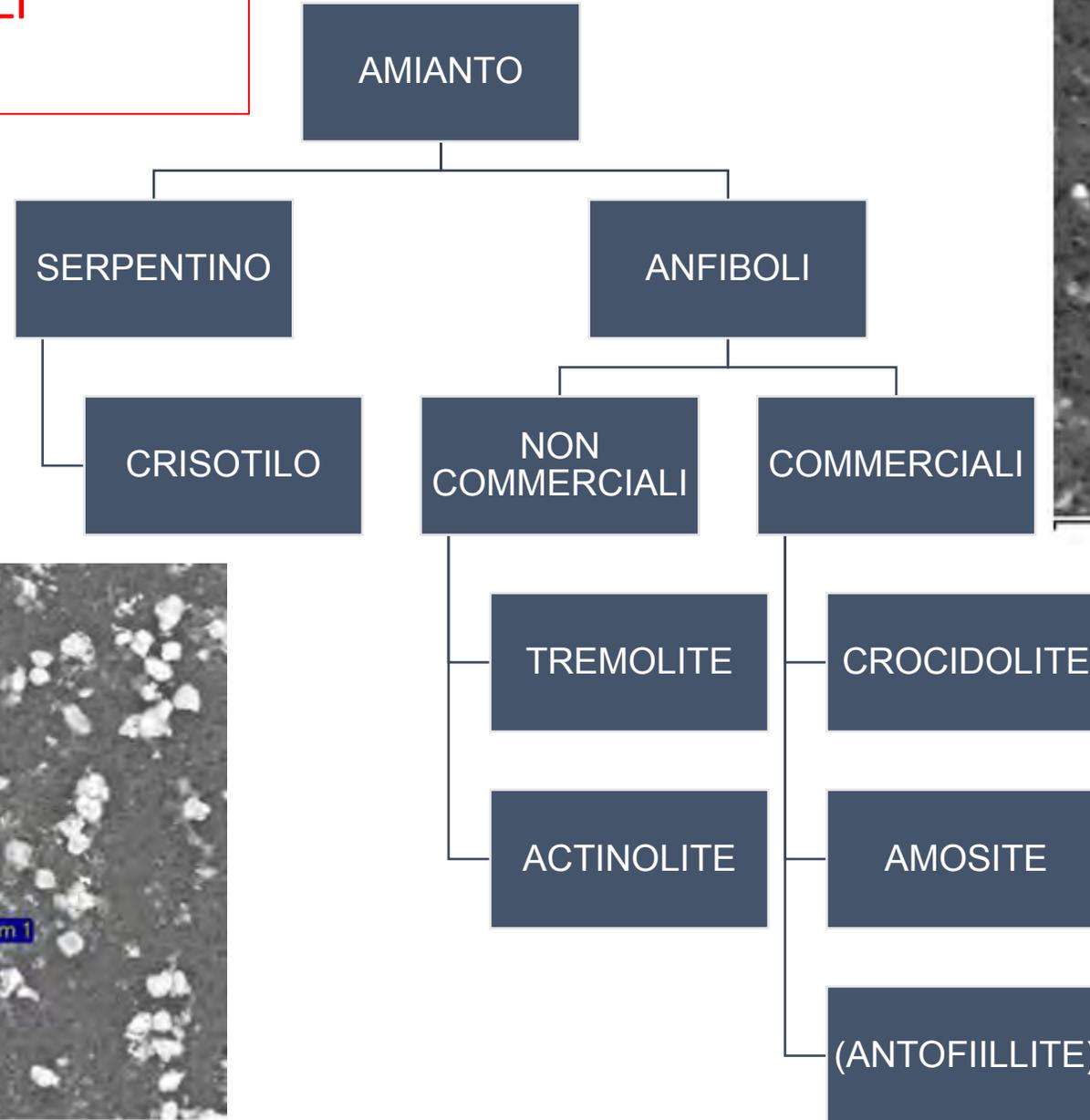
² Servizio di Anatomia, Istologia Patologica e Citodiagnostica, Azienda Ospedaliera San Giovanni Bosco, ASL 4-Torino, Italy

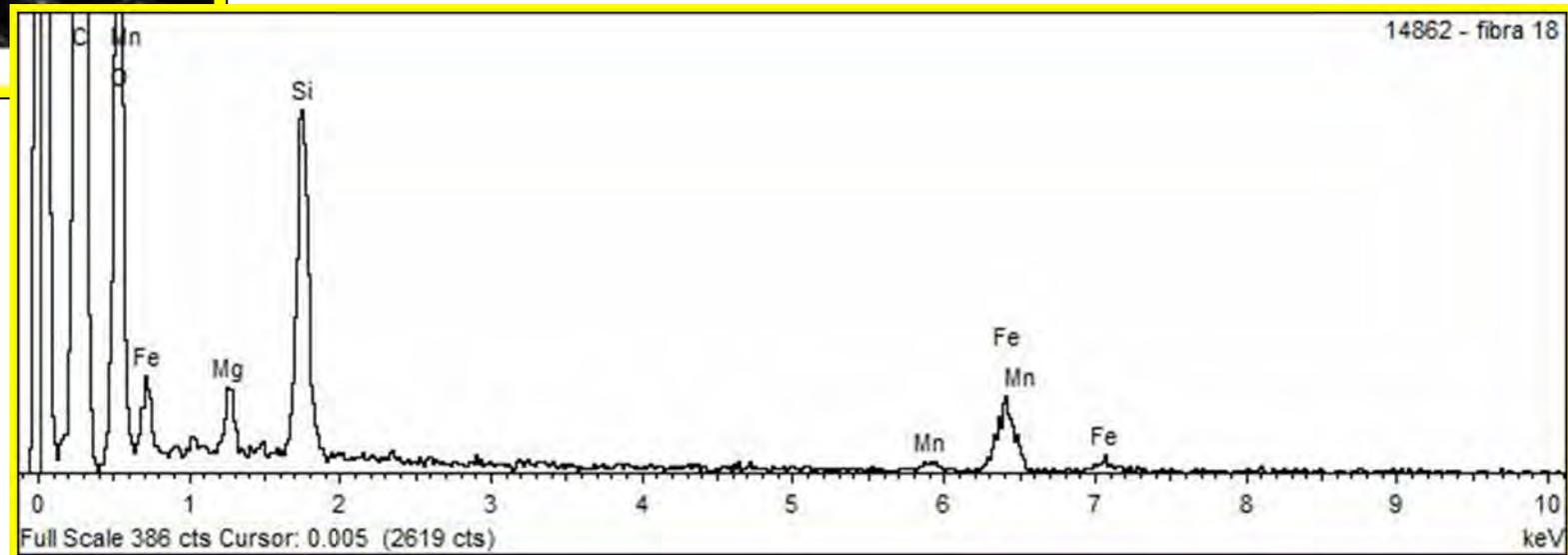
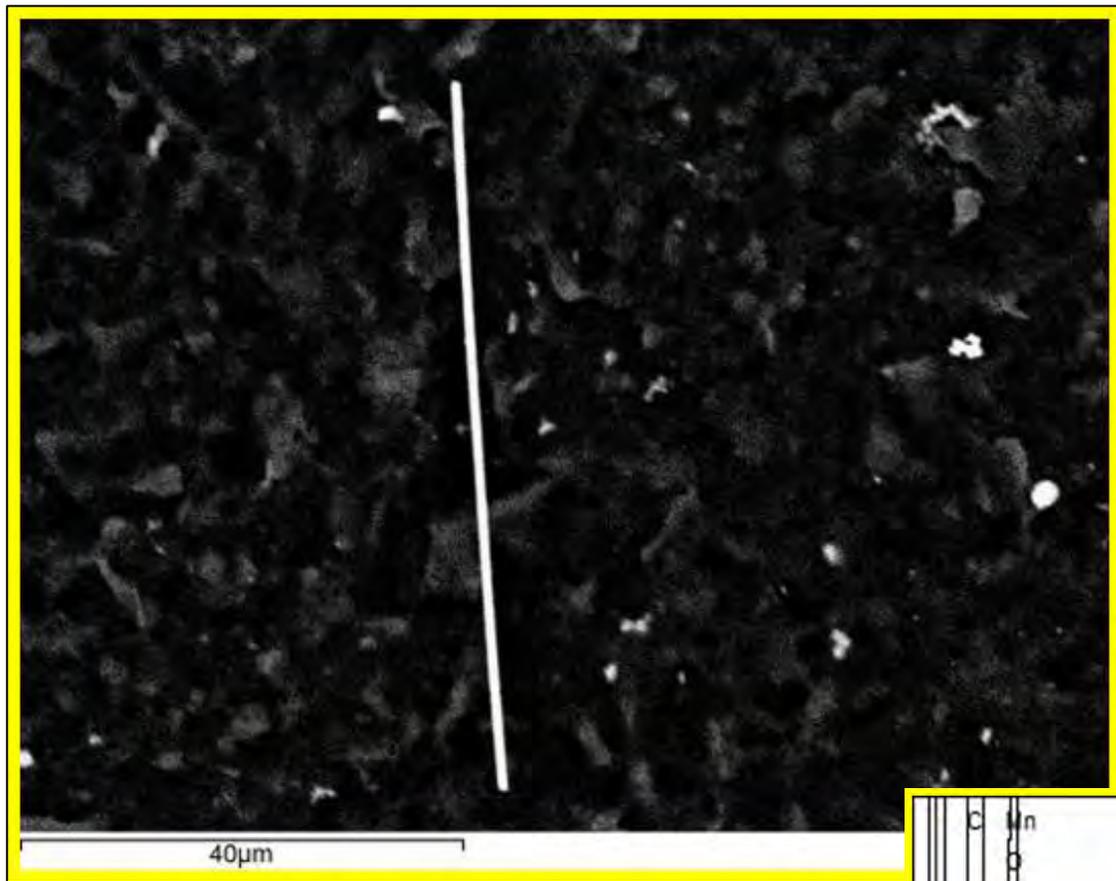
³ Centro Interdipartimentale per lo Studio degli Amianti e di altri Particolati Nocivi “Giovanni Scansetti”,
Università degli Studi di Torino, Torino, Italy

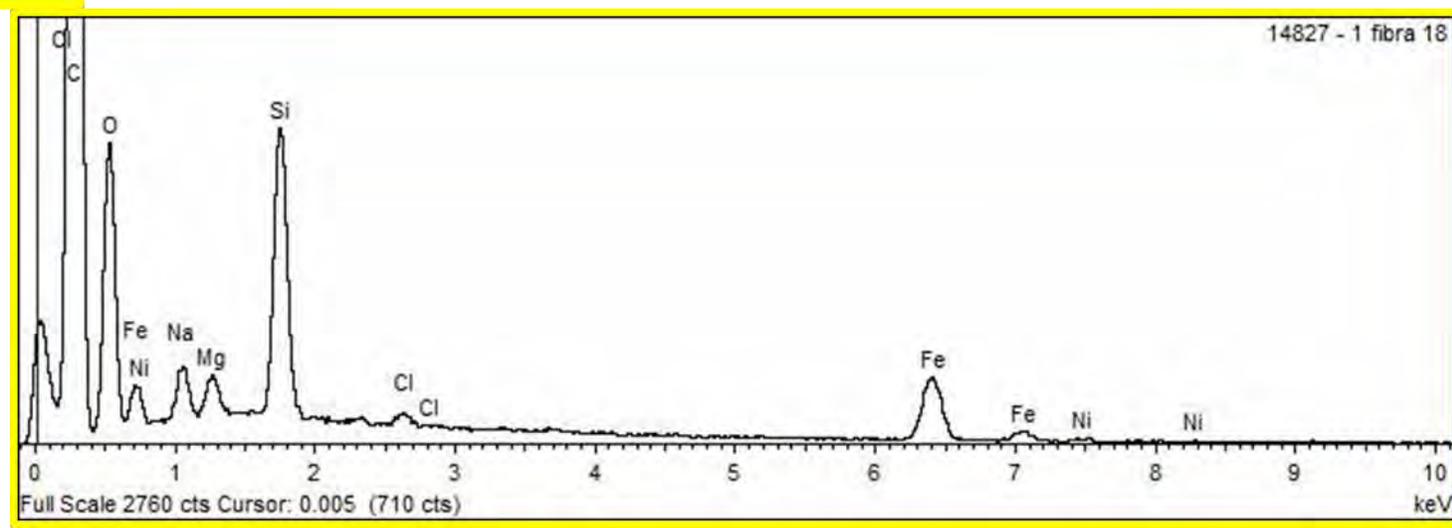
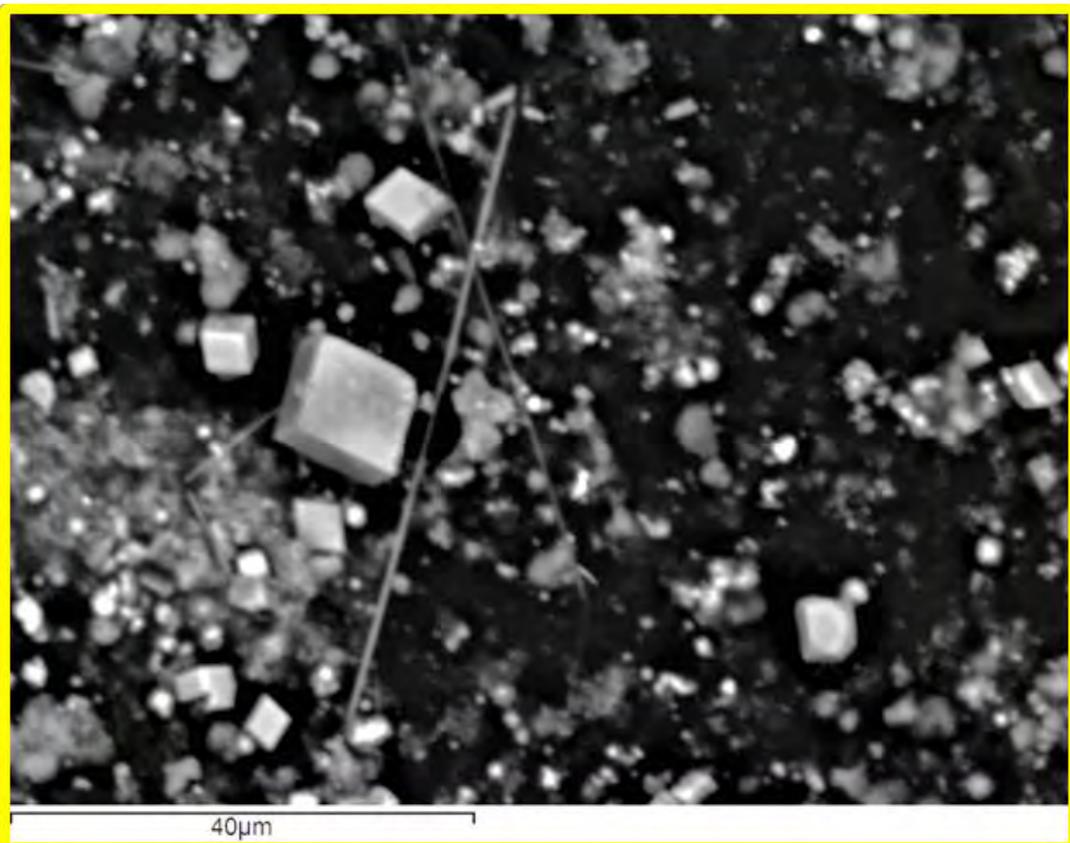
⁴ CNR-IGG, Sezione di Torino, Italy

