

Traduzione di alcuni capitoli dal libro:

Mesotelioma

Dalla Ricerca alla Pratica Clinica

Giovanni Luca Ceresoli • Emilio Bombardieri • Maurizio D'Incalci, Editors

Capitolo 1

EPIDEMIOLOGIA DEL MESOTELIOMA

Dario Mirabelli, Alessandro Marinaccio, Pietro Comba e Corrado Magnani

1.1 Introduzione

Nel 1960, per la prima volta furono presentati dal dr. Richard Wagner e dai suoi collaboratori un'ampia serie di casi di mesotelioma maligno (MM), corredati da una chiara descrizione degli aspetti clinici e diagnostici, che furono messi in relazione con l'esposizione -sia per motivi occupazionali che non- all'amianto (1). Fino ad allora l'esistenza di una patologia primitiva del mesotelio era stata molto discussa e negata da molti autori. Negli anni successivi, diversi studi condotti su una coorte di pazienti per misurare i rischi dell'esposizione professionale nei diversi settori industriali, confermarono l'associazione tra MM e amianto (2-6). Come atteso, nei primi studi fu data molta attenzione al rischio relativo al processo di estrazione dell'amianto (7), alla trasformazione dell'amianto grezzo in prodotti industriali e al suo principale utilizzo in settori industriali come i prodotti per i rivestimenti e l'isolamento (6), il tessile (5) o alla produzione del cemento-amianto (8). Molti degli studi erano focalizzati su coorti di pazienti esposte sia all'amianto anfibolo (in particolare alla crocidolite e all'amosite), le cui fibre minerali hanno il maggior potere cancerogeno sul mesotelio, sia ai tipi di amianto con caratteristiche miste (sia di tipo crisotilo che di tipo anfibolo). Studi epidemiologici di coorte sugli effetti dell'amianto crisotilo vennero fatti in epoche successive, intorno agli anni '70, su coorti di lavoratori nelle miniere di crisotilo in Canada (7) e in Italia (9). I primi risultati non dimostrarono una forte associazione tra MM e crisotilo, sebbene sui modelli animali l'amianto anfibolo e il crisotilo dessero risultati confrontabili (10). Negli anni successivi seguì un lungo dibattito sulla diversa potenzialità carcinogena delle diverse fibre di amianto (11) e sull'effetto nei tessuti biologici che possono avere fibre con una breve permanenza, come il crisotilo, rispetto a quelle che hanno una più lunga durata, come l'anfibolo. Si accumularono così negli anni una lunga serie di evidenze scientifiche che hanno portato alla conferma del rischio cancerogeno dell'amianto e di altre fibre minerali con caratteristiche mineralogiche simili, e alla loro associazione con lo sviluppo del MM, di tumori del polmone e di altri organi (2, 3, 12). Negli anni '80 e '90, la ricerca epidemiologica ha iniziato a studiare in modo molto più sistematico l'incidenza del MM in relazione ai prodotti contenenti amianto, quello che viene comunemente definito come la "terza generazione delle malattie da amianto" (13) e furono anche presentati i primi risultati relativi all'incidenza del MM in individui esposti a livello domestico all'amianto (14, 15). L'evidenza della relazione tra esposizione non occupazionale all'amianto e insorgenza di mesotelioma fu poi corroborata da una serie di studi sull'esposizione ambientale all'amianto (16-20).

In conclusione, sono oggi disponibili molte review che hanno analizzato, sia dal punto di vista epidemiologico che dal punto di vista dell'impatto sulla salute pubblica, la relazione esistente tra esposizione all'amianto e mesotelioma (12, 21-25).

1.2 La distribuzione a livello mondiale del MM

L'incidenza del MM mostra una estrema variabilità nei diversi paesi (26), con la frequenza più alta nel Regno Unito, Australia e Italia (27), i paesi in cui c'è stato un maggior uso pro-capite di amianto. Uno studio condotto da Odgerel e collaboratori (26), analizzando il Database della Mortalità del WHO, ha identificato 59 paesi in cui è possibile recuperare dei buoni dati sulla mortalità da mesotelioma, 45 paesi con scarsa qualità e 126 paesi senza alcun dato. Le percentuali di mortalità suddivise in base al sesso e all'età dei paesi con buona qualità dei dati sono state applicate agli altri paesi così da ottenere una stima globale della mortalità. Questo approccio ha permesso di stimare circa 38.400 morti all'anno per mesotelioma.

La relazione tra esposizione ad amianto e insorgenza di MM è stata studiata da diversi autori: Park e collaboratori (28) hanno presentato i dati di incidenza del MM in 56 paesi correlando la mortalità con l'uso di amianto: esiste una correlazione lineare (su base logaritmica, $R^2 = 0,83$; $p < 0,0001$) tra mortalità e la quantità di amianto utilizzata (Fig. 1.1). Diandini e collaboratori (29) hanno misurato che negli stessi paesi, il numero dei possibili anni di vita persi (PAVP) sono circa 201.000 per anno, con una media di 17 anni per caso.

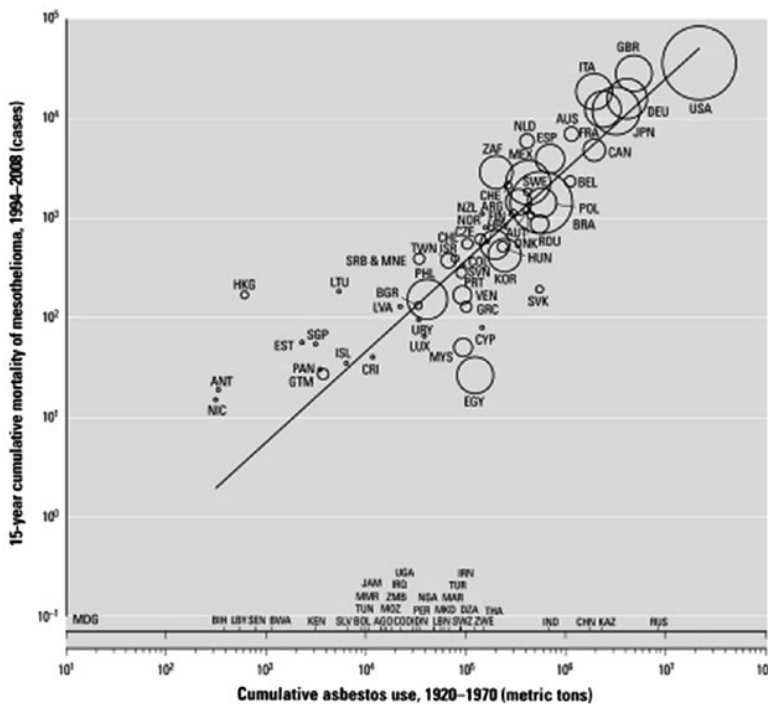


Figura 1: Ottenuto da Park et al., (28). Riprodotto con il permesso ottenuto da Environ Health Perspect. 2011; 119: 514-518. doi:https://doi.org/10.1289/ehp.1002845

1.3 Sorveglianza dell'incidenza del MM

L'Italia è uno dei paesi più coinvolti e più sensibili al monitoraggio e controllo delle malattie legate all'esposizione all'amianto. Questo è una diretta conseguenza del largo uso che fu fatto dell'amianto fino al momento della sua messa al bando nel 1992, con circa 3.748.550 tonnellate di amianto grezzo prodotto o importato, con picchi tra il 1976 e il 1980, con più di 160.000 tonnellate/anno (30). Un sistema permanente di sorveglianza dell'incidenza del MM è attivo dal 2002, sotto l'egida del Registro Nazionale dei Mesoteliomi (ReNaM), per identificare nuovi casi e valutare l'esposizione ad amianto (31). Non è ancora perfettamente funzionante uno specifico sistema di sorveglianza dell'incidenza del MM con informazioni affidabili e complete, con una corretta valutazione dell'esposizione e con una intera copertura del territorio (32). Attualmente i sistemi sono funzionanti solo in Australia (33), Francia (34), Sud Corea (35) e Italia (31). Gli altri paesi hanno dei sistemi di sorveglianza del MM basati sulle date di decesso, fornite spesso tardivamente.

Il ReNaM opera con una struttura organizzata su base regionale, basata sui Centri Operativi Regionali (COR), che sono attivi in tutte e 20 le regioni italiane. I CORs ricercano attivamente nuovi casi di MM negli ospedali e in altre istituzioni del sistema sanitario. I criteri diagnostici sono codificati secondo tre classi con livello decrescente di certezza. La storia professionale, le abitudini di vita e i luoghi dove hanno vissuto sia i soggetti intervistati sia i loro parenti più stretti, sono analizzati utilizzando dei questionari standardizzati, gestiti da personale addestrato. In ogni COR, igienisti industriali classificano e codificano l'esposizione, esaminando le informazioni raccolte. La classificazione dell'esposizione occupazionale è di tipo qualitativo e viene classificata come: certa, probabile o possibile¹. Inoltre, i codici sono assegnati in base alle esposizioni all'ambiente indicato (la residenza vicino ad una sorgente di contaminazione di amianto senza esposizione dovuta a cause occupazionali), famiglia (quando i pazienti hanno convissuto con una persona professionalmente esposta), attività ricreative (esposizioni non occupazionali avvenute durante le attività di svago) (31).

1: Sono definite esposizioni "occupazionali certe" quelle in cui i soggetti per motivi di lavoro sono stati esposti all'uso dell'amianto. Sono definite esposizioni "occupazionali probabili", quelle in cui i soggetti sono coloro che hanno lavorato in una ditta in cui è stato utilizzato sicuramente l'amianto ma non è documentabile l'esposizione diretta. Sono definite esposizioni "occupazionali possibili" quelle in cui i soggetti hanno lavorato in una ditta di un settore legato alla lavorazione dell'amianto.

1.4 Incidenza in Italia del MM

Nel periodo compreso tra il 1993 e il 2015 il ReNaM ha registrato 27.356 casi di MM (31). Nel 2014, il tasso standardizzato di incidenza del MM pleurico per 100.000 persone/all'anno era di 3,26 negli uomini e di 0,87 nelle donne, con 1.450 casi registrati (1.081 negli uomini e 369 nelle donne); il tasso corrispondente per il MM peritoneale era di 0,17 e di 0,01, basato su 59 e 40 casi, rispettivamente (31). L'età media alla diagnosi era intorno ai 70 anni mentre i casi più giovani con età inferiore ai 45 anni erano meno del 2%. Più del 90% dei casi avevano una malattia diagnosticata nelle cavità pleuriche, mentre i casi con MM peritoneale erano del 6,5% (5,3% negli uomini e 9,4% nelle donne). I casi in cui la malattia era diagnosticata in altre sedi anatomiche erano molto pochi (58 casi nel pericardio, e 79 casi nella tunica vaginale dei testicoli). L'analisi morfologica indicava che oltre la metà dei casi era di tipo epitelioide. Il rapporto tra i sessi (M/F) rimaneva costante nel tempo ed era di circa 2,54 se si consideravano tutti i casi di mesotelioma, mentre era di circa 2,64 se si prendevano in esame solo i casi di MM pleurico. Infine, va sottolineato che il rapporto tra i sessi (M/F) era prossimo o minore di uno

nei paesi con forti esposizioni ambientali e nelle categorie occupazionali a predominanza femminile (36).

1.5 Esposizione occupazionale e non occupazionale all'amianto in Italia.

Nel registro ReNaM, l'esposizione all'amianto è stata analizzata in 21.387 casi di MM (78,2% dei casi totali registrati). Nei casi selezionati, l'esposizione occupazionale è stata identificata nel 69% (14.818 casi), mentre il 4,9% dei casi sono stati attribuiti ad esposizioni famigliari e il 4,4% ad esposizioni ambientali.

Nel periodo tra il 1993 e il 2015, la distribuzione dei settori economici coinvolti nell'esposizione occupazionale all'amianto è cambiata. Nel periodo compreso tra il 1993 e il 1998, i settori economici coinvolti nella produzione di cemento-amianto, nella costruzione e riparazione di navi o nella riparazione della rete ferroviaria contribuivano per circa il 23% dei casi di mesotelioma, mentre sono diminuiti al 9,5% nel successivo periodo tra il 2011 e il 2015. Diversamente, il contributo del settore dell'edilizia è salito dal 12,1% del periodo 1993-1998, al 16,8% nel periodo tra il 2011 e il 2015 e attualmente rappresenta il più importante settore occupazionale in cui si registrano casi di MM.

In Italia, un alto rischio di sviluppare il MM è stato più volte riportato per la popolazione che abita nei pressi degli impianti di produzione del cemento-amianto nelle aree di Casale Monferrato (37), Bari (38), Broni (39) e nelle aree industriali per la costruzione di navi attorno a Livorno e la Spezia (40). Casale Monferrato rappresenta un caso estremo per gli effetti della esposizione ambientale all'amianto, ad esempio nel periodo tra il 2010 e il 2014 sono stati registrati 121 nuovi casi, con un tasso di incidenza annuo di 90,2 casi negli uomini e di 45,4 casi nelle donne ogni 100.000 abitanti (41). Casi di MM dovuti a ragioni non occupazionali sono stati registrati anche presso la cava di crisotilo di Balangero (42).