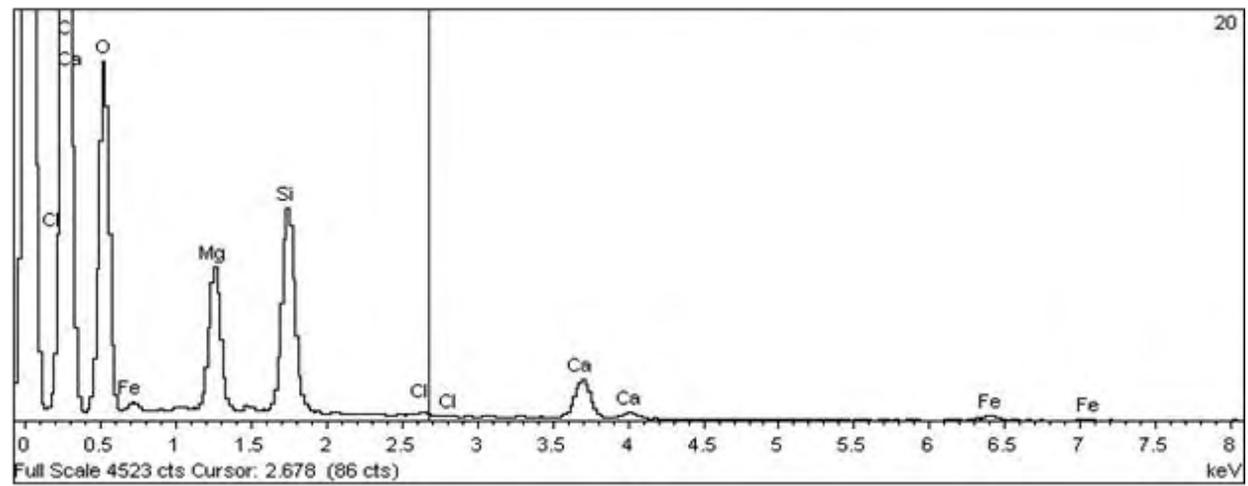
- Osservazione di un'area di 2mm² a 2000x: conteggio, misurazione e classificazione fibre (> 5 µm e lunghezza/larghezza >3)
- Standardizzazione dei risultati riferendoli a fibre/grammo di tessuto polmonare secco

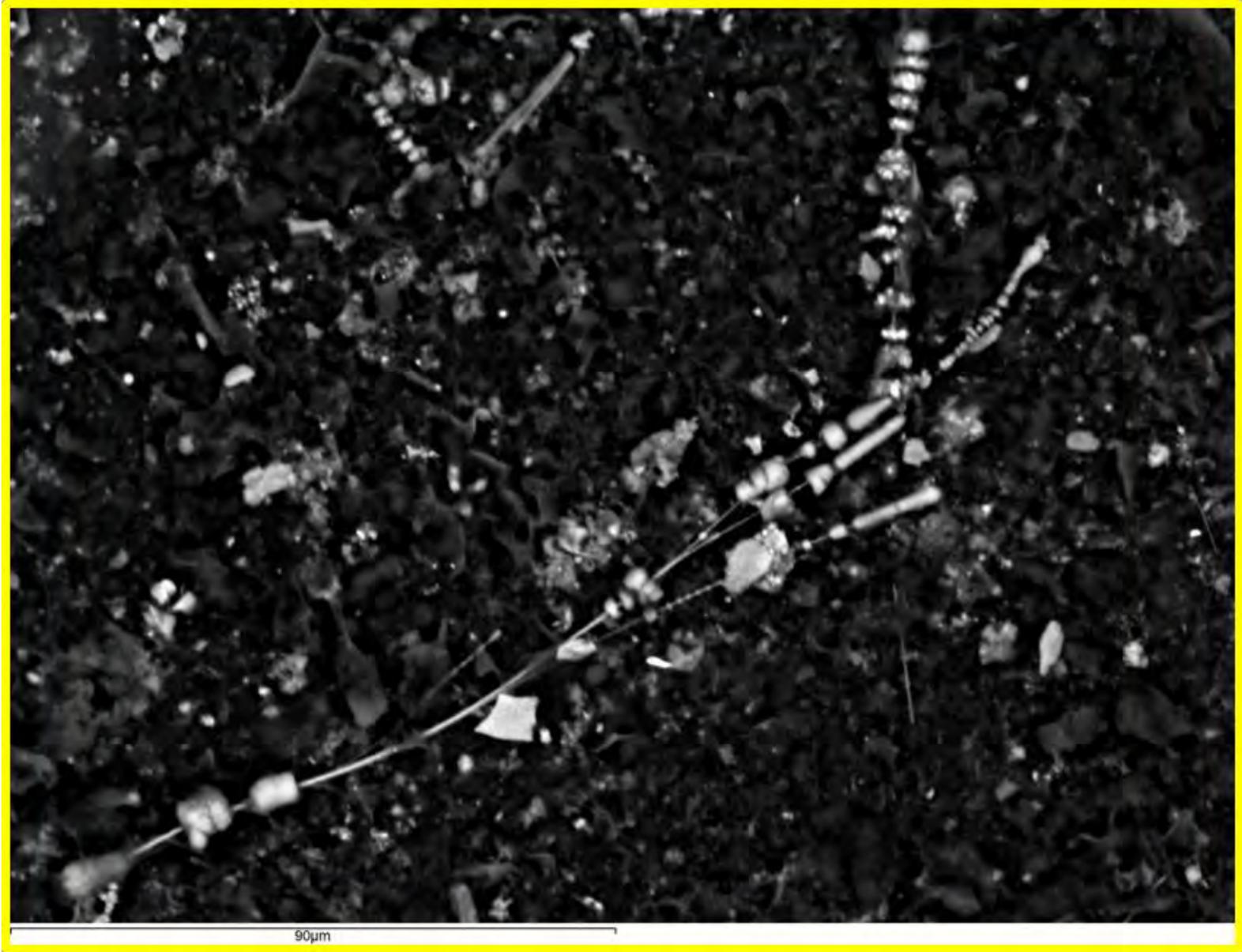
CLASSIFICAZIONE MINERALOGICA DEGLI AMIANTI













COXEM

15.0[KV]

SP=13.0

WD=11.2

x2.6k

10[um]

HV

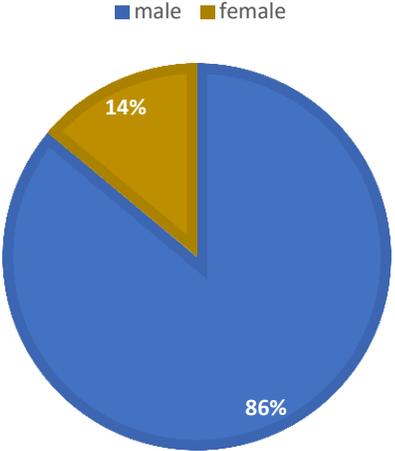
BSEI

9/3/2019

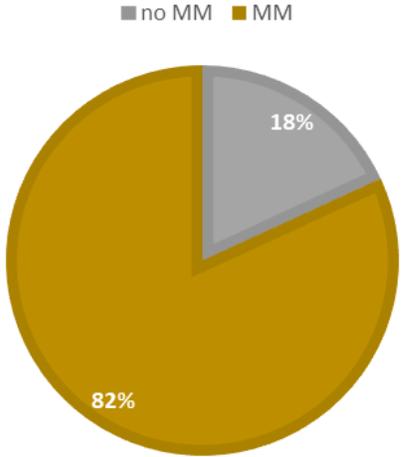
RISULTATI (1)

DATI DEMOGRAFICI E ANAMNESTICI DEI 72 SOGGETTI FINORA ESAMINATI

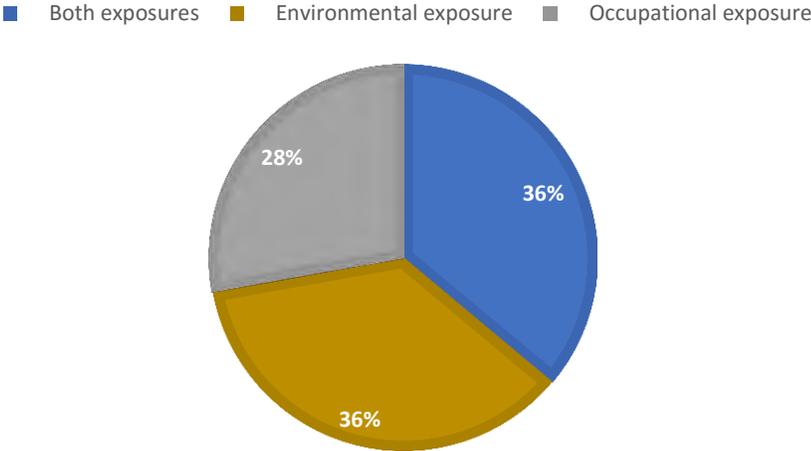
SESSO (N=72)



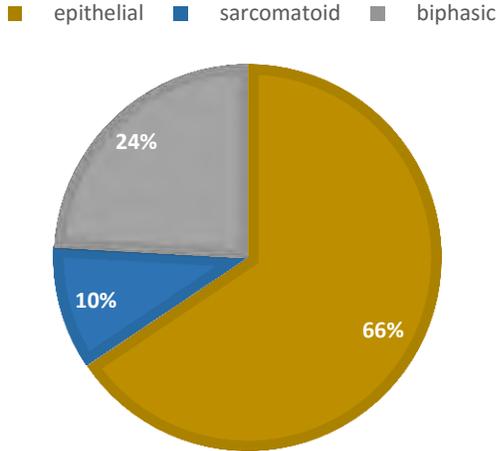
CAUSE OF DEATH (N=72)



TIPO DI ESPOSIZIONE AD AMIANTO (N=72)



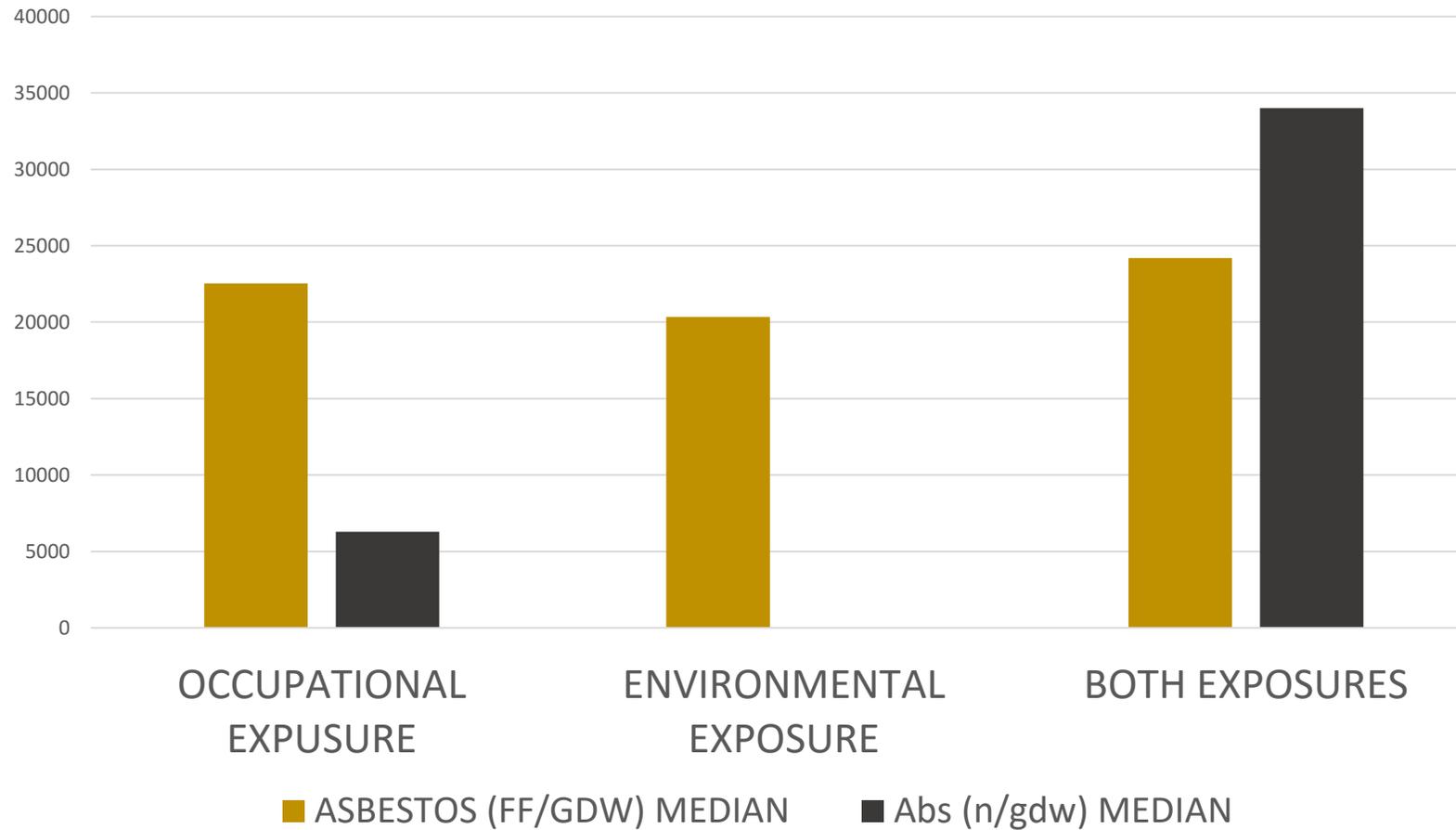
TIPO ISTOLOGICO DI MESOTELIOMA (N=59)



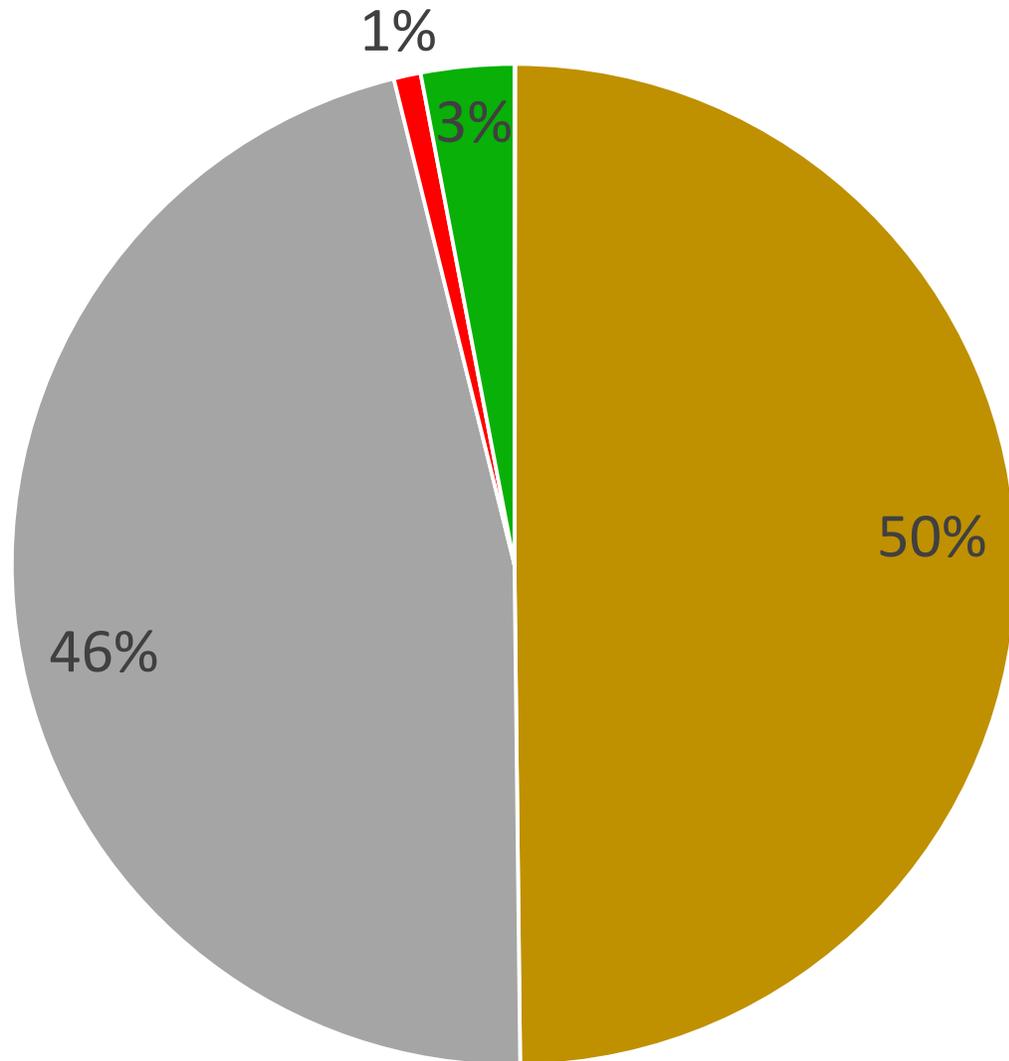
PRINCIPALI RISULTATI DELLO STUDIO SEM-EDS

- FIBRE LIBERE > CDA NEL 77,8% DEI CASI
- RAPPORTO FIBRE LIBERE/CORPUSCOLI ESTREMAMENTE VARIABILE (0,085 – 157)
- 19,4% DEI CASI ESAMINATI: non sono state rilevate fibre né corpuscoli.

CONCENTRAZIONE DI FIBRE E CORPUSCOLI E TIPO DI ESPOSIZIONE (MEDIANA)