Fra i casi di MM registrati tra il 1993 e il 2008, il 4,4% ha riportato forme di esposizione famigliari (persone che hanno convissuto con una persona professionalmente esposta all'amianto), il 4,3% di esposizione ambientale (persone che hanno vissuto in prossimità di una fonte di inquinamento da amianto ma non professionalmente esposte) e il 1,6% è stato esposto durante le attività ludico ricreative.

Sui dati del ReNaM è stata condotta una cluster analisi di tipo spaziale. I risultati hanno evidenziato la presenza di clusters di casi attorno alle industrie che non fanno un uso diretto dell'amianto, come per esempio il tessile senza amianto, l'ingegneria metallica e delle costruzioni (44). L'entità dell'esposizione non occupazionale (principalmente ambientale e famigliare) è stata stimata intorno al 10% dei casi, e sembra dovuta principalmente alla residenza in prossimità degli impianti di produzione di cemento-amianto e alla coabitazione con soggetti professionalmente esposti all'amianto.

Nel piano di collaborazione con l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) è stata recentemente condotta una analisi estesa dell'incidenza di MM nei siti contaminati di priorità nazionale (NPCSS), evidenziando in generale un aumento di 1.531 nuovi casi in queste aree (45).

1.6 Sorveglianza epidemiologica della mortalità da MM

Il MM è una neoplasia rara e fatale. Per questo motivo, da quando in molti paesi sono disponibili con copertura nazionale i dati di mortalità per cause specifiche, la mortalità è stata usata come una misura approssimativa (proxy) della incidenza della malattia. Per quanto siano importanti i sistemi dei registri nazionali di MM (caratterizzati da conferma istologica alla diagnosi, e dalla possibilità di intervistare i pazienti e i loro famigliari in merito alle modalità di esposizione all'amianto), l'analisi della mortalità

da MM fornisce ancora oggi informazioni rilevanti sulla incidenza di questa malattia e sulla sua distribuzione spaziale e temporale.

Uno studio condotto nelle regioni del Sud-Est dell'Inghilterra, ha riportato che nel 87% dei casi accertati di MM, la causa principale di morte era stata correttamente registrata come mesotelioma (46).

La sorveglianza epidemiologica della mortalità da MM è condotta in diversi paesi e qui di seguito sono riportati solo alcuni esempi.

Il primo registro nazionale del MM cominciò nel Regno Unito, analizzando le cause di morte in cui fosse presente la parola "mesotelioma" oppure ci fossero altre cause di interesse. Il rapporto più recente (1968-2016) ha registrato tra gli anni 2012-2016 circa 2.500 nuovi casi all'anno, che corrisponde alla più alta percentuale mondiale (47).

Negli Stati Uniti, nel periodo tra il 1999-2015, sono state accertate 45.221 morti per MM (48). Il numero totale di morti annue è ancora in crescita in particolar modo tra le persone anziane. Sebbene l'incidenza stia diminuendo nelle persone con età inferiore ai 74 anni, oltre 2.500 casi sono stati accertati tra le persone con meno di 55 anni di età. Questo dato indica quanto sia oggi fondamentale continuare il percorso di prevenzione dell'esposizione all'amianto e la sorveglianza epidemiologica.

In Grecia, la sorveglianza epidemiologica è basata sulla diagnosi di tumore pleurico maligno (ICD, nona Revisione). Nel periodo 1983-1993 il tasso di mortalità era di 0,047/100.000 persone ed è aumentato a 0,15 /100.000 nel periodo tra il 1994-2003 (49).

Anche in Spagna, in accordo con i criteri della nona Revisione dell'ICD, la sorveglianza per mortalità da MM è definita sulla base della diagnosi di tumore pleurico maligno. E' stato riscontrato un alto rischio di mortalità per tumore alla pleura nelle aree in cui erano presenti industrie che utilizzavano l'amianto (50). Nel periodo tra il 2001-2005, i tassi hanno dimostrato un appiattimento e una diminuzione principalmente nelle donne, mentre le previsioni suggeriscono che la mortalità per tumore pleurico continui probabilmente fino al 2040 (51).

In Brasile, la mortalità per MM si basava sui dati del registro nazionale della mortalità, con una stima di circa 1,1/100.000 abitanti nel 2003, sebbene gli autori sottolineassero che queste misure fossero sottostimate (52). In merito a questo problema, sono stati presentati dei dati da Pasetto e collaboratori sulla mortalità da MM e altri tumori legati all'esposizione all'amianto in paesi come l'Argentina, il Brasile, la Colombia e il Messico. Basandosi sui database di mortalità dell'WHO gli autori hanno sottolineato il trend in crescita e i rischi di aver sottostimato i dati reali (53).

In Italia, il modello di sorveglianza basato sulla definizione di mesotelioma pleurico è entrato in vigore nel 2003 (ICD, decima Revisione) mentre prima veniva usato quello basato sulla diagnosi di tumore pleurico maligno (ICD, nona Revisione). I dati contenuti nel più recente rapporto (2003-2014) indicano che la mortalità è in crescita negli uomini mentre risulta costante nelle donne (54). La media annuale del numero di morti è di circa 1.000. Tre regioni del nord d'Italia hanno, per entrambi i sessi, il più alto tasso di mortalità rispetto alla media nazionale. Tra le 8.046 municipalità italiane, 217 hanno un aumento statisticamente significativo del numero dei casi osservati rispetto al numero dei casi attesi su base regionale. Questi aumenti sono stati registrati prevalentemente nelle aree con presenza di industrie che fanno un largo uso di amianto nei loro processi produttivi, nelle aree coinvolte nella produzione di materiali isolanti, o in un comune della Sicilia caratterizzato dalla presenza nel terreno di sorgenti naturali di fluoro-edenite. Queste osservazioni hanno contribuito allo sviluppo di programmi di bonifica ambientale e allo sviluppo di una campagna di sensibilizzazione con le comunità colpite dal problema dell'amianto e con le associazioni dei pazienti. In conclusione, gli studi di sorveglianza epidemiologica sulla mortalità da MM, oltre a fornire importanti informazioni sulla salute pubblica a

livello dei singoli paesi, sono un importante strumento per il controllo a livello mondiale della salute ambientale.

1.7 Previsioni sull'evoluzione temporale dell'incidenza del MM

L'analisi congiunta dei dati del ReNaM, delle statistiche sulla mortalità e sull'utilizzo dell'amianto prima della sua messa al bando hanno permesso di stilare alcune previsioni sulla mortalità da MM in Italia, prevedendo un picco di mortalità nel quinquennio 2015-2020 (36). Questa previsione è stata anche di recente confermata da uno studio che ha condotto una ricostruzione storica della mortalità da MM pleurico a partire dal 1970 (55).

Le previsioni di incidenza e mortalità da MM prevedono una crescita costante del numero dei casi nei paesi industrializzati, seguite da un periodo di "plateau" e quindi da una fase di discesa grazie alla messa in atto di politiche di restrizione nell'utilizzo dell'amianto (56). In Europa le previsioni di mortalità da MM (57) sono state pubblicate per la Gran Bretagna (58, 59), Francia (60) Italia (61), Olanda (62), Danimarca (63), Norvegia (64), Spagna (51). Per i paesi extra europei, le previsioni sono state pubblicate per gli Stati Uniti d'America (65), Australia (33), Giappone (66) e altri stati asiatici (67). Tutte queste previsioni sono state fatte tenendo in considerazione sia il consumo nazionale di amianto come un "proxy" dell'esposizione, sia i modelli di coorte per periodi di età e sono tutti concordi nel sostenere una riduzione dell'incidenza del MM dopo 30-40 anni dall'inizio delle politiche riduzione dell'uso di amianto.

Gli effetti della messa al bando dell'amianto sull'incidenza del MM sono complessi dal punto di vista metodologico a causa del breve periodo fino ad ora trascorso dall'inizio della loro attuazione e dal lungo periodo di latenza che intercorre tra l'esposizione all'amianto e la diagnosi di MM. Tuttavia, un lavoro pubblicato da Jarvholm e Burdorf ha dimostrato nella popolazione nata in Svezia tra gli anni 1955-1979 che ha iniziato a lavorare solo dopo la messa al bando dell'amianto, una riduzione dell'incidenza del MM rispetto ai lavoratori nati tra gli anni 1940-1949 (68).

1.8 Il costo economico del MM

Basandoci sui dati del ReNaM e sull'analisi dei parametri economici, Buresti et al (69) hanno stimato una media del costo delle cure mediche in 33.000 euro/paziente, e di 25.000 euro/paziente come costi assicurativi e di risarcimento. Inoltre hanno stimato un costo di 20.0000 euro /paziente per la perdita di produttività, e questo rappresenta il costo indiretto più importante legato alla patologia.

1.9 MM e esposizione alle fibre naturali

Per motivi geologici, l'amianto può essere presente nel suolo dove può anche affiorare in superficie rilasciando fibre volatili a basse concentrazioni. L'intervento dell'uomo associato alle attività minerarie, le cave e i lavori agricoli possono determinare dei picchi di concentrazione di amianto con conseguenze sulla salute che vanno dalla formazione di placche pleuriche fino allo sviluppo del MM (70, 71).

In Turchia sono riportati i primi casi di MM associati alla presenza di tremolite e crisotilo nel terreno (72). Diversi altri studi condotti in Grecia, Cipro, Turchia, Corsica, Botswana, Afghanistan e Nuova Caledonia hanno confermato queste osservazioni (73). I lavori pubblicati da Liu et al. (74) e poi da Luo et al. (75) hanno documentato un aumento di malattie associate all'esposizione all'amianto, incluso il MM, in una regione della Cina caratterizzata dalla presenza di crocidolite nel terreno. Pan et al. (76) hanno documentato un aumentato rischio di sviluppare il MM in quelle persone che in California vivevano in prossimità di zone ricche di amianto presente in natura (dall'inglese: "Naturally Occurring

Asbestos² o più semplicemente NOA). Sulla base delle informazioni raccolte, la tremolite e il crisotilo erano i minerali più abbondanti in molte aree. Mentre i valori medi delle concentrazioni delle fibre volatili erano bassi, alte concentrazioni di questi minerali sono state riscontrate nei prodotti per intonaci delle case e nei materiali per le pavimentazioni stradali.

Nella maggior parte dei casi analizzati, il rapporto tra i sessi era uguale a 1, e l'età media alla diagnosi era compresa tra i 50 e i 60 anni, con un numero apprezzabile di casi sotto i 40 anni. Questi dati suggeriscono un ruolo eziologico dell'esposizione all'amianto naturale durante l'infanzia.

Analisi condotte in alcuni contesti sono state utili per identificare le più importanti vie di esposizione e il ruolo che possono aver avuto anche altre fibre minerali. In seguito ad un primo rapporto sulla epidemia di mesotelioma pleurico e pleuriti fibrose croniche nella Turchia centrale (77), una serie di studi epidemiologici hanno dimostrato il ruolo eziologico della erionite, un minerale fibroso appartenente alla famiglia delle zeoliti e presente in natura principalmente nei tufi vulcanici, ma anche come contaminante naturale in alcuni terreni, polveri stradali e pietre da costruzione (78, 79). L'Erionite è stata classificata come un cancerogeno per la specie umana nel 1987 dalla Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC), e confermata successivamente nel 2012 (80, 81). L'esposizione all'erionite è stata associata ad un gruppo particolare di MM diagnosticato in Messico (82).

Nella Nuova Caledonia, i primi studi si focalizzarono sulla presenza della tremolite nei prodotti per gli intonaci delle case (18), mentre successivamente venne preso in esame come agente eziologico la serpentinite presente nel terreno, con una attenzione particolare alle strade che dalle cave di serpentinite portavano alle abitazioni delle persone affette da MM (83, 84). A Libby, nel Montana, ci fu una massiccia attività mineraria di estrazione della vermiculite, un minerale che conteneva fino al 26% di amianto anfibolo inizialmente scambiato per tremolite, ma che poi si è dimostrato essere una combinazione di winchite, richterite e tremolite. Casi di MM sono stati registrati in molti uomini che lavoravano nelle cave di vermiculite e, più in generale, anche nella popolazione che non era professionalmente esposta (83, 84). Uno studio recente condotto nell'area del monte Pollino, nel sud dell'Italia, ha dimostrato un aumentato rischio di MM in quei paesi dove le case o le aree adibite alla coltivazione si trovavano nei pressi dei giacimenti naturali di serpentinite e metabasiti, che contenevano anche tremolite, actinolite e crisotilo (87).