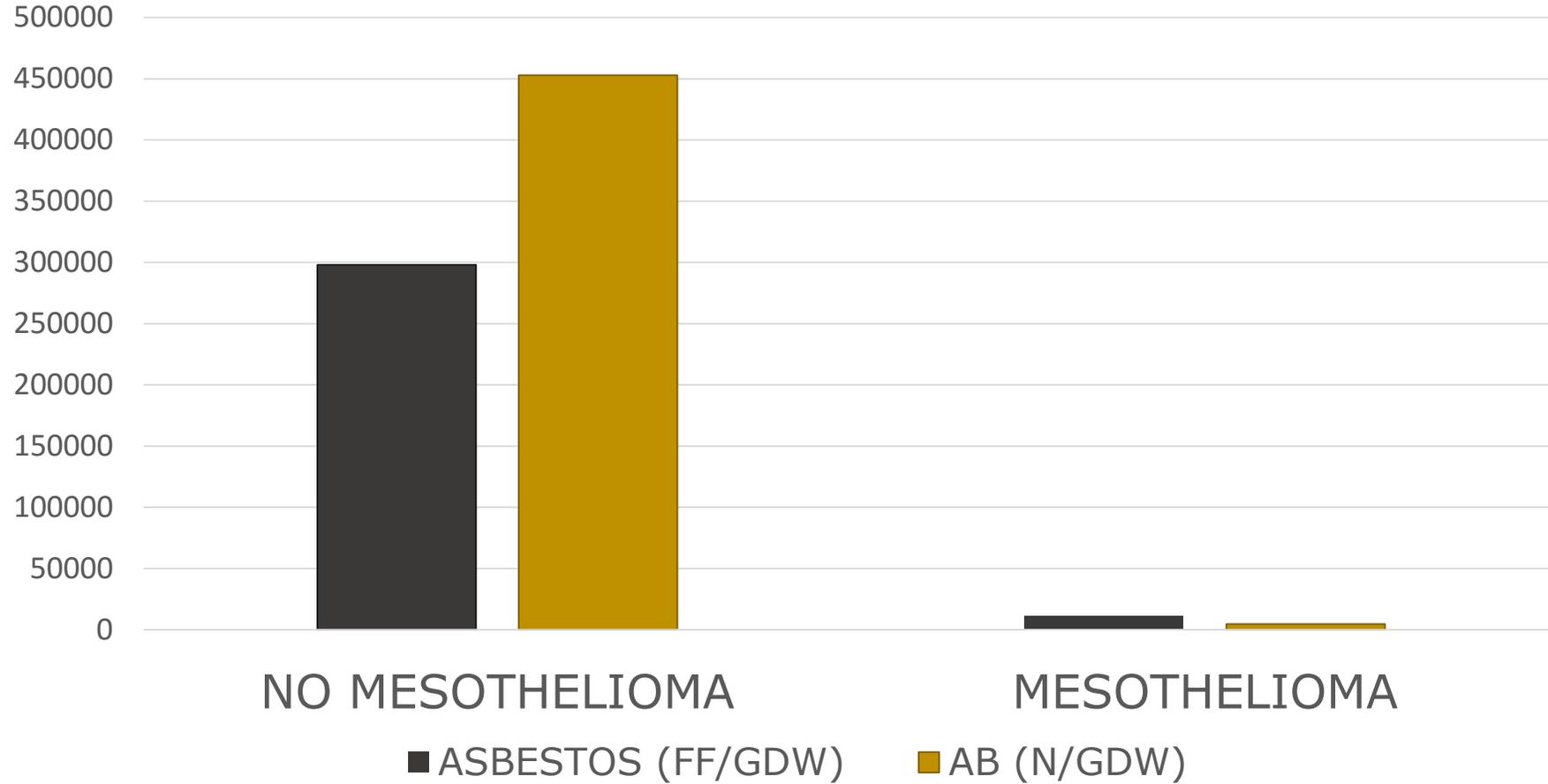


TIPOLOGIE DI AMIANTO RILEVATO

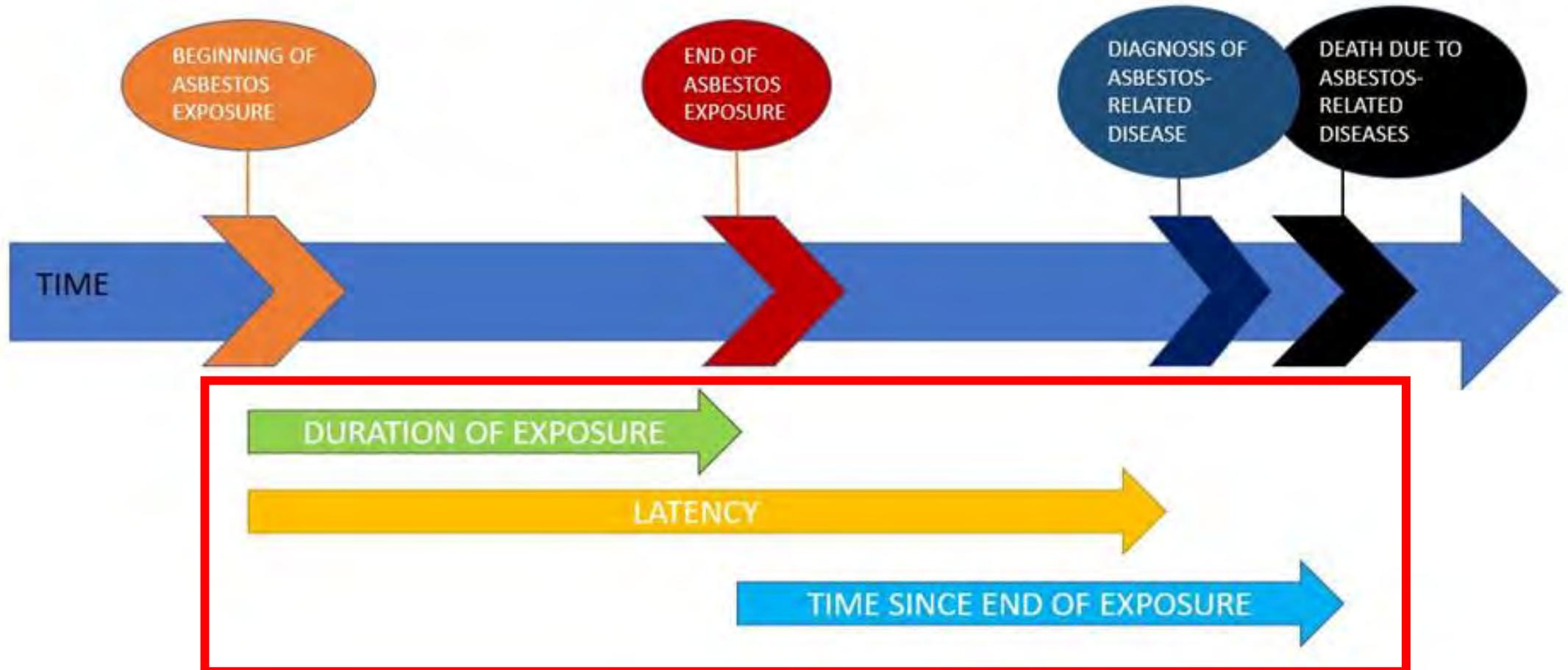


- CHRYSOPILE
- CROCIDOLITE
- AMOSITE
- ANTHOPHYLLITE
- TREMOLITE/ACTINOLITE

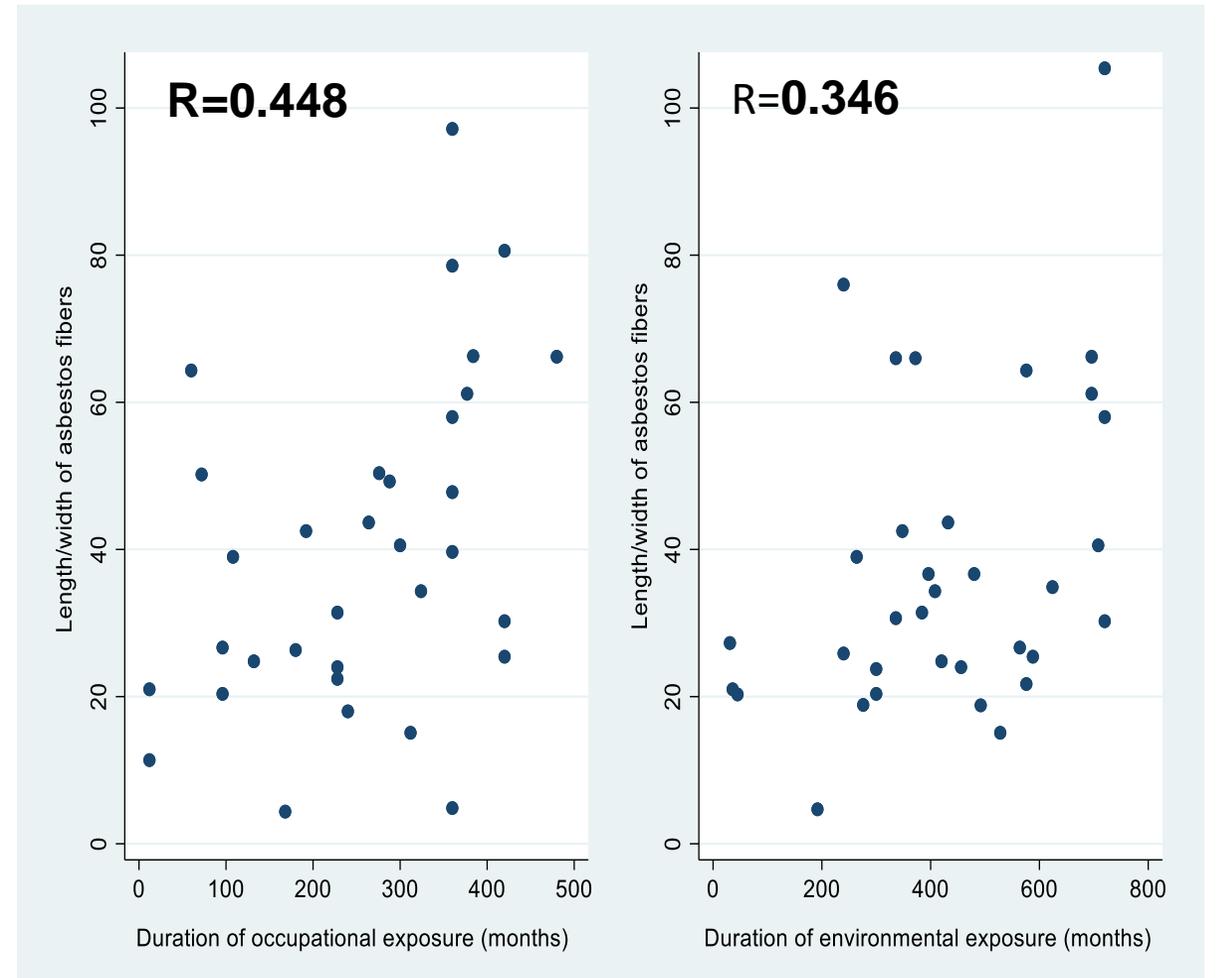
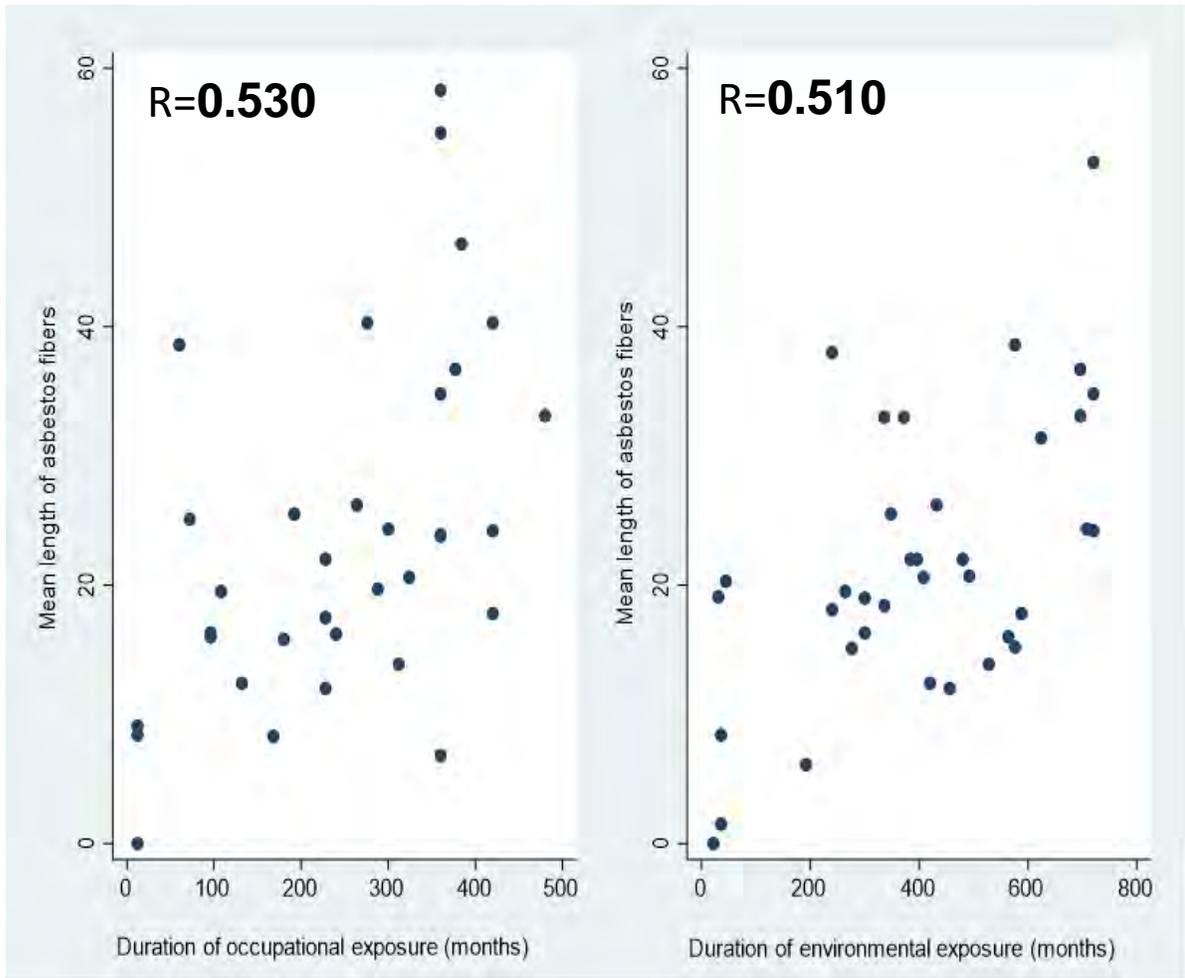
CONCENTRAZIONE DI FIBRE E CAUSA DI MORTE



VARIABILI CRONOLOGICHE



	Duration of occupational exposure (months)		Duration of environmental exposure (months)		Occupational latency (years)		Environmental latency (years)		Survival time (months)		Time since end of Exposure (years)	
	rho	p.value	rho	p.value	rho	p.value	rho	p.value	rho	p.value	rho	p.value
Asbestos fibres per gram of dry weight lung tissue	0.286	0.063	0.180	0.201	-0.111	0.511	0.023	0.870	0.092	0.453	-0.062	0.602
Asbestos bodies per gram of dry weight lung tissue	0.173	0.267	0.210	0.135	0.182	0.280	0.151	0.294	0.079	0.518	0.052	0.666
Chrysotile/asbestiform antigorite fibres	0.012	0.936	-	-	-0.140	0.406	-	-	0.177	0.147	0.096	0.423
Crocidolite fibres	0.274	0.074	0.222	0.112	-0.080	0.634	0.003	0.979	0.082	0.505	-0.119	0.319
Amosite fibres	0.263	0.087	0.070	0.620	-0.114	0.499	0.036	0.799	0.103	0.403	0.095	0.426
Anthophyllite fibres	-0.077	0.620	-0.146	0.300	-0.350	0.137	-0.038	0.788	-0.150	0.220	0.045	0.705
Tremolite fibres	0.178	0.253	0.062	0.654	0.010	0.949	0.142	0.325	0.066	0.589	-0.210	0.077



La lunghezza media e il rapporto lunghezza/larghezza aumentano con la durata dell'esposizione

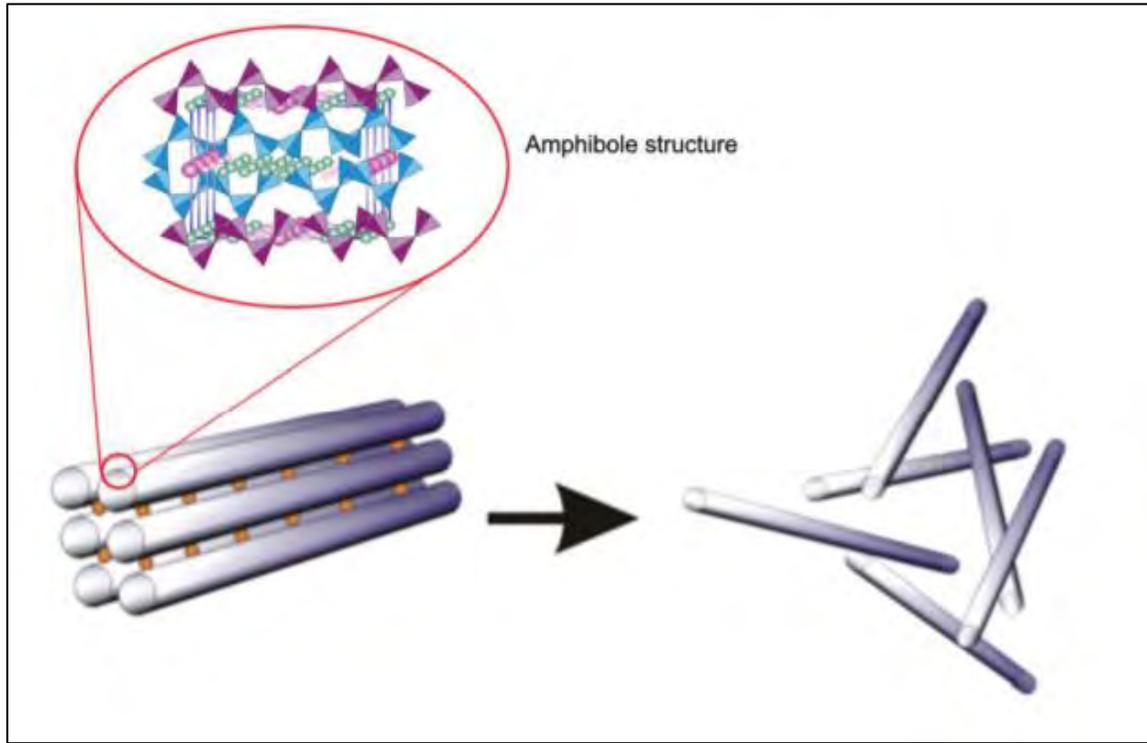
DISCUSSIONE (1)

1) CONCENTRAZIONE DELLE FIBRE DI AMIANTO

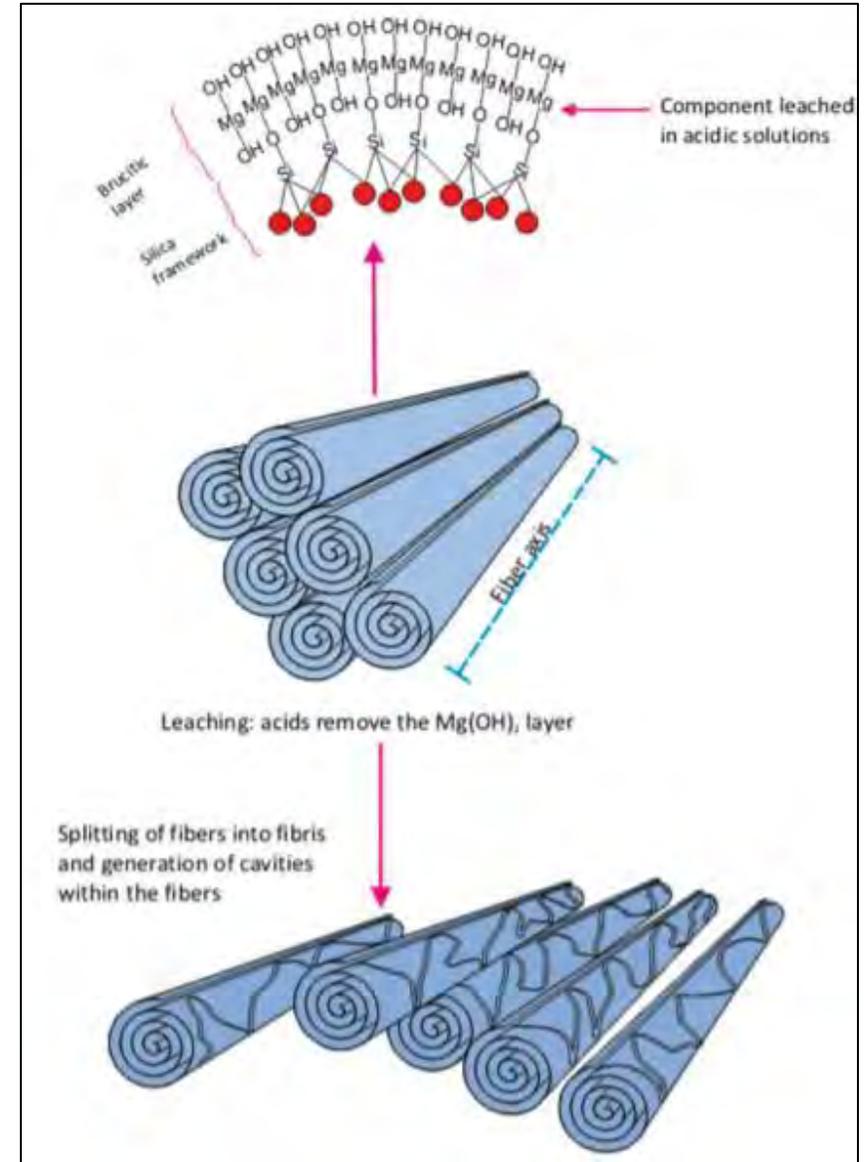
- Più alta nei soggetti senza mesotelioma (tutti con asbestosi).
- Zero fibre rilevate in alcuni casi di mesotelioma.

2) ASSENZA DI CRISOTILO

- Technical limitations
- Clearance completa prima del decesso
(tempo trascorso dalla fine dell'esposizione: 8-44 anni)



amphiboles

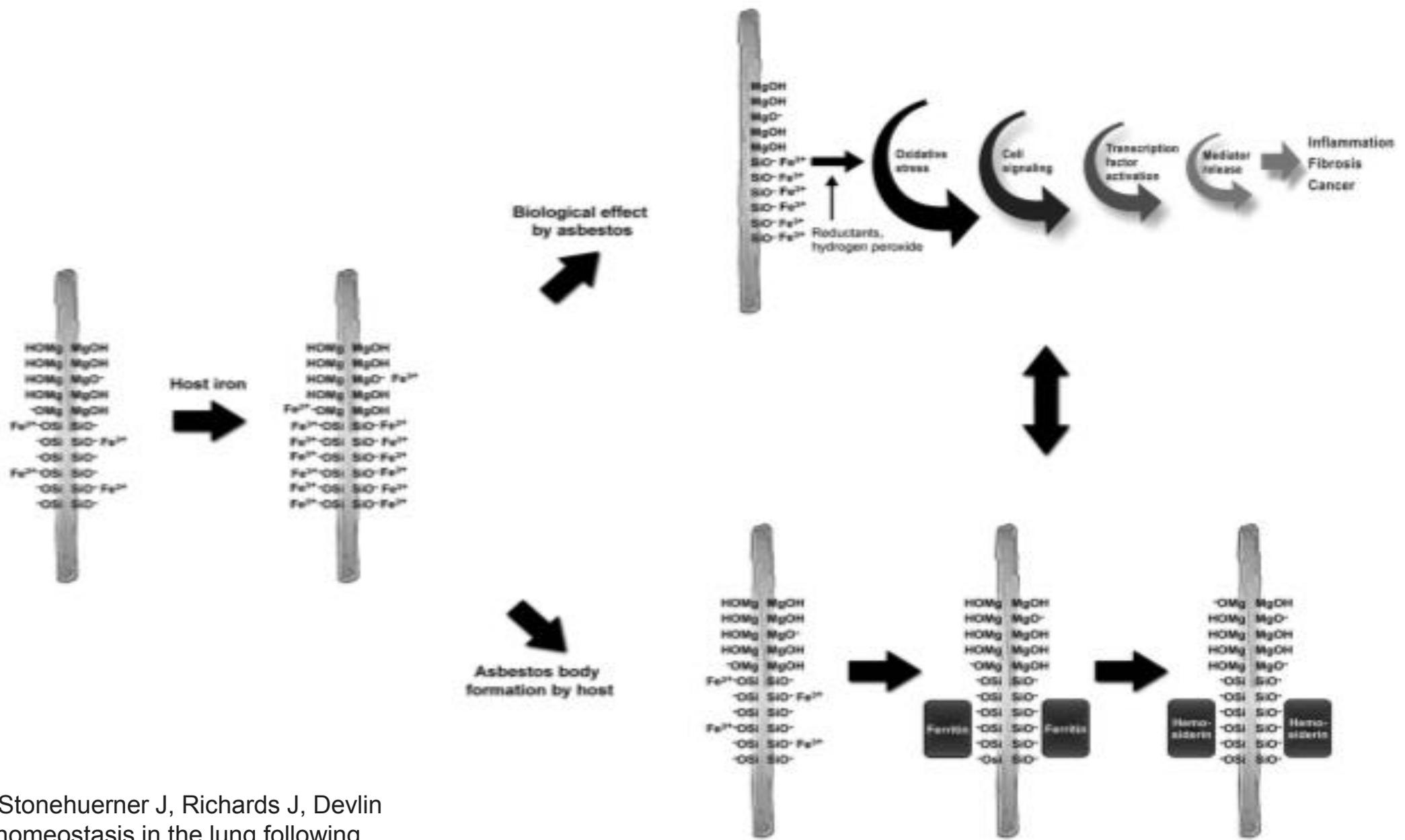


chrysotile

3) CONCENTRAZIONE DEI CDA

- Il rapporto fibre-coperture più alto nei soggetti con asbestosi rispetto a quelli con mesotelioma.
- ruolo protettivo del processo di copertura delle fibre?

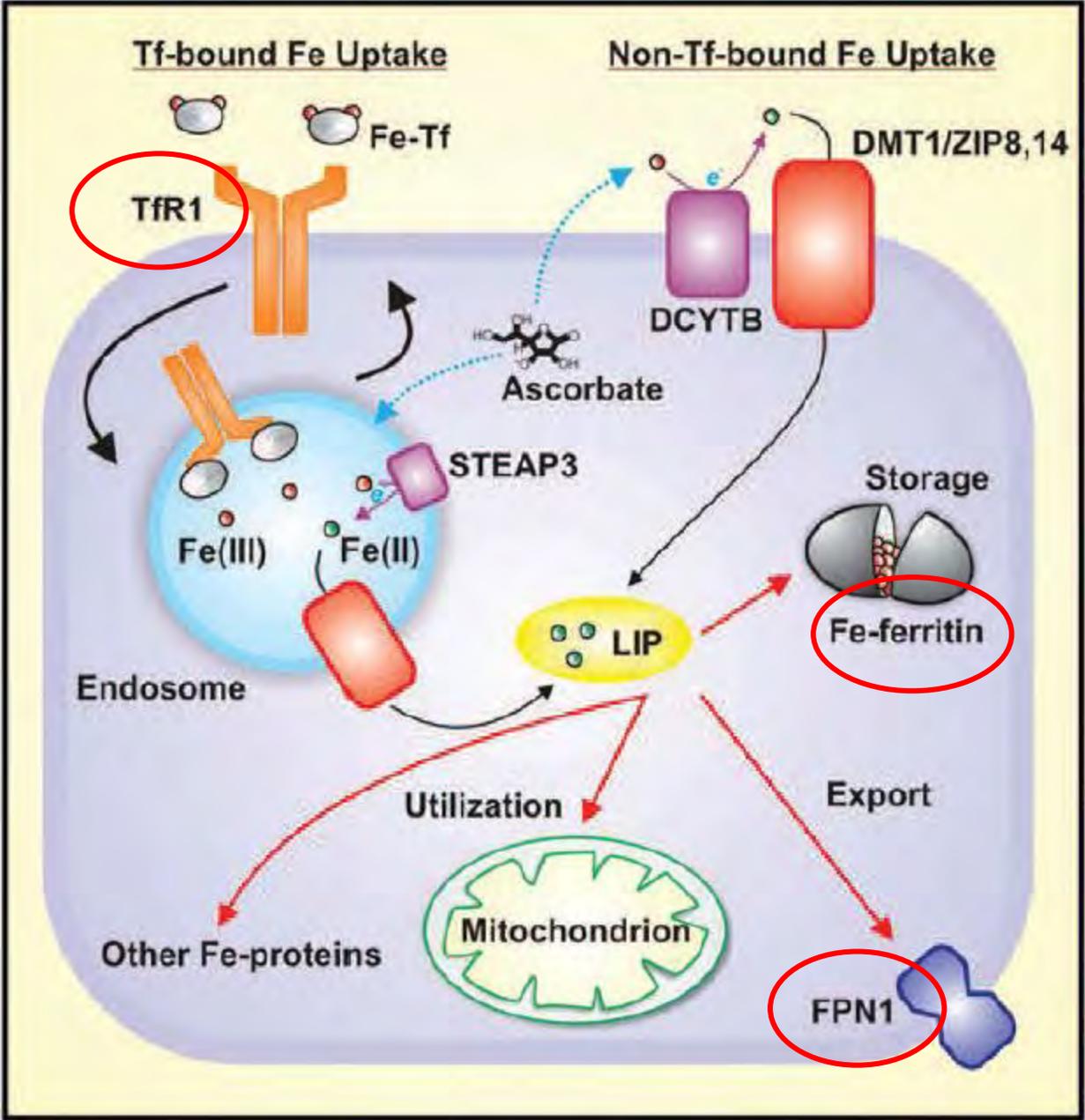




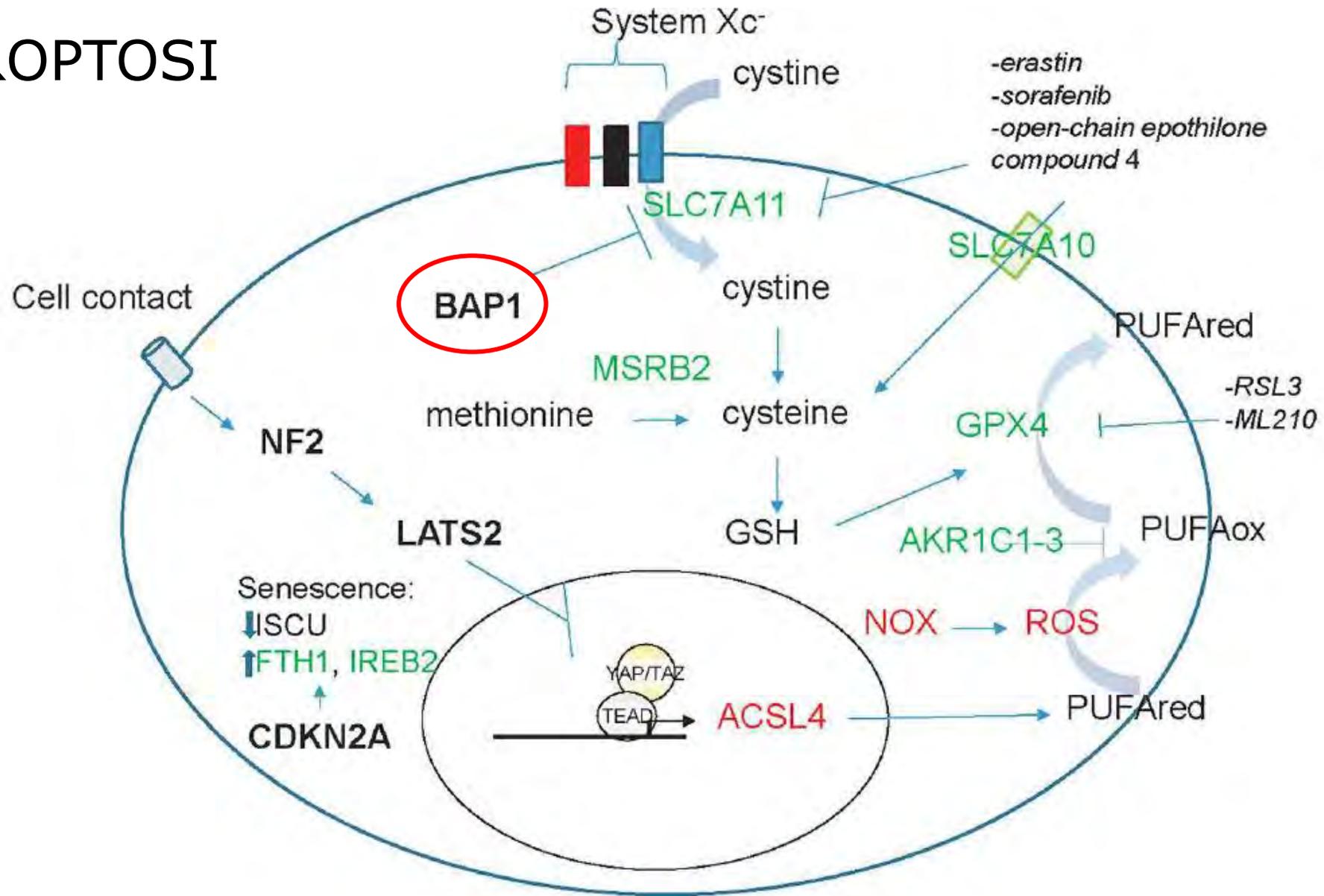
Ghio AJ, Stonehuerner J, Richards J, Devlin RB. Iron homeostasis in the lung following asbestos exposure. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Feb;10(2):371-7.

PARTE 2

**Espressione di BAP1 e metabolismo
del ferro in soggetti esposti ad
amianto:
IHC e rtPCR**



FERROPTOSI



Felley-Bosco E, Gray SG. Mesothelioma Driver Genes, Ferroptosis, and Therapy. *Front Oncol.* 2019 Nov 27;9:1318.

BACKGROUND

Published in final edited form as:

Nat Genet. ; 43(10): 1022–1025. doi:10.1038/ng.912.

Germline *BAP1* mutations predispose to malignant mesothelioma

Joseph R. Testa^{1,*}, Mitchell Cheung¹, Jianming Pei¹, Jennifer E. Below², Yinfei Tan¹, Eleonora Sementino¹, Nancy J. Cox^{2,3}, A. Umran Doğan^{4,5}, Mary Hesdorffer⁷, Masaki Nasu^{8,9}, Amy Powers⁸, Zequn Chen⁶, Comertpay^{8,9}, Mika Tanji^{8,9}, Giovanni Gaudino⁸, Haiyan Wang¹⁰, and Joseph A. Sparano¹¹ Published in final edited form as: *J Thorac Oncol.* 2015 April ; 10(4): 565–576. doi:10.1097/JTO.0000000000000471.

High Incidence of Somatic *BAP1* Alterations in Sporadic Malignant Mesothelioma

Masaki Nasu¹, Mitsuru Emi¹, Sandra Pastorino¹, Mika Tanji¹, Amy Powers¹, Hugh Luk, Francine Baumann¹, Yu-an Zhang², Adi Gazdar², Shreya Kanodia^{1,3}, Maarit Tiirikainen¹, Erin Flores¹, Giovanni Gaudino¹, Michael J. Becich⁴, Harvey I. Pass⁵, Haining Yang¹, and Michele Carbone^{1,*}

SCOPO DELLO STUDIO

Espressione di BAP1, TFR1, FTH, FPN (per indagare gli effetti dell'esposizione all'amianto sui meccanismi principali sull'omeostasi del ferro) in soggetti esposti ad amianto e deceduti per mesotelioma VS per altre cause.