Un eccesso di mortalità per tumore maligno della pleura² è stato registrato tra gli anni 1988-1992 in un comune della Sicilia, durante un progetto di sorveglianza epidemiologica di mortalità per MM in Italia. Poiché non vi erano fenomeni di esposizione occupazionale da amianto, questi dati portarono ad una serie di indagini successive. Molti casi furono confermati istologicamente, il rapporto tra i sessi era vicino a 1 e per molti di loro si poteva escludere una esposizione all'amianto. Sulla base di 26 casi diagnosticati tra il 1998 e il 2011 (13 uomini e 13 donne), l'incidenza della malattia a Biancavilla risultò circa cinque volte superiore all'incidenza stimata in tutta la Sicilia. Per le persone con diagnosi prima dei 40/50 anni, l'incidenza del MM risultava 20/60 volte più alta che in tutto il resto della Sicilia (88). Nel frattempo, fibre di natura anfiboliche furono rinvenute in un materiale, estratto da una cava situata in prossimità della città, che veniva ampiamente utilizzato nell'industria edilizia e nella pavimentazione stradale. La fibra inizialmente classificata come una fase intermedia tra la tremolite e l'actinolite (89) è risultata essere una nuova specie mineralogica, denominata fluoro-edenite (90, 91). Esperimenti condotti in modelli murini hanno dimostrato che in seguito alla somministrazione di fluoro-edenite, i ratti sviluppavano MM della pleura e del peritoneo (92, 93). Nel 2014 la fluoro-edenite è stata classificata dalla IARC come cancerogeno per la specie umana (94).

²Parametro utilizzato per misurare la mortalità da mesotelioma pleurico prima dell'entrata in vigore della decima Revisione della Classificazione Internazionale delle Malattie

1.10 Lavorazione delle fibre minerali e MM

Diversi studi sono stati condotti sui diversi prodotti delle lavorazioni delle fibre di amianto. Evidenze di una attivazione del processo di carcinogenesi, incluso quello per il MM, sono state ottenute in diversi modelli animali esposti a fibre di ceramica o di loppa. Tuttavia, studi su ampie coorti di popolazione non hanno riportato casi di MM nei lavoratori coinvolti nella produzione di fibre minerali. Studi su modelli in vivo o di tipo epidemiologico non hanno riportato alcuna evidenza di un coinvolgimento delle fibre di vetro (95, 96).

Le fibre di carburo di silicio sono state classificate come potenziali cancerogeni per l'uomo (Gruppo 2A), basandosi sui dati sperimentali ottenuti in modelli animali dove queste fibre erano in grado di indurre un processo cancerogeno che portava al MM (97). Anche i nanotubi di carbonio (CNT) sono stati presi in esame, e fra questi solo il tipo MWCNT-7 è stato classificato come possibile cancerogeno (gruppo 2B) mentre tutti gli altri CNT sono stati classificati nel gruppo 3 (97).

1.11 Rapporto dose –risposta tra esposizione all'amianto e sviluppo di MM.

Molti studi sono stati condotti per indagare in modo quantitativo la relazione tra la dose di amianto ricevuta e il rischio di sviluppare un MM. I risultati di questi studi sono riassunti e documentati in molte reviews (11). Di seguito verrà riportato l'ultimo aggiornamento di una review di natura quantitativa che era stata preparata per la II edizione della Consensus Conference italiana sul Mesotelioma Maligno (98). Qui di seguito verranno riportati solo i dati relativi al rischio assoluto o relativo di MM, classificati secondo categorie quantitative o per unità di esposizione e pubblicati su giornali indicizzati da Medline. Articoli potenzialmente rilevanti sono stati ricercati su "Pub-Med" dopo un esame accurato sia delle referenze riportate nelle reviews (11, 99-102), che del testo integrale dei lavori scientifici ottenuti dalla ricerca in Pub-Med. Dopo aver escluso i lavori sulla base del titolo, della lettura dell'abstract o del testo integrale, 59 lavori sono stati considerati degni di nota e suddivisi in due gruppi: 1 : lavori che misurano l'esposizione all'amianto volatile, o esposizioni esterne (4, 8, 19, 57, 103-146); 2: lavori che si basano sulla analisi della quantità di fibre nel polmone, o esposizioni interne (147-155). I dati sulle caratteristiche degli studi e sul rischio di insorgenza del MM sono stati riassunti secondo i formati standard adottati in un simile lavoro di revisione della II Consensus Conference Italiana sul Mesotelioma Pleurico (98).

I risultati dei 25 studi riguardanti la valutazione dell'esposizione esterna sono stati riportati in 49 articoli (Tabella 1.1). Se i dati degli studi scientifici sono stati riportati in più lavori scientifici, solo i dati più recenti e più completi sono stati estrapolati e presi in considerazione. Sono state identificate 19 coorti di pazienti inserite in studi caso controllo, la maggior parte focalizzata su lavoratori pesantemente esposti all'amianto più una coorte di abitanti di un villaggio di minatori di crocidolite in Australia (114, 138-141) e una coorte di popolazione generale della Norvegia (132). Cinque studi di popolazione caso-controllo (16, 115, 116, 119, 143) hanno permesso di analizzare la relazione tra esposizione e risposta, anche a basse dosi.

Come misura effettiva, è stato calcolato l'aumento del rischio relativo per unità di incremento nell'esposizione cumulativa di fibre/millilitro all'anno (f/mly), definito nella Tabella 1.1 con il termine "slope" (dall'inglese: pendenza). In alcuni lavori scientifici questo valore è direttamente riportato (103, 109, 112, 146). Quando non è riportato, il dato è estrapolato confrontando le categorie massime e minime di esposizione e calcolando il rapporto tra le differenze dell'eccesso di rischio relativo e la

media, o punto medio di esposizione. E' stato necessario fare anche altri calcoli: (1) convertire i tassi di incidenza in rapporto di frequenza (105, 123, 138, 142); (2) convertire secondo il coefficiente di Hodgson e Darnton (11) la misura di "milione di particelle per piede cubico" in f/mly (123). In alcuni casi non è stato possibile ottenere una stima della pendenza della curva a causa dell'uso di categorie qualitative (105, 127), o di punteggi semi-quantitativi (117, 133), perché è stata riportata l'esposizione alle polveri piuttosto che alle fibre (146) o per la mancanza di risultati organizzati secondo le diverse categorie di esposizione (111, 134). In altri due studi si è potuto calcolare solo l'aumento nella proporzione dei morti per MM rispetto alla mortalità attesa e non un cambiamento nel rischio relativo (112, 121).

Alcuni studi di coorte basati sul settore industriale, hanno permesso di diversificare il rischio a seconda del tipo di fibre di amianto utilizzato. La pendenza era più bassa per le coorti esposte al crisotilo (unità di rischio relativo intorno a 1,0003) (112, 123, 137) rispetto a quelle esposte a sostanze miste o all'amianto anfibolo (media stimata tra 1,05 e 1,7).

Negli studi caso-controllo, la pendenza era più alta, corrispondente ad un aumento di tipo non lineare, in quanto l'aumento risultava più marcato a basse esposizioni. Un aumento della pendenza è stato riscontrato anche tra i lavoratori del settore della carta e della stampa (108). In questo gruppo di persone, i livelli di esposizione erano più bassi rispetto ai lavoratori dell'amianto e confrontabili con i dati riscontrati negli studi sulla intera popolazione. Negli studi caso-controllo, le unità di incremento oscillavano tra i valori di 1,5 (in Cina, dove il crisotilo è stato largamente utilizzato) (116) e i valori di 4,4. (in Francia) (119). Una pendenza maggiore a bassi livelli di esposizione cumulativa è già stata descritta in letteratura (11). Queste differenze possono essere anche imputabili ad errori nella fase di misura delle esposizioni negli studi di popolazione, in particolare una sovrastima negli studi del settore industriale e una sotto stima in quelli della popolazione generale.

In dieci lavori scientifici sono riportati i dati di nove studi basati sui dati di accumulo di fibre nel polmone dimostrando, in accordo con i dati degli studi sulle esposizioni ambientali, un aumento di natura monotonica del rischio di sviluppare mesotelioma con l'aumentare della concentrazione di fibre o di frammenti di amianto nei polmoni (147-155).

Studio# Studio (referenze), principale referenza	Totali		Valutazione dell'esposizione	Stima del rischio	Sito di MM	Tipo di amianto	Genere	Più bassa		Più alta	rischio	pendenza	
	N° dei casi	Rischio relativo (95% CI)						categoria	rischio	categoria			
Studi di coorte e studi caso controllo nidificati													
1 Cape Amianto, UK ((4, 105, 131)), (105)	Ple Per Tutti	52 46 98		Alto vs basso e <2 anni vs >2 anni	Tasso di incidenza per 100000 anni	Tutti	Cro	Uomini Donne	Bassi e <2 anni	38 34	Alto e ≥ 2 anni	308 133	
2 Turner & Newwall, UK ((134, 156)), (134)	Ple Per Tutti	10 0 10		Livello medio (p/ml) Durata (anni), CE (p/mly)	Stima "secondo i modelli cubici di permanenza" ^a	Tutti	Mix	Uomini					
3 UNARCO, usa ((121,144, 145)), (121)	Ple Per Tutti	7 7 14		CE(f/mly)	Casi Osservati/mortalità globale attesa	Tutti	Amo	Uomini	<12	0	24-47	10.2%	0.35%
4 Amianto-cemento, Canada ((8, 113)), (113)	Ple Per Tutti	31 14 45		CE(f/mly)	OR	Tutti	Mix	Uomini	10	3.3	190	17.5	1.078
5 Operai della manutenzione del materiale rotabile, Svezia, (133)	Tutti	5		Indice cumulativo = punteggio x la durata	Nessun rischio stimato per MMs	Tutti	Mix	Uomini					
6 Raybestos- Manhattan, USA ((112, 124)), (112)	Ple Per Tutti	2 0 2		CE(f/mly)	Casi Osservati/mortalità globale attesa	Ple	Chr	Uomini					0.002%
7 Jhons Manville, USA (111)	Ple Per Tutti	6 2 8		CE(mppcfy)	Nessun rischio stimato per MMs	Tutti	Mix	Uomini					
8 Miniere di Crocidolite, Australia ((104, 106, 107, 110, 129, 130, 142)), (142)	Ple Per Tutti	241 48 329		CE(f/mly)	RR ^b	Ple Per	Cro Cro	Uomini Uomini	<10 <10	1 1	10-50 10-50	2.23 2.67	1.049 1.0679
9 Lavoratori dell'amianto- cemento, Svezia (103)	Ple	13	7.2 (1.0-54.0)	CE(f/mly)	OR	Ple	Mix	Uomini					1.7

10	Miniere di Crisotilo, Italia ((135-137)), (137)	Ple Per Tutti	7 1 8	5.5 (2.2-11.4) 1.1 (0.0-6.1)	CE(f/mly)	SMR	Ple	Chr	Uomini	<100	5.8	≥400	7.7	1.003
11	Miniere di Crisotilo, Canada ((123-126)), (123)	Ple	25		CE(f/mly) ^c	RR ^d	Ple	Chr	Uomini	<300	1	≥900	6.27	1.003
12	Miniere di Antofillite, Finlandia (127)	Ple Per Tutti	3 1 4	55.8 (11.5-163) 167 (4.2-933)	Alto/basso	SIR	Tutti	Ant	Uomini	Tutti gli altri lavoratori		Miniere e impianti di frantumazione	67.0	
13	Residenti di Wittenoom, Australia ((114, 138-141)), (138)	Ple Per Tutti	62 3 67		CE(f/mly)	RR ^e	Ple	Cro	Entrambi	<10	1	25-50	5.30	1.132
14	Industria della carta e della cellulosa	Ple	14	2.5 (1.0-6.2)	CE(f/mly)	RR	Ple	Mix	Uomini	0.01	1	0.10-0.77	1.66	2.535
15	Campagna finlandese di screening dell'amianto 1990-1992, (117)	Tutti	13	2.0 (1.0-3.4)	Indice cumulativo (punteggio x durata)	RR	Tutti	Mix	Uomini	<40	1	40-89	1.9	
16	Miniere di Vermiculite, USA, ((122, 125)), (122)	Tutti	19	94.8 (57.0-148)	CE(f/mly)	HR	Tutti	Lib	Uomini					1.01
17	Tessuti di amianto, Francia (109)	Ple Per Tutti	16 8 24		CE(f/mly)	RR	Tutti	Mix	Entrambi	<40	1	≥140	2.3	1.003
18	Studio di coorte Olandese, (132)	Ple Per Tutti	145 10 155	3.02 (2.11-4.32)	CE(f/mly)	RR	Ple	Mix	Uomini					1.08
19	Programma "Amianto", Polonia, (146)	Tutti	131		CE(f/mly)	OR	Tutti	Mix	Entrambi	0	1.0	100	1.53	
Studi caso controllo														
20	Cinque regioni francesi, ((115,120)), (115)	Ple	405	3.6 (2.4-5.3) certo	CE(f/mly)	OR	Ple	Mix	Uomini	0.001-0.49	1.2	1-9.9	5.2	1.762
21	Amburgo, 1988-1991, Germania, (143)	Ple	125		CE(f/mly)	OR	Ple	Mix	Uomini	0-0.15	9.2	1.5-15	32.2	3.813