MATERIALI E METODI (2)

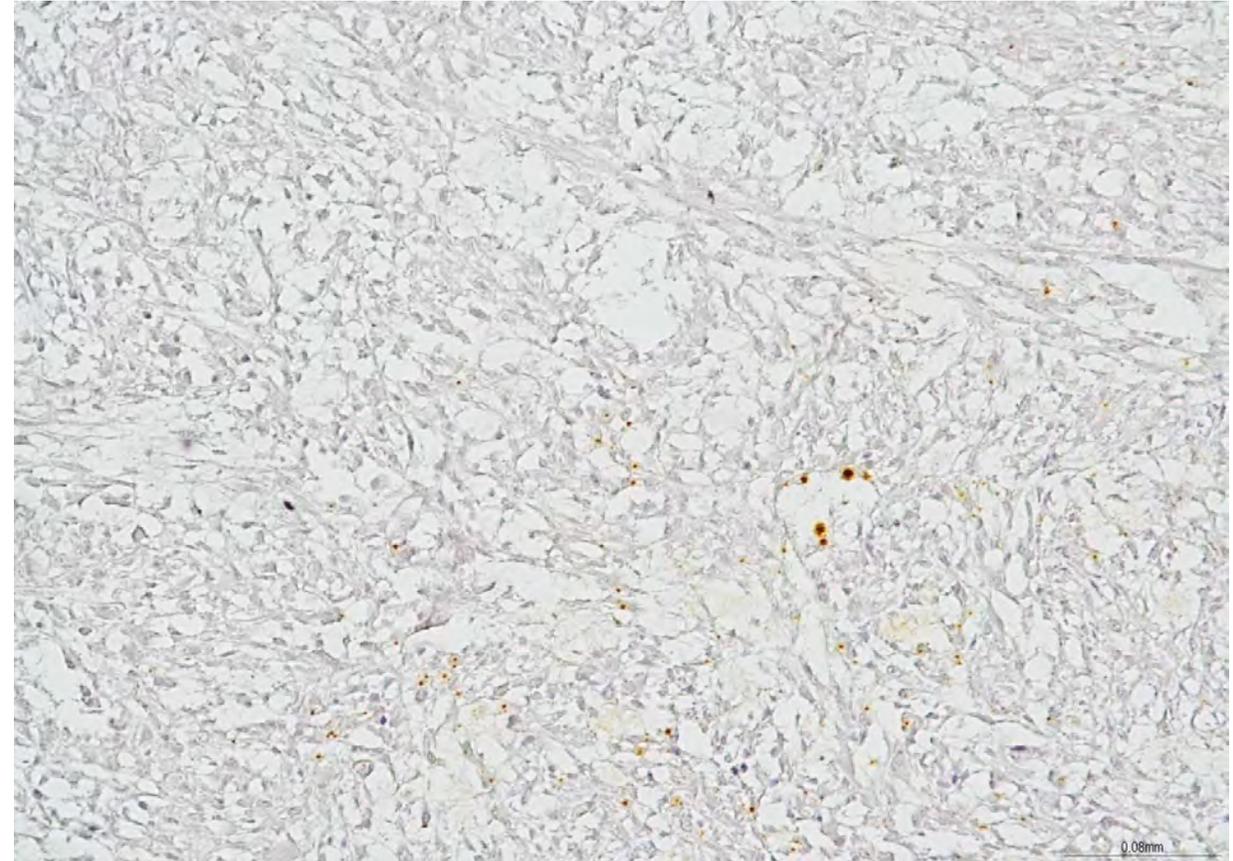
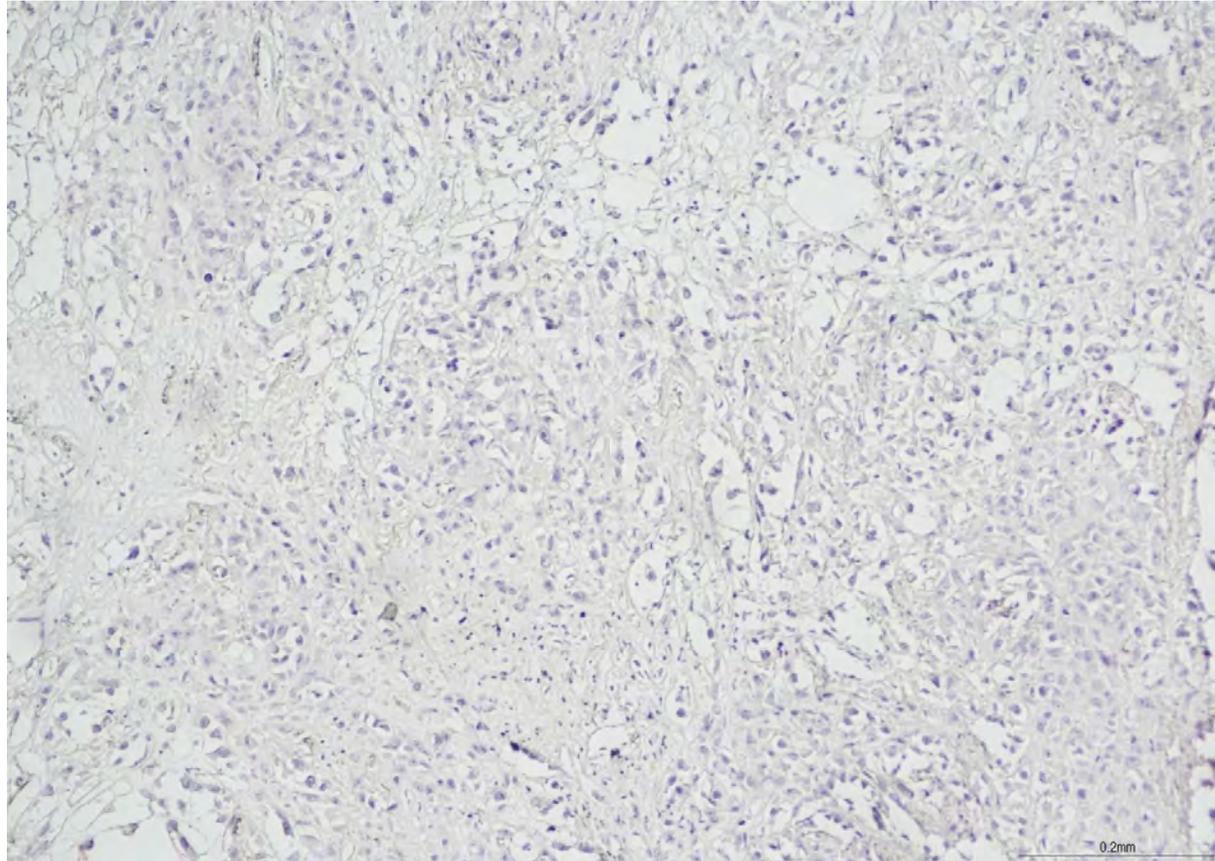
SOGGETTI: 50 MM+ 50 esposti senza mesotelioma (con e senza asbestosi)+ 20 soggetti maschi con più di 60 anni senza esposizione ad amianto né malattie respiratorie, deceduti per cause traumatiche (NON-EXP).

METHODS:

- IMMUNOSTAINING using primary antibodies: mouse **anti-BAP-1** (1:200; sc-28383, Santa Cruz Biotechnology), rabbit **anti-ferritin heavy chain** (FTH1) (1:2500; polyclonal, Invitrogen), mouse **anti-Transferrin receptor** (TFR) (1:1000; H68.4, Invitrogen), and rabbit **anti-ferroportin** (FPN) (1:2500; Invitrogen).
- **rtPCR: RNA extraction, cDNA synthesis and qPCR**

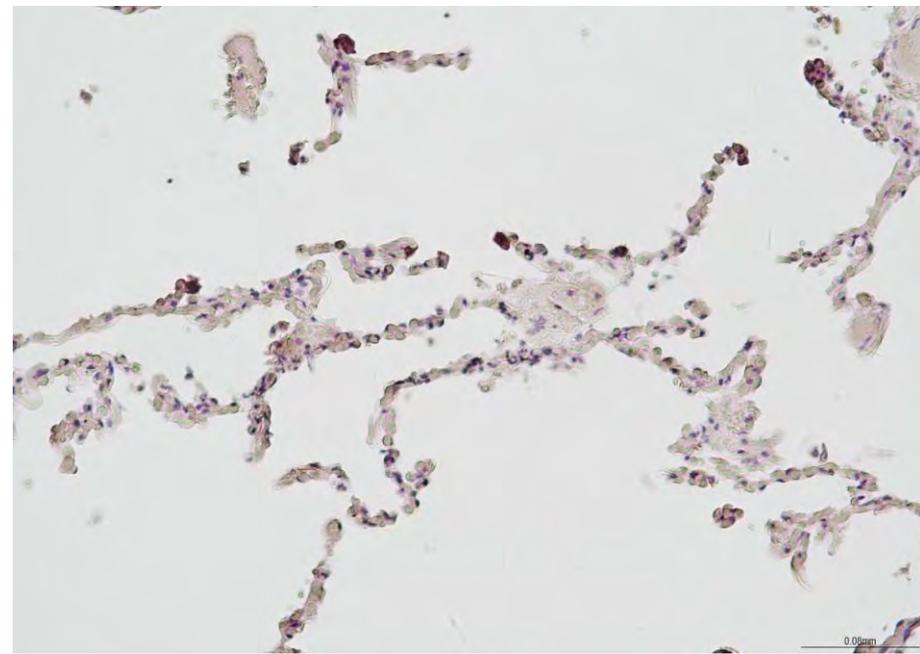
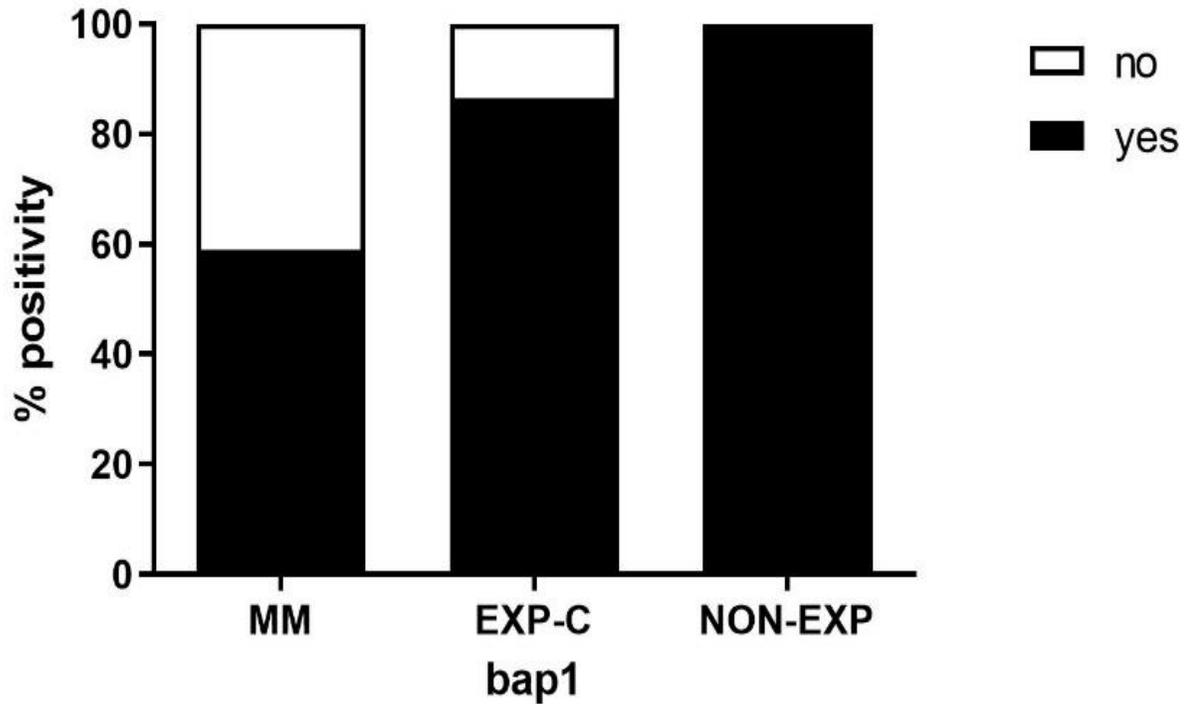
RISULTATI E DISCUSSIONE (2)

Espressione di BAP1 nel tessuto neoplastico

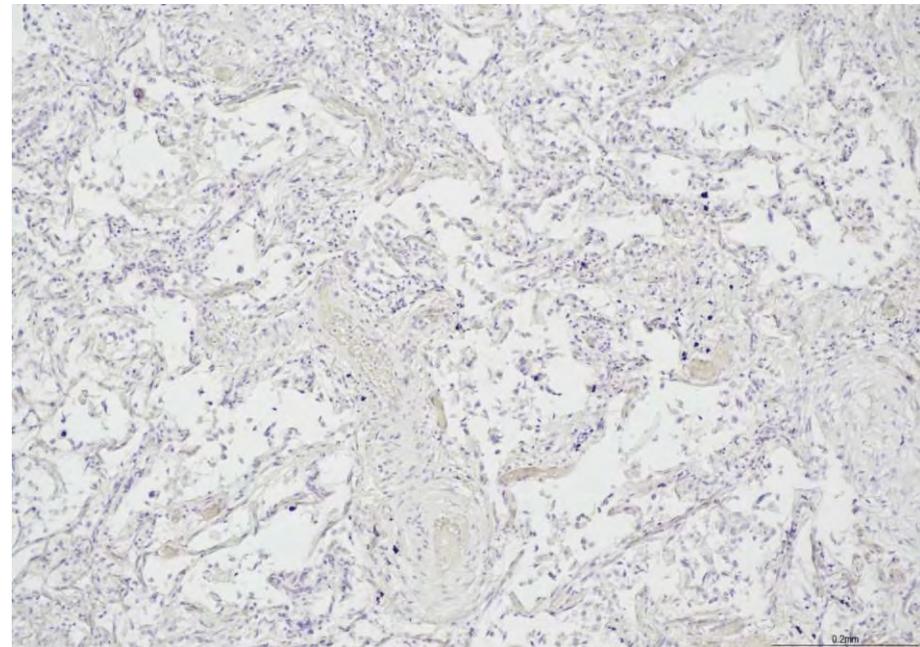


Reazione negativa (a) e debolmente positiva (b) (100x)