22 Dipartimenti 1998-2002, Francia ((119, 120)), (119)	Ple	437	Uomini: 11.4 (6.1-21.4) Donne: 12.0 (3.5-41.7)	CE(f/mly)	OR	Ple	Mix	Uomini	0-0.1	4.0	1-10	22.5	4.394
23 Casale Monferrato, 2001-2006, Italia (16)	Ple	200		CE(f/mly)	OR	Ple	Mix	Entrambi	0-0.1	1	1-10	17.5	3.646
24 Cina meridionale 1998-2011, (116)	Ple	46		CE(f/mly)	OR	Ple	Chr	Entrambi	0-0.5	28.0	0.5-29	36.0	1.535
Altre tipologie di studio													
25 Popolazione Amagasaki, Giappone ((19, 118)), (19)	Tutti	121		Distanza dei centri residenziali dalle sorgenti industriali	SMR	Tutti	Mix	Uomini Donne			Area più vicina Area più vicina	23.0 47.7	

Lista delle abbreviazioni: *Amo*, amosite, *Ant* antrofillite, *CE* esposizione cumulativa, *Chr*, crisotilo, *Cro* crocidolite, *Exp*, atteso, *f/mly* fibre per millilitro-per anno, *HR*, hazard ratio, *JEM* matrice lavoro per esposizione, *Mix*, fibre miste, *MM* mesotelioma maligno, *mppcfy*, milioni di particelle per piede cubico all'anno. *Obs*, osservati. *OR* odds ratio, *p/mly* particelle per millilitro per anno, *Per* peritoneo, *Ple*, pleura, *RR* rapporto tra i tassi, *SMR* rapporto di mortalità standardizzato. *TSFE*, tempo dalla prima esposizione, *TSLE* tempo dall'ultima esposizione.

a, dove l'incidenza e' calcolata secondo un modello lineare in funzione della CE

b, RR calcolato sui tassi come pubblicato

c, CE riportato come mppcfy dagli autori. Il fattore di conversione (1 mppcfy = 3 f/mly), è stato proposto da Hodgson e Darnton (11). Il tasso di mortalità delle miniere di amianto e di Thetford è stato calcolato secondo i dati riportati nella tabella 9

d, RR calcolato dai tassi (dai dati in Tabella 9)

e, RR calcolato secondo i tassi pubblicati

f, calcolato in base al tempo intercorso (20 anni)

1.12 Tempo di latenza tra esposizione all'amianto e diagnosi di MM

L'intervallo temporale tra l'inizio dell'esposizione all'amianto e l'insorgenza del MM è generalmente molto lunga, con una mediana di circa 30 anni (147-155).

L'incidenza di MM dopo l'esposizione all'amianto, mostra un aumento di tipo lineare con l'esposizione ed un aumento di tipo esponenziale (con una potenza che oscilla tra i valori di 3 e 4) con il tempo intercorso dall'esposizione (definito in gergo tecnico come: latenza). Sebbene tutte le esposizioni contribuiscano alla incidenza del MM, le prime esposizioni pesano di più sulla insorgenza della malattia. La possibilità che esista una relazione tra insorgenza del MM, esposizione e latenza è stata presa in esame fin dai primi studi che hanno indagato il nesso causale tra amianto e MM (147-155). I dettagli degli algoritmi matematici utilizzati sono descritti nelle reviews riportate in bibliografia (21, 98). La review pubblicata dall'Health Effects Institute (HEI) (21) presenta l'algoritmo che tiene in considerazione la diversa durata dell'esposizione (breve o prolungata) e il tipo di esposizione (costante o variabile). Viene spesso introdotto il concetto di tempo minimo di latenza ("lag time"), inteso come il tempo più breve richiesto per l'insorgenza del MM.

Contrariamente a molti errori di interpretazione, poiché non ci sono evidenze scientifiche per determinare una soglia, il valore della relazione tra MM e latenza deve tenere in considerazione tutti i tipi di esposizioni (ad eccezione del lag time), ciascuna con il suo specifico peso legato al tempo di latenza intercorso.

Questi modelli di potenza assumono che l'incidenza del MM continuerà ad aumentare in modo costante dopo l'esposizione, senza un limite ben preciso. Studi recenti, basati sulle analisi di follow-up più lunghi, suggeriscono che per il MM pleurico si potrà assistere ad una attenuazione dell'aumento del rischio dopo un lungo periodo di latenza (dopo i 40-50 anni), mentre il rischio continuerà ad aumentare per il MM peritoneale (106, 159-161).

1.13 Altri Fattori di Rischio

1.13.1 Radiazioni Ionizzanti

La possibile relazione tra radiazioni ionizzanti e MM è stata studiata prendendo in considerazione tre diverse modalità di esposizione: (1) l'uso del composto Torotrasto per la diagnostica di immagini; (2) l'utilizzo di radiazioni per la terapia oncologica; (3) l'esposizione a radiazioni per motivi professionali, in particolar modo quelle legate all'industria nucleare.

Riguardo al primo punto sono stati selezionati cinque rapporti che descrivono studi di coorte su soggetti esposti al Torotrasto: due hanno dimostrato un aumento della frequenza sia del MM pleurico che di quello peritoneale, due un aumento della frequenza solo del MM peritoneale mentre il quinto studio non ha fornito dati sul MM (vedere la review n° 162). Va sottolineato che l'uso del Torotrasto risale agli anni 1930-1935, per cui il suo contributo all'insorgenza del MM si ritiene sia oramai minimo (24, 98).

Per quanto riguarda il secondo punto, un aumento di frequenza di MM è stato registrato in diversi studi di coorte che prendevano in esame pazienti oncologici lungo sopravvivenza. La review di Goodman e collaboratori (162) riportava un Rischio Relativo (RR) in un range compreso tra i 6,6 e i 25,7 per i pazienti lungo sopravvivenza con diagnosi iniziale di Linfoma di Hodgkin, un RR tra 0,8 e 2,24 per i pazienti con diagnosi iniziale di linfoma non-Hodgkin e un RR tra 1,29 e 3,74 per le pazienti che hanno avuto un tumore primitivo al seno. Solo uno studio ha documentato un RR di 4 per il MM in pazienti con un tumore primitivo ai testicoli. Sulla base di queste osservazioni e sul numero di incidenza di queste patologie, fu stimato che in Italia, il numero di MM attribuibili a questa modalità di esposizione fosse in un range compreso tra 20 e 56 casi per anno (98).

La letteratura scientifica ha anche riportato casi di MM in persone esposte a radiazioni ionizzanti per motivi professionali, dove la categoria più a rischio era quella dei lavoratori del settore nucleare, anche se non si poteva escludere per questa categoria professionale una esposizione all'amianto (162).

1.13.2 Virus

I primi studi ipotizzarono una possibile relazione tra l'insorgenza del MM e l'infezione da SV40. Tuttavia, dopo oltre 10 lunghi anni di dibattito e grazie a nuove evidenze sperimentali ottenute ricercando il DNA virale nel tumore o nel siero di pazienti affetti da MM, gli studi più recenti non hanno dimostrato la presenza di infezione nel siero dei pazienti con MM prima della diagnosi. In conclusione i dati scientifici non supportano più l'ipotesi di una associazione causale tra MM e infezione virale (98).

1.4 Conclusioni

IL MM è una costante eredità legata all'esposizione all'amianto che colpisce sia i paesi in cui sono state usate le fibre di amianto sia le aree in cui sono presenti giacimenti naturali di queste fibre minerali.

L'estensione dell'esposizione all'amianto nelle aree occupazionali è atteso diminuire in quei paesi che hanno adottato misure per la riduzione del suo utilizzo, mentre sembra ancora sottostimato il contributo dei diversi profili di esposizione di tipo non occupazionale, a causa del livello più basso di esposizione, sebbene non trascurabile, ma comunque sufficiente per causare la morte.

La relazione tra l'incidenza di MM e la dose indica che il rischio inizia ad aumentare già a basse dosi, senza una soglia precisa e aumenta con l'aumentare della dose cumulativa di esposizione. Il contributo degli altri fattori di rischio, diversi dalle fibre minerali, è molto limitato.

A causa della chiara associazione con l'esposizione cumulativa e il lungo tempo di latenza della malattia, la messa al bando dell'amianto sembra oggi l'unica reale soluzione per evitare il propagarsi delle epidemia di MM.

Referenze

1. Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med.* 1960;17:260–71.
2. IARC. Asbestos. In: IARC monographs evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 14. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1977. p. 1–104.
3. IARC. Asbestos. In: Some inorganic and organometallic compounds. IARC monographs evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 2. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1973. p. 17–47.
4. Newhouse ML, Berry G. Predictions of mortality from mesothelial tumours in asbestos factory workers. *Br J Ind Med.* 1976;33:147–51.
5. Peto J, Seidman H, Selikoff IJ. Mesothelioma mortality in asbestos workers: implications for models of carcinogenesis and risk assessment. *Br J Cancer.* 1982;45:124–35.
6. Selikoff IJ. Lung cancer and mesothelioma during prospective surveillance of 1249 asbestos insulation workers, 1963-1974. *Ann N Y Acad Sci.* 1976;271:448–56.
7. McDonald JC, McDonald AD, Gibbs GW, Siemiatycki J, Rossiter CE. Mortality in the chrysotile asbestos mines and mills of Quebec. *Arch Environ Health.* 1971;22:677.
8. Finkelstein MM. Mortality among employees of an Ontario asbestos-cement factory. *Am Rev Resp Dis.* 1984;129:754–61.
9. Rubino GF, Piolatto G, Newhouse ML, Scansetti G, Aresini GA, Murray R. Mortality of chrysotile asbestos workers at the Balangero Mine, Northern Italy. *Br J Ind Med.* 1979;36:187–94.
10. Davis JM. Mineral fibre carcinogenesis: experimental data relating to the importance of fibre type, size, deposition, dissolution and migration. *IARC Sci Publ.* 1989;90:33–45.
11. Hodgson JT, Darnton A. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Ann Occup Hyg.* 2000;44:565–601.
12. IARC. Asbestos. In: Arsenic, metals, fibres and dusts. IARC monographs evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 100C. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012. p. 219–310.

13. Landrigan PJ. The third wave of asbestos disease: exposure to asbestos in place. Public health control. Introduction. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;643:xv–xvi.
14. Anderson HA, Lilis R, Daum SM, Fischbein AS, Selikoff IJ. Household-contact asbestos neoplastic risk. *Ann N Y Acad Sci.* 1976;271:311–23.
15. Ferrante D, Bertolotti M, Todesco A, Mirabelli D, Terracini B, Magnani C. Cancer mortality and incidence of mesothelioma in a cohort of wives of asbestos workers in Casale Monferrato, Italy. *Environ Health Perspect.* 2007;115:1401–5.
16. Ferrante D, Mirabelli D, Tunesi S, Terracini B, Magnani C. Pleural mesothelioma and occupational and non-occupational asbestos exposure: a case-control study with quantitative risk assessment. *Occup Environ Med.* 2016;73:147–53.
17. Gardner MJ, Saracci R. Effects on health of nonoccupational exposure to airborne mineral fibres. In: Bignon J, Peto J, Saracci R, editors. Nonoccupational exposure to mineral fibres, IARC scientific publications no. 90. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 1989. p. 375–97.
18. Goldberg P, Goldberg M, Marne MJ, Hirsch A, Tredaniel J. Incidence of pleural mesothelioma in New Caledonia: a 10-year survey (1978-1987). *Arch Environ Health.* 1991;46:306–9.
19. Kurumatani N, Kumagai S. Mapping the risk of mesothelioma due to neighborhood asbestos exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178:624–9.
20. Magnani C, Agudo A, González CA, Andron A, Calleja A, Chellini E, Dalmaso P, Escolar A, Hernandez S, Ivaldi C, Mirabelli D, Ramirez J, Turuguet D, Usel M, Terracini B. Multicentric study on malignant pleural mesothelioma and nonoccupational exposure to asbestos. *Br J Cancer.* 2000;83:104–11.
21. HEI Health Effects Institute - Asbestos Research. Asbestos in public and commercial buildings. Cambridge: Health Effects Institute – Asbestos Research; 1991.
22. Magnani C, Bianchi C, Chellini E, Consonni D, Fubini B, Gennaro V, Marinaccio A, Menegozzo M, Mirabelli D, Merler E, Merletti F, Musti M, Oddone E, Romanelli A, Terracini B, Zona A, Zocchetti C, Alessi M, Baldassarre A, Dianzani I, Maule M, Mensi C, Silvestri S. III Italian Consensus Conference on Malignant Mesothelioma of the Pleura. *Epidemiology, Public Health and Occupational Medicine related issues. Med Lav.* 2015;106:325–32.
23. Novello S, Pinto C, Torri V, Porcu L, Di Maio M, Tiseo M, Ceresoli G, Magnani C, Silvestri S, Veltri A, Papotti M, Rossi G, Ricardi U, Trodella L, Rea F, Facciolo F, Granieri A, Zagonel V, Scagliotti G. The third Italian consensus conference for malignant pleural mesothelioma: state of the art and recommendations. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016;104:9–20.
24. Pinto C, Novello S, Torri V, Ardizzoni A, Betta PG, Bertazzi PA, Casalini GA, Fava C, Fubini B, Magnani C, Mirabelli D, Papotti M, Ricardi U, Rocco G, Pastorino U, Tassi G, Trodella L, Zompatori M, Scagliotti G. Second Italian consensus conference on malignant pleural mesothelioma: state of the art and recommendations. *Cancer Treat Rev.* 2013;39:328–39.
25. Wolff H, Vehmas T, Oksa P, Rantanen J, Vainio H. Asbestos, asbestosis, and cancer, the Helsinki criteria for diagnosis and attribution 2014: recommendations. *Scand J Work Environ Health.* 2015;41:5–15.
26. Odgerel CO, Takahashi K, Sorahan T, Driscoll T, Fitzmaurice C, Yoko-O M, Sawanyawisuth K, Furuya S, Tanaka F, Horie S, Zandwijk NV, Takala J. Estimation of the global burden of mesothelioma deaths from incomplete national mortality data. *Occup Environ Med.* 2017;74:851–8.
27. Delgermaa V, Takahashi K, Park EK, Le GV, Hara T, Sorahan T. Global mesothelioma deaths reported to the World Health Organization between 1994 and 2008. *Bull World Health Organ.* 2011;89:716–24.
28. Park EK, Takahashi K, Hoshuyama T, Cheng TJ, Delgermaa V, Le GV, Sorahan T. Global magnitude of reported and unreported mesothelioma. *Environ Health Perspect.* 2011;119:514–8.
29. Diandini R, Takahashi K, Park EK, Jiang Y, Movahed M, Le GV, Lee LJ, Delgermaa V, Kim R. Potential years of life lost (PYLL) caused by asbestos-related diseases in the world. *Am J Ind Med.* 2013;56:993–1000.
30. Marinaccio A, Binazzi A, Di Marzio D, Scarselli A, Verardo M, Mirabelli D, Gennaro V, Mensi C, Riboldi L, Merler E, Zotti RD, Romanelli A, Chellini E, Silvestri S, Pascucci C, Romeo E, Menegozzo S, Musti M, Cavone D, Cauzillo G, Tumino R, Nicita C, Melis M, Iavicoli S. Pleural malignant mesothelioma epidemic. Incidence, modalities of asbestos exposure and occupations involved from the Italian national register. *Int J Cancer.* 2012;130:2146–54.
31. Marinaccio A, Binazzi A, Bonafede M, et al. Quinto rapporto. Il Registro Nazionale dei Mesoteliomi. INAIL, Milano. 2015.
32. Ferrante P, Binazzi A, Branchi C, Marinaccio A. National epidemiological surveillance systems of mesothelioma cases. *Epidemiol Prev.* 2016;40:215–23.
33. Leigh J, Davidson P, Hendrie L, Berry D. Malignant mesothelioma in Australia, 1945-2000. *Am J Ind Med.* 2002;41:188–201.
34. Goldberg M, Imbernon E, Rolland P, Gilg Soit Ilg A, Savès M, de Quillacq A, Frenay C, Chamming's S, Arveux P, Boutin C, Launoy G, Pairon JC, Astoul P, Galateau-Sallé F, Brochard P. The French national mesothelioma surveillance program. *Occup Environ Med.* 2006;63:390–5.
35. Jung SH, Kim HR, Koh SB, Yong SJ, Chung MJ, Lee CH, Han J, Eom MS, Oh SS. A decade of malignant mesothelioma surveillance in Korea. *Am J Ind Med.* 2012;55:869–75.

36. Marinaccio A, Montanaro F, Mastrantonio M, et al. Predictions of mortality from pleural mesothelioma in Italy: a model based on asbestos consumption figures supports results from age-period-cohort models. *Int J Cancer*. 2005;115:142–7.
37. Magnani C, Dalmaso P, Biggeri A, Ivaldi C, Mirabelli D, Terracini B. Increased risk of malignant mesothelioma of the pleura after residential or domestic exposure to asbestos: a case-control study in Casale Monferrato, Italy. *Environ Health Perspect*. 2001;109:915–9.
38. Musti M, Pollice A, Cavone D, Dragonieri S, Bilancia M. The relationship between malignant mesothelioma and an asbestos cement plant environmental risk: a spatial case-control study in the city of Bari (Italy). *Int Arch Occup Environ Health*. 2009;82:489–97.
39. Mensi C, Riboldi L, De Matteis S, Bertazzi PA, Consonni D. Impact of an asbestos cement factory on mesothelioma incidence: global assessment of effects of occupational, familial, and environmental exposure. *Environ Int*. 2015;74:191–9.
40. Dodoli D, Del Nevo M, Fiumalbi C, Iaia TE, Cristaudo A, Comba P, Viti C, Battista G. Environmental household exposures to asbestos and occurrence of pleural mesothelioma. *Am J Ind Med*. 1992;21:681–7.
41. Comba P, D'Angelo M, Fazzo L, Magnani C, Marinaccio A, Mirabelli D, Terracini B. Mesothelioma in Italy: the Casale Monferrato model to a national epidemiological surveillance system. *Ann Ist Super Sanita*. 2018;54:139–48.
42. Mirabelli D, Calisti R, Barone-Adesi F, Fornero E, Merletti F, Magnani C. Excess of mesotheliomas after exposure to chrysotile in Balangero, Italy. *Occup Environ Med*. 2008;65:815–9.
43. Marinaccio A, Binazzi A, Bonafede M, Corfiati M, Di Marzio D, Scarselli A, Verardo M, Mirabelli D, Gennaro V, Mensi C, Schallemborg G, Merler E, Negro C, Romanelli A, Chellini E, Silvestri S, Cocchioni M, Pascucci C, Stracci F, Ascoli V, Trafficante L, Angelillo I, Musti M, Cavone D, Cauzillo G, Tallarigo F, Tumino R, Melis M. Malignant mesothelioma due to non-occupational asbestos exposure from Italian national surveillance system (ReNaM): epidemiology and public health issues. *Occup Environ Med*. 2015;72:648–55.
44. Corfiati M, Scarselli A, Binazzi A, et al. Epidemiological patterns of asbestos exposure and spatial clusters of incident cases of malignant mesothelioma from the Italian national registry. *BMC Cancer*. 2015;15:286.
45. Binazzi A, Marinaccio A, Corfiati M, Bruno C, Fazzo L, Pasetto R, Pirastu R, Biggeri A, Catelan D, Comba P, Zona A. Mesothelioma incidence and asbestos exposure in Italian national priority contaminated sites. *Scand J Work Environ Health*. 2017;43:550–9.
46. Okello C, Treasure T, Nicholson AG, Peto J, Møller H. Certified causes of death in patients with mesothelioma in South East England. *BMC Cancer*. 2009;9:28.
47. HSE. www.hse.gov.uk/statistics/causdis/mesothelioma/mesothelioma.pdf. Accessed 28 Sept 2018.
48. Mazurek JM, Syamlal G, Wood JM, Hendricks SA, Weston A. Malignant mesothelioma mortality - United States, 1999-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2017;66:214–8.
49. Gogou E, Kerenidi T, Chamos V, Zintzaras E, Gourgoulianis KI. Mesothelioma mortality in Greece from 1983 to 2003. *Int J Clin Pract*. 2009;63:944–8.
50. López-Abente G, Hernández-Barrera V, Pollán M, Aragonés N, Pérez-Gómez B. Municipal pleural cancer mortality in Spain. *Occup Environ Med*. 2005;62:195–9.
51. López-Abente G, García-Gómez M, Menéndez-Navarro A, Fernández-Navarro P, Ramis R, García-Pérez J, Cervantes M, Ferreras E, Jiménez-Muñoz M, Pastor-Barriuso R. Pleural cancer mortality in Spain: time-trends and updating of predictions up to 2020. *BMC Cancer*. 2013;13:528.
52. Pedra F, Tambellini AT, Pereira Bde B, da Costa AC, de Castro HA. Mesothelioma mortality in Brazil, 1980-2003. *Int J Occup Environ Health*. 2008;14(3):170–5. Erratum in: *Int J Occup Environ Health*. 2009;15:391
53. Pasetto R, Terracini B, Marsili D, Comba P. Occupational burden of asbestos-related cancer in Argentina, Brazil, Colombia, and Mexico. *Ann Glob Health*. 2014;80:263–8.
54. Fazzo L, Minelli G, De Santis M, Bruno C, Zona A, Conti S, Comba P. Epidemiological surveillance of mesothelioma mortality in Italy. *Cancer Epidemiol*. 2018;55:184–91.
55. Ferrante P, Mastrantonio M, Uccelli R, Corfiati M, Marinaccio A. Pleural mesothelioma mortality in Italy: time series reconstruction (1970-2009) and comparison with incidence (2003-2008). *Epidemiol Prev*. 2016;40:205–14.
56. Montanaro F, Bray F, Gennaro V, Merler E, Tyczynski JE, Parkin DM, Strnad M, Jechov'a M, Storm HH, Aareleid T, Hakulinen T, Velten M, Lef'evre H, Danzon A, Buemi A, Daur'es JP, Ménégos F, Raverdy N, Sauvage M, Ziegler H, Comber H, Paci E, Vercelli M, De Lisi V, Tumino R, Zanetti R, Berrino F, Stanta G, Langmark F, Rachtan J, Mezyk R, Blaszczyk J, Ivan P, Primic-Zakelj M, Martínez AC, Izarzugaza I, Borrás J, Garcia CM, Garau I, Sánchez NC, Aicua A, Barlow L, Torhorst J, Bouchardy C, Levi F, Fisch T, Probst N, Visser O, Quinn M, Gavin A, Brewster D, Mikov M, ENCR Working Group. Pleural mesothelioma incidence in Europe: evidence of some deceleration in the increasing trends. *Cancer Causes Control*. 2003;14:791–803.
57. Pelucchi C, Malvezzi M, La Vecchia C, Levi F, Decarli A, Negri E. The mesothelioma epidemic in Western Europe: an update. *Br J Cancer*. 2004;90:1022–4.
58. Hodgson JT, McElvenny DM, Darnton AJ, et al. The expected burden of mesothelioma mortality in Great Britain from 2002 to 2050. *Br J Cancer*. 2005;92:587–93.

59. Tan E, Warren N, Darnton AJ, Hodgson JT. Projection of mesothelioma mortality in Britain using Bayesian methods. *Br J Cancer*. 2010;103:430–6.
60. Le Stang N, Belot A, Gilg Soit Ilg A, et al. Evolution of pleural cancers and malignant pleural mesothelioma incidence in France between 1980 and 2005. *Int J Cancer*. 2010;126:232–8.
61. Marinaccio A, Corfiati M, Binazzi A, Di Marzio D, Scarselli A, Ferrante P, Bonafede M, Verardo M, Mirabelli D, Gennaro V, Mensi C, Schallemborg G, Mazzoleni G, Merler E, Girardi P, Negro C, D'Agostin F, Romanelli A, Chellini E, Silvestri S, Pascucci C, Calisti R, Stracci F, Romeo E, Ascoli V, Trafficante L, Carrozza F, Angelillo IF, Cavone D, Cauzillo G, Tallarigo F, Tumino R, Melis M, Iavicoli S, ReNaM Working Group. The epidemiology of malignant mesothelioma in women: gender differences and modalities of asbestos exposure. *Occup Environ Med*. 2018;75:254–62.
62. Segura O, Burdorf A, Looman C. Update of predictions of mortality from pleural mesothelioma in the Netherlands. *Occup Environ Med*. 2003;60:50–5.
63. Kjaergaard J, Andersson M. Incidence rates of malignant mesothelioma in Denmark and predicted future number of cases among men. *Scand J Work Environ Health*. 2000;26:112–7.
64. Ulvestad B, Kjaerheim K, Møller B, Andersen A. Incidence trends of mesothelioma in Norway, 1965-1999. *Int J Cancer*. 2003;107:94–8.
65. Price B, Ware A. Time trend of mesothelioma incidence in the United States and projection of future cases: an update based on SEER data for 1973 through 2005. *Crit Rev Toxicol*. 2009;39:576–88.
66. Myojin T, Azuma K, Okumura J, Uchiyama I. Future trends of mesothelioma mortality in Japan based on a risk function. *Ind Health*. 2012;50:197–204.
67. Le GV, Takahashi K, Park EK, et al. Asbestos use and asbestos-related diseases in Asia: past, present and future. *Respirology*. 2001;16:767–75.
68. Järholm B, Burdorf A. Emerging evidence that the ban on asbestos use is reducing the occurrence of pleural mesothelioma in Sweden. *Scand J Public Health*. 2015;43:875–81.
69. Buresti G, Colonna F, Corfiati M, et al. Economic impact of malignant mesothelioma in Italy: an estimate of the public and social costs. *Med Lav*. 2017;108:358–66.
70. Burlikov T, Michailova L. Asbestos content of the soil and endemic pleural asbestosis. *Environ Res*. 1970;3:443–51.
71. Hillerdal G. Mesothelioma: cases associated with non-occupational and low dose exposures. *Occup Environ Med*. 1999;56:505–13.
72. Yazicioglu S, İlçayto R, Balci K, Sayli BS, Yorulmaz B. Pleural calcification, pleural mesotheliomas, and bronchial cancers caused by tremolite dust. *Thorax*. 1980;35:564–9.
73. Pasetto R, Comba P, Marconi A. Mesothelioma associated with environmental exposures. *Med Lav*. 2005;96:330–7.
74. Liu XZ, Luo SQ, Wang ZM, Wang MZ, Zhan CL. An investigation of crocidolite contamination and mesothelioma in a rural area of China. *Biomed Environ Sci*. 1990;3:156–65.
75. Luo S, Liu X, Mu S, Tsai SP, Wen CP. Asbestos related diseases from environmental exposure to crocidolite in Da-yao, China. I. Review of exposure and epidemiological data. *Occup Environ Med*. 2003;60:35–41.
76. Pan XL, Day HW, Wang W, Beckett LA, Schenker MB. Residential proximity to naturally occurring asbestos and mesothelioma risk in California. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:1019–25.
77. Baris YI, Sahin AA, Ozesmi M, Kerse I, Ozen E, Kolacan B, Altinörs M, Göktepe A. An outbreak of pleural mesothelioma and chronic fibrosing pleurisy in the village of Karain/Urgüp in Anatolia. *Thorax*. 1978;33:181–92.
78. Barış YI, Grandjean P. Prospective study of mesothelioma mortality in Turkish villages with exposure to fibrous zeolite. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:414–7.
79. Simonato L, Barış R, Saracci R, et al. Relation of environmental exposure to erionite fibres to risk of respiratory cancer. *IARC Sci Publ*. 1989;90:398–405.
80. IARC. Erionite. In: Arsenic, metals, fibres and dusts. IARC monographs evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 100C. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2012. p. 311–6.
81. IARC. Silica and some silicates. IARC monographs evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 42. International Agency for Research on Cancer: Lyon; 1987.
82. Espejo-Herrera N, Gràcia-Lavedan E, Boldo E, Aragonés N, Pérez-Gómez B, Pollán M, Molina AJ, Fernández T, Martín V, La Vecchia C, Bosetti C, Tavani A, Polesel J, Serraino D, Gómez Acebo I, Altzibar JM, Ardanaz E, Burgui R, Pisa F, Fernández-Tardón G, Tardón A, Peiró R, Navarro C, Castaño-Vinyals G, Moreno V, Righi E, Aggazzotti G, Basagaña X, Nieuwenhuijsen M, Kogevinas M, Villanueva CM. Colorectal cancer risk and nitrate exposure through drinking water and diet. *Int J Cancer*. 2016;139:334–46.
83. Baumann F, Maurizot P, Mangas M, Ambrosi JP, Douwes J, Robineau B. Pleural mesothelioma in New Caledonia: associations with environmental risk factors. *Environ Health Perspect*. 2011;119:695–700.
84. Baumann F, Rougier Y, Ambrosi JP, Robineau BP. Pleural mesothelioma in New Caledonia: an acute environmental concern. *Cancer Detect Prev*. 2007;31:70–6.
85. Naik SL, Lewin M, Young R, Dearwent SM, Lee R. Mortality from asbestos-associated disease in Libby, Montana 1979-2011. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2017;27:207–13.