BAP1 nel tessuto polmonare indenne da neoplasia

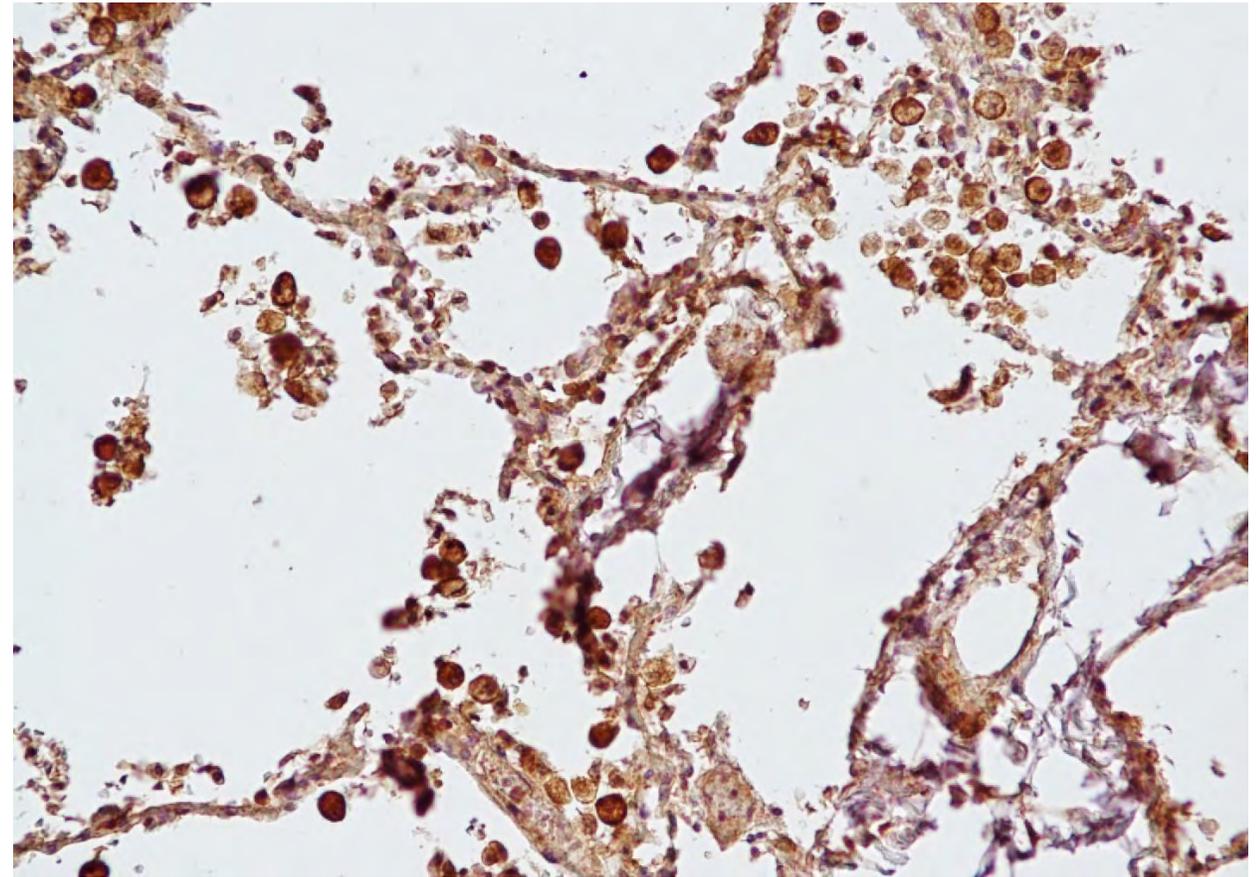
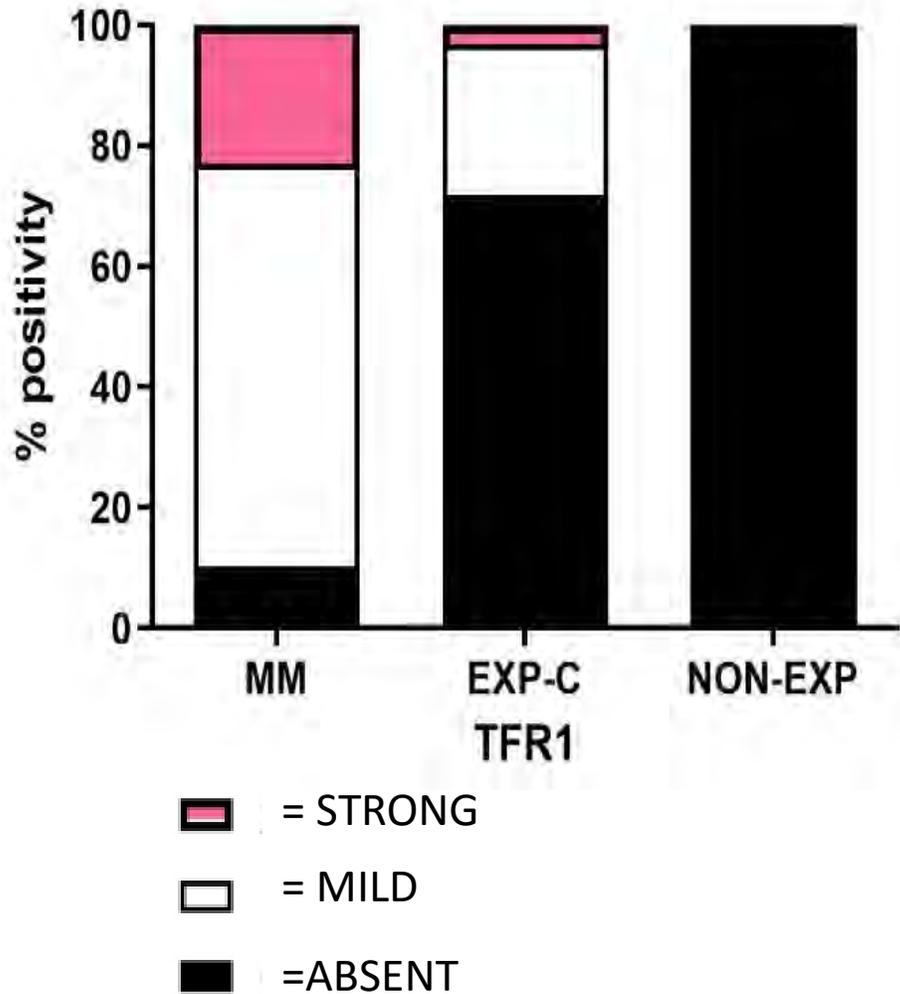


MM, BAP1
positivo
200X



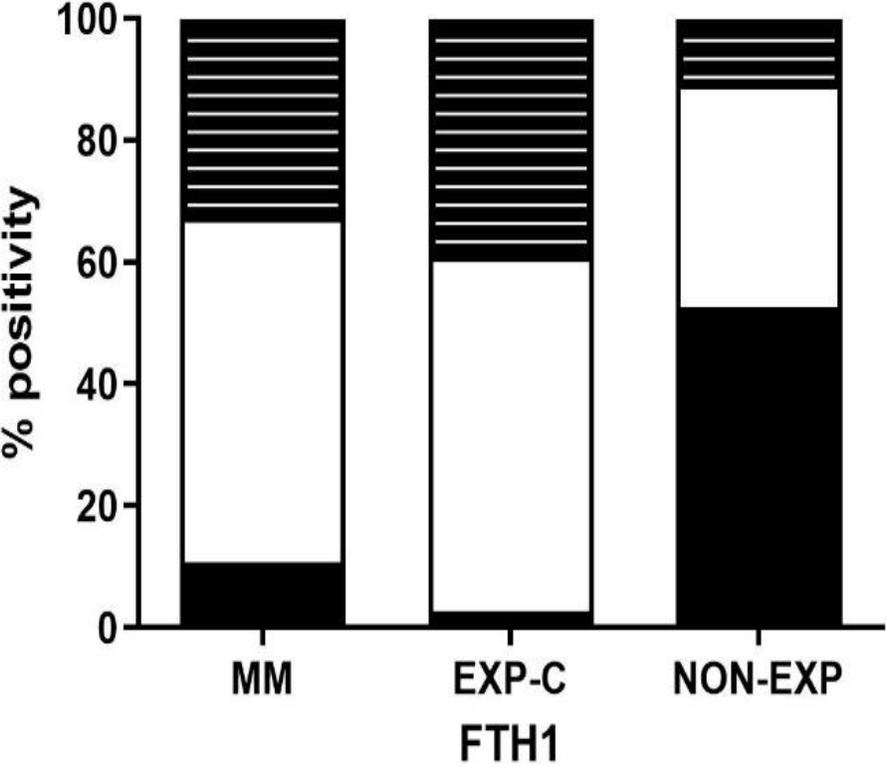
MM, BAP1
NEGATIVO
100X

ESPRESSIONE DEL RECETTORE DELLA TRASFERRINA NEL TESSUTO POLMONARE

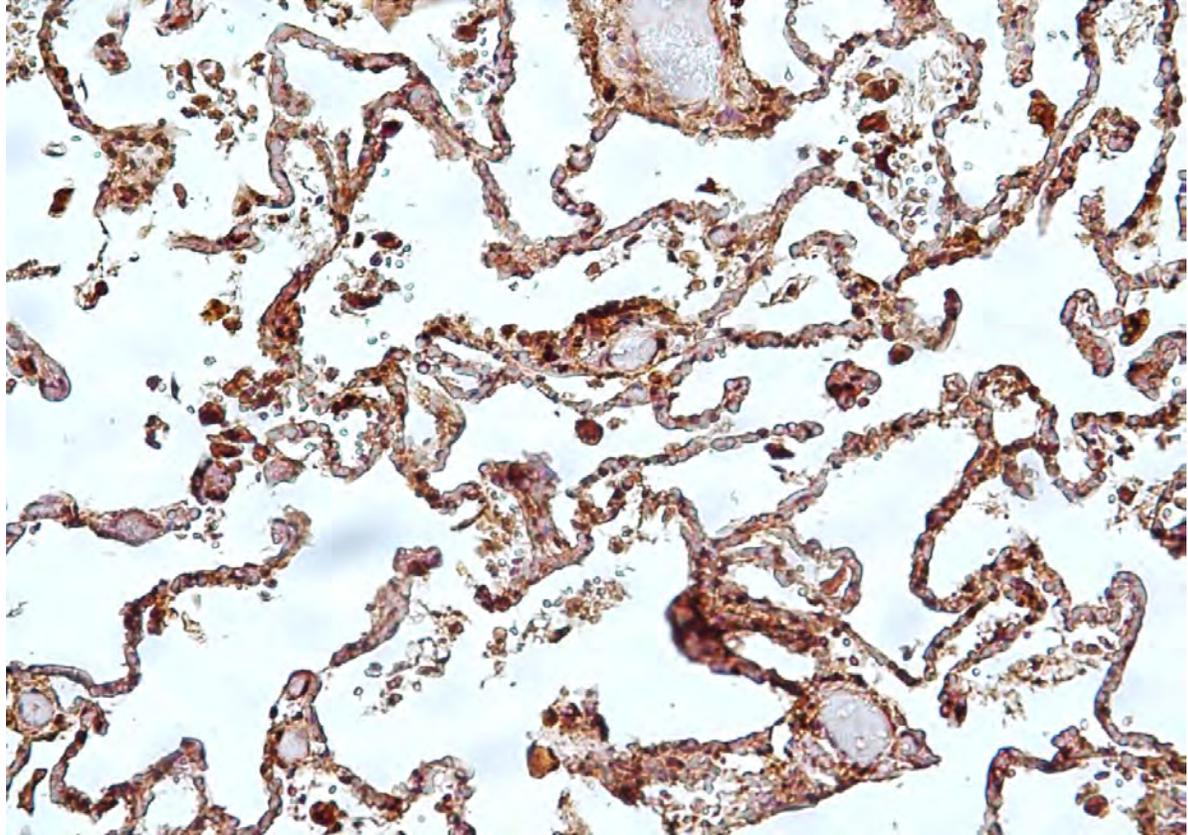


antiTFR1, MM, 200X

ESPRESSIONE DELLA FERRITINA NEL TESSUTO POLMONARE

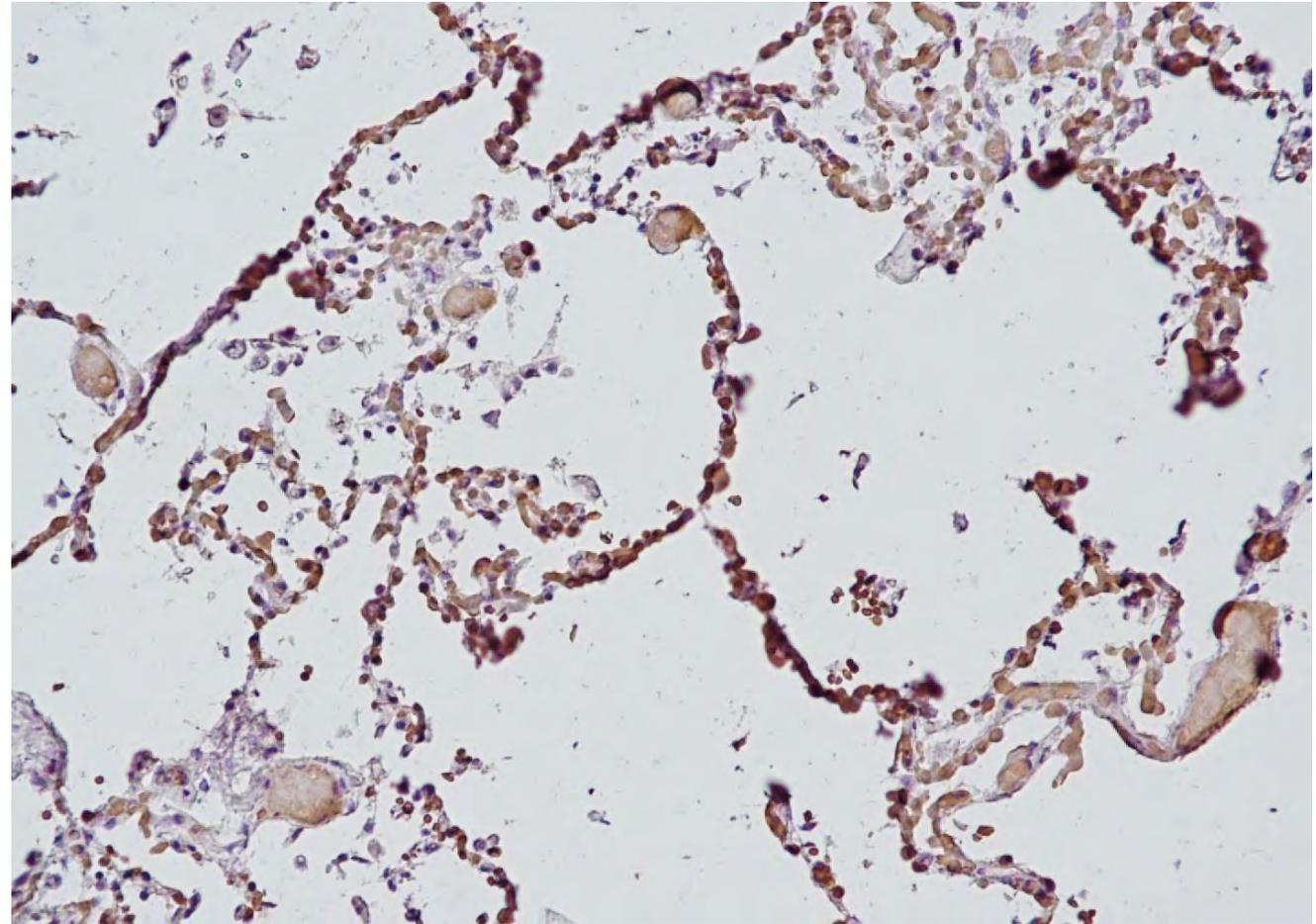
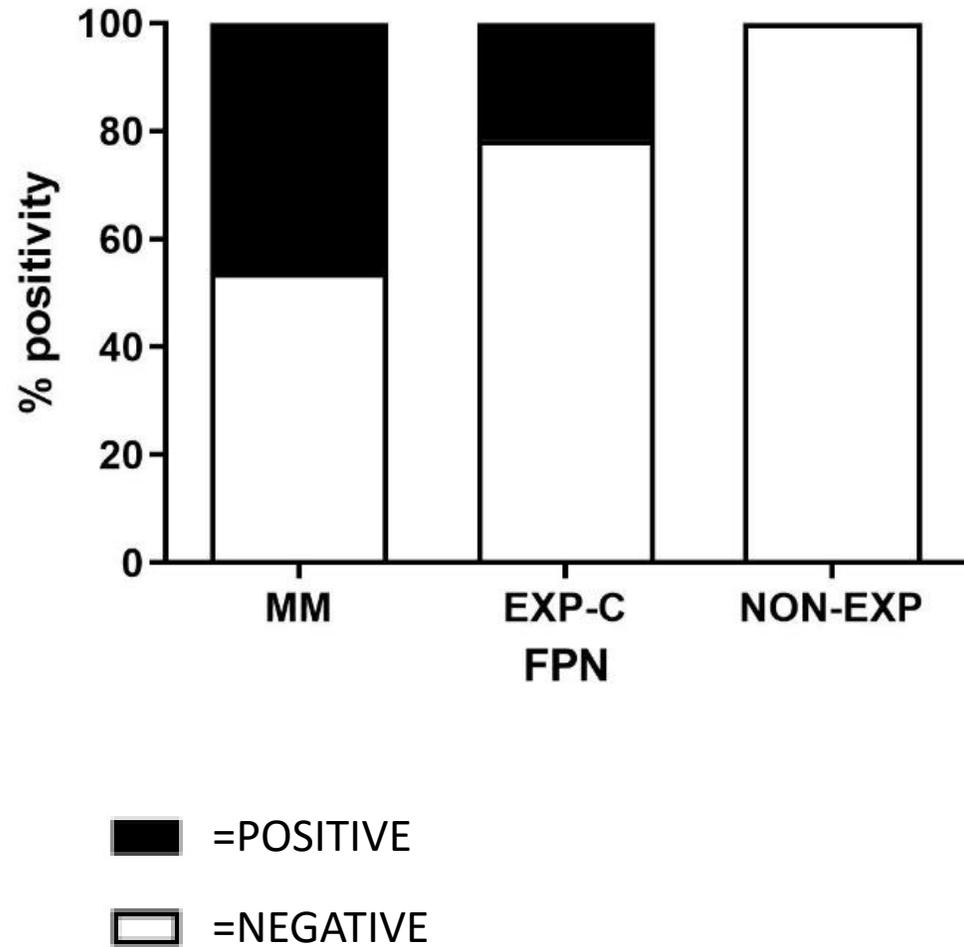


- ▬ = STRONG
- = MILD
- = ABSENT



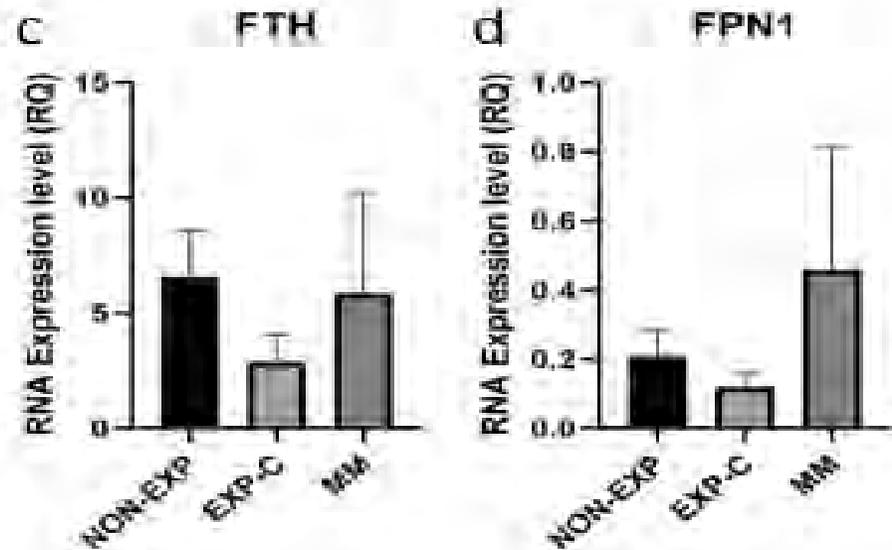
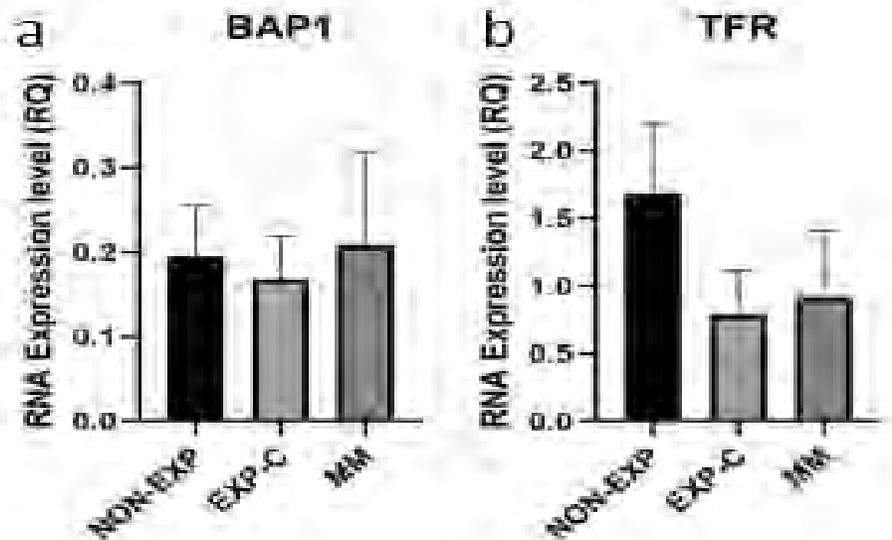
antiFTH1, MM, 20X.

ESPRESSIONE DELLA FERROPORTINA NEL TESSUTO POLMONARE



antiFPN, MM, 200X.

rtPCR

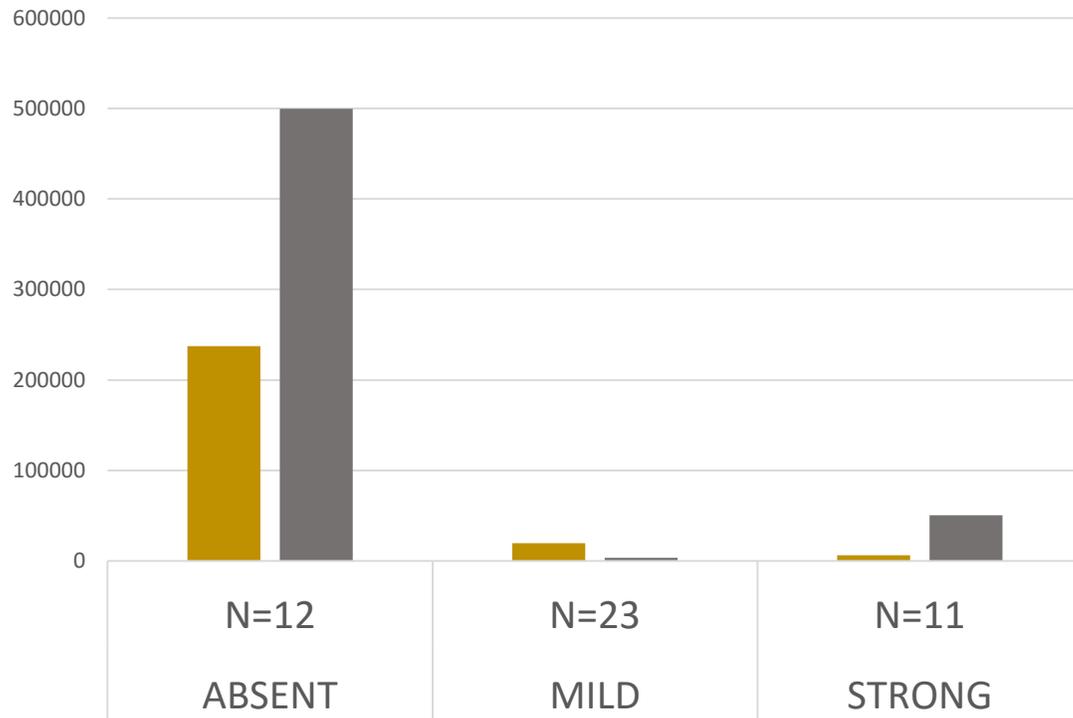


RT PCR: risultati poco convincenti.

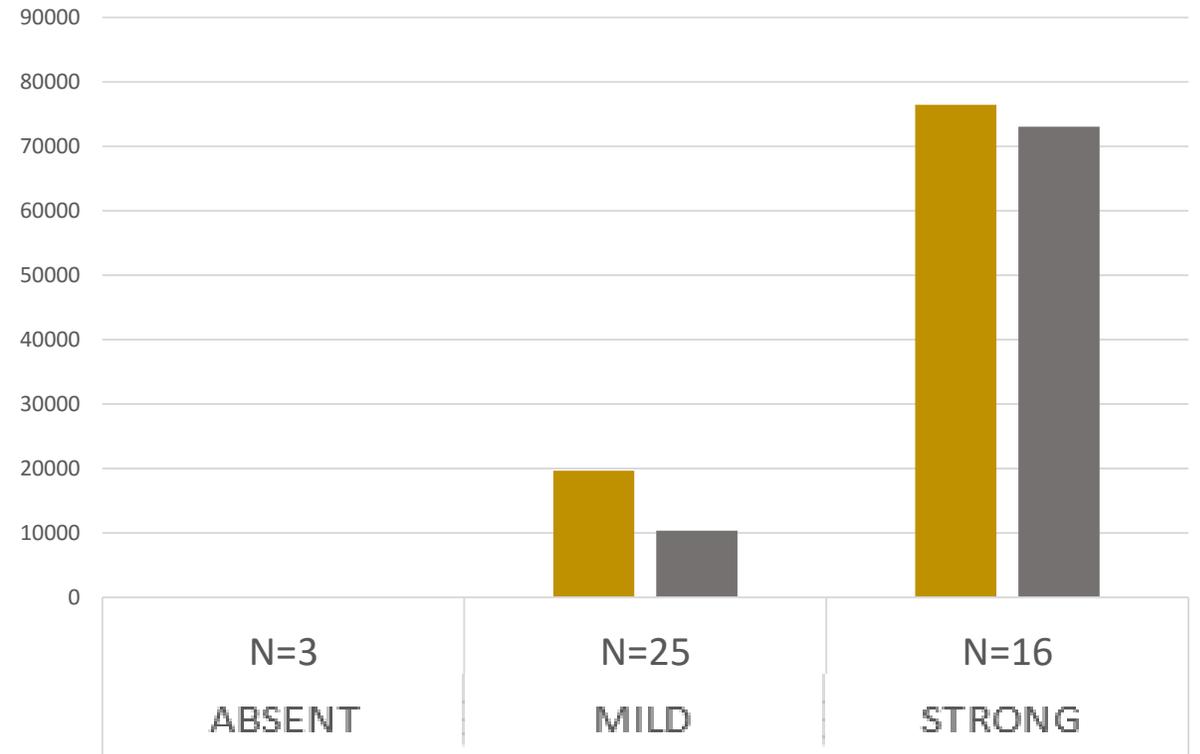
L'unico risultato coerente con l'IHC riguarda la ferroportina (MAGGIORMENTE ESPRESSA NEL MM RISPETTO AGLI ESPOSTI E AI CONTROLLI SANI)

IHC E CONTENUTO POMONARE DI AMIANTO

TRF1 IHC: grade of positivity



FTH1 IHC: grade of positivity



■ ASBESTOS FIBERS PER GDW
■ ASBESTOS BODIES PER GDW

CONCLUSIONI

- Sembra che nei casi osservati la completa clearance del crisotilo abbia avuto luogo prima del decesso.
- La capacità di formare corpuscoli è probabilmente un processo chiave nei processi che portano al mesotelioma.
- L'omeostasi del ferro è alterata dall'esposizione all'amianto anche dopo molti anni dalla fine dell'esposizione.

PROSPETTIVE FUTURE

- Studiare una popolazione esposta esclusivamente al crisotilo (Kirghizistan, Kazakistan).
- Comprendere meglio il meccanismo di formazione dei corpuscoli e il ruolo della ferroptosi (colture cellulari).
Investigate ferroptosis in MM samples and possibly in MM cell lines.
- Whole exome sequencing su casi di mesotelioma ed esposti ad amianto senza mesotelioma.