86. Whitehouse AC, Black CB, Heppe MS, Ruckdeschel J, Levin SM. Environmental exposure to Libby asbestos and mesotheliomas. *Am J Ind Med.* 2008;51:877–80.
87. Caputo A, De Santis M, Manno V, Cauzillo G, Bruni BM, Palumbo L, Conti S, Comba P. Health impact of asbestos fibres naturally occurring in Mount Pollino area (Basilicata Region, Southern Italy). *Epidemiol Prev.* 2018;42:142–50.
88. Bruno C, Tumino R, Fazzo L, Cascone G, Cernigliaro A, De Santis M, Giurdanella MC, Nicita C, Rollo PC, Scodotto S, Spata E, Zona A, Comba P. Incidence of pleural mesothelioma in a community exposed to fibres with fluoro-edenitic composition in Biancavilla (Sicily, Italy). *Ann Ist Super Sanita.* 2014;50:111–8.
89. Paoletti L, Batisti D, Bruno C, Di Paola M, Gianfagna A, Mastrantonio M, Nesti M, Comba P. Unusually high incidence of malignant pleural mesothelioma in a town of the eastern Sicily: an epidemiological and environmental study. *Arch Environ Occup Health.* 2000;55:392–8.
90. Comba P, Gianfagna A, Paoletti L. The pleural mesothelioma cases in Biancavilla are related to the new fluoro-edenite fibrous amphibole. *Arch Environ Occup Health.* 2003;58:229–32.
91. Gianfagna A, Oberti R. Fluoro-edenite from Biancavilla (Catania, Sicily, Italy). Crystal chemistry of a new amphibole end-member. *Am Mineral.* 2001;83:1486–93.
92. Belpoggi F, Tibaldi E, Lauriola M, Bua L, Falcioni L, Chiozzotto D, Manservigi F, Manservigi M, Soffritti M. The efficacy of long-term bioassays in predicting human risks: mesotheliomas induced by fluoro-edenitic fibres present in lava stone from the Etna volcano in Biancavilla, Italy. *Eur J Oncol.* 2011;16:185–96.
93. Soffritti M, Minardi F, Bua L, Degli Esposti D, Belpoggi F. First experimental evidence of peritoneal and pleural mesotheliomas induced by fluoro-edenite fibres present in Etnean volcanic material from Biancavilla (Sicily, Italy). *Eur J Oncol.* 2004;9:169–75.
94. IARC. Fluoro-edenite. In: Some nanomaterials and some fibres. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 111. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. p. 215–42.
95. IARC. Man-made vitreous fibres. IARC monographs evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 81. International Agency for Research on Cancer: Lyon; 2002.
96. Utell MJ, Maxim LD. Refractory ceramic fiber (RCF) toxicity and epidemiology: a review. *Inhal Toxicol.* 2010;22:500–21.
97. IARC. Carbon nanotubes. In: Some nanomaterials and some fibres. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, vol. 111. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017. p. 35–214.
98. Magnani C, Fubini B, Mirabelli D, Bertazzi PA, Bianchi C, Chellini E, Gennaro V, Marinaccio A, Menegozzo M, Merler E, Merletti F, Musti M, Pira E, Romanelli A, Terracini B, Zona A. Pleural mesothelioma: epidemiological and public health issues. Report from the Second Italian Consensus Conference on Pleural Mesothelioma. *Med Lav.* 2013;104:191–202.
99. Berman DW, Crump KS. Update of potency factors for asbestos-related lung cancer and mesothelioma. *Crit Rev Toxicol.* 2008;38(Suppl 1):1–47.
100. Boffetta P, Stayner LT. Pleural and peritoneal neoplasms. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF, editors. *Cancer epidemiology and prevention.* 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2006. p. 659–73.
101. Goodman M, Morgan RW, Ray R, Malloy CD, Zhao K. Cancer in asbestos-exposed occupational cohorts: a meta-analysis. *Cancer Causes Control.* 1999;10:453–65.
102. Lash TL, Crouch EA, Green LC. A meta-analysis of the relation between cumulative exposure to asbestos and relative risk of lung cancer. *Occup Environ Med.* 1997;54:254–63.
103. Albin M, Jakobsson K, Attewell R, et al. Mortality and cancer morbidity in cohorts of asbestos cement workers and referents. *Br J Ind Med.* 1990;47:602–10.
104. Berry G, de Klerk NH, Reid A, et al. Malignant pleural and peritoneal mesotheliomas in former miners and millers of crocidolite at Wittenoom, Western Australia. *Occup Environ Med.* 2004;61:e14.
105. Berry G, Newhouse ML, Wagner JC. Mortality from all cancers of asbestos factory workers in East London 1933–80. *Occup Environ Med.* 2000;57:782–5.
106. Berry G, Reid A, Aboagye-Sarfo P, de Klerk NH, Olsen NJ, Merler E, Franklin P, Musk AW. Malignant mesotheliomas in former miners and millers of crocidolite at Wittenoom (Western Australia) after more than 50 years follow-up. *Br J Cancer.* 2012;106:1016–20.
107. Berry G. Prediction of mesothelioma, lung cancer, and asbestosis in former Wittenoom asbestos workers. *Br J Ind Med.* 1991;48:793–802.
108. Carel R, Boffetta P, Kauppinen T, Teschke K, Andersen A, Jäppinen P, Pearce N, Rix BA, Bergeret A, Coggon D, Persson B, Szadkowska-Stanczyk I, Kielkowski D, Henneberger P, Kishi R, Facchini LA, Sala M, Colin D, Kogevinas M. Exposure to asbestos and lung and pleural cancer mortality among pulp and paper industry workers. *J Occup Environ Med.* 2002;44:579–84.
109. Clin B, Morlais F, Launoy G, Guizard AV, Dubois B, Bouvier V, Desoubreaux N, Marquignon MF, Raffaelli C, Paris C, Galateau-Salle F, Guittet L, Letourneux M. Cancer incidence within a cohort occupationally exposed to asbestos: a study of dose—response relationships. *Occup Environ Med.* 2011;68:832–6.
110. de Klerk NH, Armstrong BK, Musk AW, Hobbs MS. Cancer mortality in relation to measures of occupational exposure to crocidolite at Wittenoom Gorge in Western Australia. *Br J Ind Med.* 1989;46:529–36.

111. Enterline PE, Hartley J, Henderson V. Asbestos and cancer: a cohort followed up to death. *Br J Ind Med.* 1987;44:396–401.
112. Finkelstein MM, Meisenkothen C. Malignant mesothelioma among employees of a Connecticut factory that manufactured friction materials using chrysotile asbestos. *Ann Occup Hyg.* 2010;54:692–6.
113. Finkelstein MM. Analysis of the exposure-response relationship for mesothelioma among asbestocement factory workers. *Ann N Y Acad Sci.* 1991;643:85–9.
114. Hansen J, de Klerk NH, Musk AW, Hobbs MS. Environmental exposure to crocidolite and mesothelioma: exposure-response relationships. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157:69–75.
115. Iwatsubo Y, Pairon JC, Boutin C, Ménard O, Massin N, Caillaud D, Orłowski E, Galateau-Salle F, Bignon J, Brochard P. Pleural mesothelioma: dose-response relation at low levels of asbestos exposure in a French population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 1998;148:133–42.
116. Jiang Z, Chen T, Chen J, Ying S, Gao Z, He X, Miao C, Yu M, Feng L, Xia H, Wu W, Chen R, Morinaga K, Lou J, Zhang X. Hand-spinning chrysotile exposure and risk of malignant mesothelioma: a casecontrol study in Southeastern China. *Int J Cancer.* 2018;142:514–23.
117. Koskinen K, Pukkala E, Martikainen R, Reijula R, Karjalainen A. Different measures of asbestos exposure in estimating risk of lung cancer and mesothelioma among construction workers. *J Occup Environ Med.* 2002;44:1190–6.
118. Kumagai S, Kurumatani N. Asbestos fiber concentration in the area surrounding a former asbestos cement plant and excess mesothelioma deaths in residents. *Am J Ind Med.* 2009;52:790–8.
119. Lacourt A, Gramond C, Rolland P, Ducamp S, Audignon S, Astoul P, Chamming's S, Gilg Soit Ilg A, Rinaldo M, Raherison C, Galateau-Salle F, Imbernon E, Pairon JC, Goldberg M, Brochard P. Occupational and non-occupational attributable risk of asbestos exposure for malignant pleural mesothelioma. *Thorax.* 2014;69:532–9.
120. Lacourt A, Leffondré K, Gramond C, Ducamp S, Rolland P, Gilg Soit Ilg A, Houot M, Imbernon E, Févotte J, Goldberg M, Brochard P. Temporal patterns of occupational asbestos exposure and risk of pleural mesothelioma. *Eur Respir J.* 2012;39:1304–12.
121. Langer AM. Health experience of some US and Canadian workers exposed to asbestos: foundation for risk assessment. In: Nolan RP, Langer AM, Ross M, Wicks FJ, Martin RF, editors. *The health effects of chrysotile, Canadian mineralogist special publication 5.* Ottawa: Mineralogical Association of Canada; 2001. p. 9–20.
122. Larson TC, Antao VC, Bove FJ. Vermiculite worker mortality: estimated effects of occupational exposure to Libby amphibole. *J Occup Environ Med.* 2010;52:555–60.
123. Liddell FD, McDonald AD, McDonald JC. The 1891–1920 birth cohort of Quebec chrysotile miners and millers: development from 1904 and mortality to 1992. *Ann Occup Hyg.* 1997;41:13–36.
124. McDonald AD, Fry JS, Woolley AJ, McDonald JC. Dust exposure and mortality in an American chrysotile asbestos friction products plant. *Br J Ind Med.* 1984;41:151–7.
125. McDonald JC, Harris J, Armstrong B. Mortality in a cohort of vermiculite miners exposed to fibrous amphibole in Libby, Montana. *Occup Environ Med.* 2004;61:363–6.
126. McDonald JC, Liddell FD, Dufresne A, McDonald AD. The 1891–1920 birth cohort of Quebec chrysotile miners and millers: mortality 1976–88. *Br J Ind Med.* 1993;50:1073–81.
127. Meurman LO, Pukkala E, Hakama M. Incidence of cancer among antophyllite asbestos miners in Finland. *Occup Environ Med.* 1994;51:421–5.
128. Mowé G, Gylseth B, Hartveit F, Skaug V. Fiber concentration in lung tissue of patients with malignant mesothelioma: a case-control study. *Cancer.* 1985;56:1089–93.
129. Musk AW, de Klerk NH, Olsen N, et al. Mortality in miners and millers of crocidolite in Western Australia: follow-up to 1999. *Ann Occup Hyg.* 2002;46(Suppl 1):90–2.
130. Musk AW, de Klerk NH, Reid A, et al. Mortality of former crocidolite (blue asbestos) miners and millers at Wittenoom. *Occup Environ Med.* 2008;65:541–3.
131. Newhouse ML, Berry G, Wagner JC. Mortality of factory workers in East London 1933–80. *Br J Ind Med.* 1985;42:4–11.
132. Offermans NS, Vermeulen R, Burdorf A, Goldbohm RA, Kauppinen T, Kromhout H, van den Brandt PA. Occupational asbestos exposure and risk of pleural mesothelioma, lung cancer, and laryngeal cancer in the Prospective Netherlands Cohort Study. *J Occup Environ Med.* 2014;56:6–19.
133. Ohlson CG, Klaesson B, Hogstedt C. Mortality among asbestos-exposed workers in a railroad workshop. *Scand J Work Environ Health.* 1984;10:283–91.
134. Peto J. The hygiene standard for chrysotile asbestos. *Lancet.* 1978;1:484–9.
135. Piolatto G, Negri E, La Vecchia C, Pira E, De Carli A, Peto J. An update on cancer mortality among chrysotile asbestos miners in Balangero, northern Italy. *Br J Ind Med.* 1990;47:810–4.
136. Pira E, Pelucchi C, Piolatto PG, et al. Mortality from cancer and other causes in the Balangero cohort of chrysotile asbestos miners. *Occup Environ Med.* 2009;66:805–9.
137. Pira E, Romano C, Donato F, Pelucchi C, Vecchia C, Boffetta P. Mortality from cancer and other causes among Italian chrysotile asbestos miners. *Occup Environ Med.* 2017;74:558–63.

138. Reid A, Berry G, de Klerk N, Hansen J, Heyworth J, Ambrosini G, Fritschi L, Olsen N, Merler E, Musk AW. Age and sex differences in malignant mesothelioma after residential exposure to blue asbestos (crocidolite). *Chest*. 2007;131:376–82.
139. Reid A, Berry G, Heyworth J, et al. Predicted mortality from malignant mesothelioma among women exposed to blue asbestos at Wittenoom, Western Australia. *Occup Environ Med*. 2009;66:169–74.
140. Reid A, Franklin P, Olsen N, Sleith J, Samuel L, Aboagye-Sarfo P, de Klerk N, Musk AW. Allcause mortality and cancer incidence among adults exposed to blue asbestos during childhood. *Am J Ind Med*. 2013;56:133–45.
141. Reid A, Heyworth J, de Klerk N, Musk AW. The mortality of women exposed environmentally and domestically to blue asbestos at Wittenoom, Western Australia. *Occup Environ Med*. 2008;65:743–9.
142. Reid A, Merler E, Peters S, Jayasinghe N, Bressan V, Franklin P, Brims F, de Klerk NH, Musk AW. Migration and work in postwar Australia: mortality profile comparisons between Australian and Italian workers exposed to blue asbestos at Wittenoom. *Occup Environ Med*. 2018;75:29–36.
143. Rödelsperger K, Jöckel KH, Pohlabeln H, et al. Asbestos and man-made vitreous fibers as risk factors for diffuse malignant mesothelioma: results from a German hospital based case-control study. *Am J Ind Med*. 2001;39:262–75.
144. Seidman H, Selikoff IJ, Gelb SK. Mortality experience of amosite asbestos factory workers: doseresponse relationships 5 to 40 years after onset of short-term work exposure. *Am J Ind Med*. 1986;10:479–514.
145. Seidman H, Selikoff IJ, Hammond EC. Short-term asbestos work exposure and long-term observation. *Ann N Y Acad Sci*. 1979;330:61–89.
146. Świątkowska B, Szeszenia-Dąbrowska N. Mesothelioma continues to increase even 40 years after exposure - evidence from long-term epidemiological observation. *Lung Cancer*. 2017;108:121–5.
147. Albin M, Johanssen L, Pooley FD, et al. Mineral fibres, fibrosis, and asbestos bodies in lung tissue from deceased asbestos cement workers. *Br J Ind Med*. 1990;47:767–74.
148. Gilham C, Rake C, Burdett G, Nicholson AG, Davison L, Franchini A, Carpenter J, Hodgson J, Darnton A, Peto J. Pleural mesothelioma and lung cancer risks in relation to occupational history and asbestos lung burden. *Occup Environ Med*. 2016;73:290–9.
149. Howel D, Gibbs A, Arblaster L, et al. Mineral fibre analysis and routes of exposure to asbestos in the development of mesothelioma in an English region. *Occup Environ Med*. 1999;56:51–8.
150. Johansson LG, Albin MP, Jakobsson KM, Welinder HEC, Ranstam PJ, Attewell RG. Ferruginous bodies and pulmonary fibrosis in dead low to moderately exposed asbestos cement workers: histological examination. *Br J Ind Med*. 1987;44:550–8.
151. McDonald JC, Armstrong B, Case B, et al. Mesothelioma and asbestos fiber type. Evidence from lung tissue analyses. *Cancer*. 1989;63:1544–7.
152. McDonald JC, Armstrong BG, Edwards CW, et al. Casereferent survey of young adults with mesothelioma: I. Lung fibre analyses. *Ann Occup Hyg*. 2001;45:513–8.
153. Rödelsperger K, Weitowitz HJ, Brückel B, et al. Dose-response relationship between amphibole fiber lung burden and mesothelioma. *Cancer Detect Prev*. 1999;23:183–93.
154. Rogers AJ, Leigh J, Berry G, et al. Relationship between lung asbestos fiber type and concentration and relative risk of mesothelioma. A case-control study. *Cancer*. 1991;67:1912–20.
155. Tuomi T, Huuskonen MS, Virtamo M, et al. Relative risk of mesothelioma associated with different levels of exposure to asbestos. *Scand J Work Environ Health*. 1991;17:404–8.
156. Peto J, Doll R, Hermon C, et al. Relationship of mortality to measures of environmental asbestos pollution in an asbestos textile factory. *Ann Occup Hyg*. 1985;29:305–55.
157. Lanphear BP, Buncher CR. Latent period for malignant mesothelioma of occupational origin. *J Occup Med*. 1992;34:718–21.
158. Marinaccio A, Binazzi A, Cauzillo G, Cavone D, Zotti RD, Ferrante P, Gennaro V, Gorini G, Menegozzo M, Mensi C, Merler E, Mirabelli D, Montanaro F, Musti M, Pannelli F, Romanelli A, Scarselli A, Tumino R, Italian Mesothelioma Register (ReNaM) Working Group. Analysis of latency time and its determinants in asbestos related malignant mesothelioma cases of the Italian register. *Eur J Cancer*. 2007;43:2722–8.
159. Barone Adesi F, Ferrante D, Bertolotti M, et al. Long-term mortality from pleural and peritoneal cancer after exposure to asbestos. Possible role of asbestos clearance. *Int J Cancer*. 2008;123:912–6.
160. Ferrante D, Chellini E, Merler E, Pavone V, Silvestri S, Miligi L, Gorini G, Bressan V, Girardi P, Ancona L, Romeo E, Luberto F, Sala O, Scarnato C, Menegozzo S, Oddone E, Tunesi S, Peticaroli P, Pettinari A, Cuccaro F, Mattioli S, Baldassarre A, Barone-Adesi F, Cena T, Legittimo P, Marinaccio A, Mirabelli D, Musti M, Pirastu R, Ranucci A, Magnani C, The Working Group. Italian pool of asbestos workers cohorts: mortality trends of asbestos-related neoplasms after long time since first exposure. *Occup Environ Med*. 2017;74:887–98.
161. Reid A, de Klerk NH, Magnani C, Ferrante D, Berry G, Musk AW, Merler E. Mesothelioma risk after 40 years since first exposure to asbestos: a pooled analysis. *Thorax*. 2014;69:843–50.
162. Goodman JE, Nascarella MA, Valberg PA. Ionizing radiation: a risk factor for mesothelioma. *Cancer Causes Control*. 2009;20:1237–54.

Capitolo 2

AMIANTO E PATOFISIOLOGIA DEL MESOTELIOMA

Nico van Zandwijk e Glen Reid

2.1 Introduzione

Il mesotelioma maligno, o più semplicemente mesotelioma, è una patologia maligna che si origina dal foglietto mesoteliale che ricopre la cavità pleurica, il pericardio e la cavità addominale compresa della tunica vaginale. Cristofer Wagner fu tra i primi a riconoscere una relazione tra l'esposizione all'amianto e mesotelioma (1). Più di mezzo secolo dopo, una corposa letteratura si è accumulata confermando che l'esposizione all'amianto per motivi professionali o ambientali ha un nesso causale con l'insorgenza di questa grave forma di neoplasia. Esposizioni all'eronite, una fibra minerale simile all'amianto, radiazioni ionizzanti e infiammazioni croniche della pleura sono state riconosciute come cause addizionali (2). Nonostante il marcato potenziale cancerogeno delle fibre di amianto, ci vogliono più di 20 anni dalla data della prima esposizione all'amianto alla prima manifestazione della malattia. I periodi di latenza durano dai 20 ai 50 anni, giustificando così il fatto che il mesotelioma è spesso diagnosticato in pazienti in età avanzata (3), e per questo è stato considerato come "una bomba a tempo con una lunga miccia" (4). Il tumore al polmone o all'ovaio (e probabilmente anche tumori in altri organi), la fibrosi polmonare (amiantosi), le placche e le effusioni pleuriche sono patologie maligne e non maligne che si sviluppano in seguito all'esposizione all'amianto (5-8). Sebbene gli studi sul tumore al polmone abbiano rivelato un chiaro sinergismo tra esposizione (professionale) all'amianto e fumo di sigarette (9), il fumo da solo non sembra contribuire da solo allo sviluppo del mesotelioma.

2.2 Storia dell'amianto

La storia dell'utilizzo dell'amianto inizia circa 4.000 anni fa. L'amianto fu inizialmente utilizzato come componente fondamentale nelle ceramiche finlandesi prodotte circa 2.500 anni prima di Cristo, e poi descritto come un materiale (pietra) con proprietà magiche (i.e., ignifuga) dagli antichi scrittori greci e romani (10, 11). Il termine amianto deriva dalla parola greca inestinguibile, e comprende una collezione di minerali (silicati idratati) che si presentano in natura sotto forma di fibre. Le fibre di amianto sono tradizionalmente divise nelle forme serpentine e in quelle anfibole; la forma di queste fibre (la lunghezza e le proporzioni) è ritenuta importante per il processo di carcinogenesi. Infatti, mentre in passato l'attenzione veniva puntata principalmente sulle fibre di amianto lunghe, una recente revisione della letteratura scientifica (in inglese: "review") ha posto l'attenzione sulle fibre corte (12). Le fibre anfibolo sono dritte, rigide e particolarmente resistenti e includono l'amosite (amianto marrone), la crocidolite (amianto blu) l'antofillite, la tremolite e l'actinolite. Gli anfiboli sono stati utilizzati nella produzione del cemento-amianto, nei materiali per l'isolamento, nei rivestimenti e in numerosi altri prodotti. Il crisotilo (amianto bianco) è l'unica forma di amianto serpentino con fibre ricurve e flessibili, idoneo per i materiali per l'edilizia, i prodotti per l'isolamento e i tessuti.

L'impiego dell'amianto aumentò verso la fine del 19° secolo in Europa (Italia e Russia) e in Canada grazie alla meccanizzazione dei processi di estrazione mineraria, e al suo largo utilizzo durante la rivoluzione industriale. L'estrazione per fini commerciali dell'amianto anfibolo incominciò agli inizi del 900 con l'estrazione dell'amosite in Sud Africa e della crocidolite in Australia. Grazie alle sue proprietà ignifughe, l'amianto incominciò ad essere ampiamente utilizzato dopo la seconda guerra mondiale nella produzione di materiali per l'edilizia così come in un'ampia gamma di prodotti per la vita quotidiana (13).

2.3 Esposizione all'amianto per motivi occupazionali

L'associazione tra amianto e fibrosi polmonare fu la prima indicazione che l'esposizione all'amianto per motivi professionali fosse pericolosa. Rapporti sporadici sulla fibrosi indotta dall'amianto iniziarono ad essere pubblicati negli anni attorno al 1920 (14, 15) e contribuirono alla regolamentazione della gestione delle polveri negli spazi di lavoro nel Regno Unito (16). L'insorgenza di neoplasie maligne in seguito ad esposizione all'amianto fu messa in luce 20 anni più tardi dai famosi studi di Sir Richard Doll, che evidenziarono associazioni causali tra esposizione all'amianto e tumore al polmone (17). Dieci anni dopo, seguendo lo stesso schema sperimentale, fu associata l'esposizione all'amianto con il mesotelioma. La pubblicazione di Wagner, il punto di riferimento della letteratura del settore, apparve poco dopo una serie di reports isolati che descrivevano la comparsa del mesotelioma dopo esposizione per motivi professionali all'amianto (18, 19). Il rapido aumento dell'utilizzo dell'amianto nella seconda metà del secolo scorso fu seguito, circa 20 anni dopo, da un marcato aumento dell'incidenza di casi di mesotelioma (20, 21). In questo quadro generale, è importante sottolineare che la messa in atto di misure preventive compresa la regolamentazione dei posti di lavoro e la messa al bando dell'amianto, non diventarono effettive se non agli inizi degli anni '80. Tuttavia, quando queste normative furono introdotte in Europa e in Australia, un aumento dell'utilizzo di amianto fu osservato nella maggior parte delle regioni asiatiche al punto che il 60% della produzione di crisotilo mondiale viene oggi consumato in Asia.

Negli ultimi 50 anni, la relazione tra esposizione all'amianto occupazionale e mesotelioma è stata analizzata in un numero di studi caso-controllo confermando la relazione causale suggerita inizialmente dal dr. Wagner (22-28). Ad esempio, un'indagine condotta di recente in Francia -che ha misurato l'esposizione all'amianto in persone coinvolte nel settore edile, nell'industria navale, nella produzione di cemento-amianto, nelle acciaierie o nella produzione/riparazione di motoveicoli- ha confermato la chiara relazione esistente tra esposizione all'amianto e insorgenza del mesotelioma (29). In aggiunta, questo studio ha fornito dati sulla attribuzione del rischio e una misura del rischio non professionale a cui sono esposte le donne. Il crisotilo rappresenta la principale forma di amianto commercialmente utilizzata in Francia. Per questa ragione i dati non possono essere generalizzati ad altri paesi (inparticolar modo in quelli in via di sviluppo) che hanno un diverso piano industriale e usano diversi tipi di amianto.

2.4 Esposizione Ambientale all'Amianto.

In passato, il mesotelioma era principalmente correlato all'esposizione all'amianto per motivi professionali. Oggi, è riconosciuto che ci sono molteplici cause non professionali di esposizione all'amianto che sono generalmente definite come esposizioni ambientali all'amianto (Figura 2.1) (30).

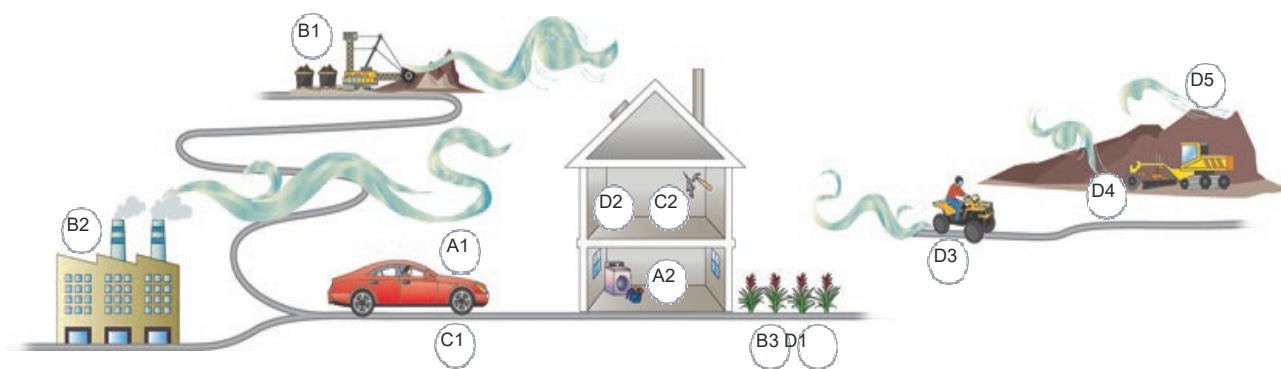


Figura 2.1. Descrizione dei potenziali pathways di esposizione ambientale all'amianto. (a) L'esposizione di tipo para-occupazionale si verifica quando un lavoratore esposto all'amianto agisce come un vettore per il trasporto delle fibre. Il nucleo familiare può essere esposto entrando nel veicolo del lavoratore (a1), o attraverso il contatto con i vestiti del

lavoratore o con dei depositi di polvere tra le mura domestiche (a2). (b) Esposizione ambientale provocata dalle lavorazioni industriali. La contaminazione dell'aria può essere dovuta alle emissioni provenienti dalle operazioni di estrazione delle cave limitrofe alle comunità (b1) o dalle industrie che lavorano l'amianto (b2). Le comunità possono essere anche esposte ai prodotti di scarto della manifatture dell'amianto che sono state usate nella costruzione di strade o che si sono depositati nel terreno (b3). (c) Esposizione ai prodotti commerciali contenenti amianto. L'amianto è presente in numerosi prodotti, inclusi i freni delle automobili (c1), e in diversi materiali abitativi da cui può essere facilmente rimosso durante le fasi di manutenzione e rinnovo degli appartamenti (c2). (d) L'amianto presente in natura (NOA). In diverse parti del mondo, gli esseri umani sono stati esposti all'amianto per via dell'utilizzo a livello locale di materiali contenenti il NOA per la costruzione di strade, per la fertilizzazione dei terreni agricoli (d1), come componente di prodotti per intonacare le case, per stuccare o in altri materiali per l'edilizia (d2). La presenza umana nelle zone contaminate dal NOA può causare rilascio di fibre durante le attività ricreative (d3) o durante la realizzazione di progetti di sviluppo (d4). Il NOA presente nei diversi materiali può anche essere rilasciato mediante la naturale erosione e dal vento (d5). Adottato da C.W. Noonan. Ann. Transl. Med. 5 (11): 234 con il permesso degli autori.

2.4.1 Esposizioni para occupazionali

L'esposizione para occupazionale all'amianto è definita come l'esposizione dei famigliari di persone che hanno lavorato a contatto con l'amianto e che pertanto hanno agito come vettori di fibre di amianto negli ambienti domestici. La principale attività attribuita alla esposizione para occupazionale all'amianto è il lavaggio dei vestiti contaminati da amianto. È interessante sottolineare che l'ammontare di fibre di amianto nel polmone di donne con mesotelioma e con esposizioni para occupazionali sono confrontabili con quelle rinvenute nei polmoni di uomini con mesotelioma con una moderata esposizione occupazionale all'amianto (13). Nelle decadi precedenti, diverse centinaia di casi di mesotelioma sono stati registrati tra i famigliari di coloro che per motivi professionali hanno lavorato con l'amianto nell'industria mineraria, nelle costruzioni navali e nella produzione di cemento (31). Un rapporto impressionante sul problema dell'esposizione para professionale viene dalle miniere di crocidolite nel Wittenoom, nell'ovest dell'Australia dove tra il 1943 e il 1992 sono stati registrati 40 casi di mesotelioma nelle donne che non lavoravano nella estrazione e macinazione dell'amianto (32). Si ipotizza che l'esposizione ambientale (volatile) e i residui dell'estrazione mineraria abbiano contribuito all'insorgenza del mesotelioma in questi casi. Una recente meta analisi sulla relazione tra esposizione para occupazionale e mesotelioma ha riportato una odds ratio di 5,0 (CI, 2,5-10) per le esposizioni domestiche all'amianto (33).

2.4.2 Esposizione ambientale

Le esposizioni industriali all'amianto avvengono tipicamente in prossimità delle zone dove viene lavorato o estratto l'amianto, con dati che suggeriscono una diminuzione del rischio di sviluppare il mesotelioma quanto più ci si allontana dalle aree di attività industriale basata sull'impiego dell'amianto (34-35). Per questo motivo l'ambiente esterno rappresenta una fondamentale sorgente di esposizione all'amianto. Tuttavia, negli anni recenti è apparso evidente che anche l'ambiente casalingo rappresenta un'importante sorgente di rischio. Vivere in una casa con l'isolamento del tetto fatta con materiali granulari sfusi (amosite) aumenta il rischio di sviluppare neoplasie (in particolare il mesotelioma) (36), e la ristrutturazione edilizia di appartamenti ed edifici contaminati dall'amianto sta contribuendo all'epidemia del mesotelioma (37). Le associazioni dei pazienti e gli studi legali coinvolti nelle cause in difesa delle vittime dell'amianto sono stati i primi che hanno fatto emergere il problema del "cambio di faccia del mesotelioma", puntando l'attenzione sulle cause non occupazionali come fattori di rischio per l'insorgenza di questa patologia. Le prime stime delle diagnosi di cancro tra i pompieri di New York che furono massicciamente esposti all'amianto e ad altri carcinogeni dopo gli attacchi al World Trade Center dell'11 Settembre 2001, hanno dimostrato una aumentata incidenza di tumori e una alta prevalenza di condizioni patologiche che si

pensava fossero legate a processi di infiammazione cronica (38). È oggi difficile poter tirare delle conclusioni solo sulla base di queste prime evidenze, in quanto i processi di carcinogenesi del tumore al polmone o del mesotelioma sono valutati in circa 20 anni, pertanto è necessario ancora molto tempo per avere una stima reale delle conseguenze di una così intensa e senza precedenti esposizione a sostanze tossiche e polveri contenente amianto.

I dati contenuti nel registro australiano del mesotelioma confermano che il numero di casi di mesotelioma a seguito di esposizione all'amianto durante i lavori di ristrutturazione edilizia della propria abitazione sono aumentati negli scorsi anni (21), sottolineando l'importanza di una campagna di sensibilizzazione che avvisi le persone di non maneggiare senza protezione materiali contenenti amianto. Il continuo e eccessivo utilizzo dell'amianto nei paesi in via di sviluppo richiederebbe un intervento deciso, anche se è difficile pensare di riuscire a prevenire l'epidemia di mesotelioma che sta avvenendo in questi paesi (39). A questo proposito, va sottolineato che la diagnosi patologica di mesotelioma è notoriamente difficile e spesso richiede l'occhio di un patologo esperto (40, 41). Viste quindi le difficoltà nel fare una corretta diagnosi di mesotelioma, si pensa che nei paesi in via di sviluppo la diagnosi di mesotelioma sia stata sottostimata (39, 42, 43). Questa non corretta stima delle diagnosi di mesotelioma ha contribuito enormemente a diffondere il pensiero secondo cui: "il mesotelioma qua non è un problema", e giustifica, in molti paesi in tutto il mondo, la mancanza di attenzioni per i pericoli (occupazionali e ambientali) derivati dall'esposizione all'amianto,.

2.4.3 *l'Amianto naturale*

Oltre all'esposizione all'amianto per motivi professionali, para-professionali e alle esposizioni ambientali all'amianto e ai suoi minerali derivati, spesso possiamo avere contatti involontari con l'amianto presente naturalmente nelle rocce e nel terreno. Il termine amianto presente in natura (dall'inglese: Naturally Occurring Asbestos, abbreviato con il termine NOA) si riferisce alle fibre minerali di amianto quali componenti naturali di suoli o rocce, che non necessariamente rientrano nelle classiche definizioni di amianto (44). Sono state identificate diverse aree geografiche ricche in depositi naturali di amianto: depositi di tremolite e crisotilo sono stati trovati in diversi villaggi della Grecia, Turchia, Corsica, Cipro e Nuova Caledonia; l'erionite è presente in Cappadocia; la crocidolite si trova comunemente nelle zone rurali del sud ovest della Cina (45-50). In alcune di queste zone il NOA veniva usato nei prodotti per intonacare le case, nello stucco, mentre in altre zone per la pavimentazione stradale. Il tasso di incidenza del mesotelioma tra le persone che vivono in prossimità di questi centri rurali è molto più alta rispetto al tasso di riferimento globale e, come per gli studi sugli impianti della lavorazione dell'amianto, il rischio di mesotelioma è inversamente proporzionale con la distanza dai depositi di amianto. Il rapporto di genere tra uomo e donna è più basso rispetto al rischio di mesotelioma per motivi occupazionali e spesso si avvicina a 1:1 (51). Le nostre conoscenze sul rischio dell'esposizione al NOA è aumentata negli ultimi anni e studi fatti in Nuova Caledonia, Turchia e negli Stati Uniti hanno permesso di mappare le principali fonti di esposizione NOA (strade terreni, prodotti per gli intonaci e stucco) sottolineando che non sempre ciò che è presente in natura è sicuro.

2.5 Il dibattito sul crisotilo

Il 90-95% di tutto l'amianto che viene estratto e utilizzato commercialmente a livello mondiale è rappresentato dal crisotilo (52). Sulla base dei dati storici di utilizzo dell'amianto e dei tassi di mortalità aggiustati per l'età, nel 2007 è stata stabilita una evidente associazione tra aumentata mortalità per mesotelioma e aumentato utilizzo dell'amianto (53). Questo studio mondiale di associazione ha sottolineato il consenso tra tutti gli scienziati che hanno revisionato la letteratura scientifica, e ha stabilito che tutte le forme di amianto sono cancerogene (54). La frase "utilizzo

sicuro dell'amianto crisotilo" sostenuta dalla Associazione del Crisotilo, una lobby canadese di produttori di crisotilo, è stata usata in passato per contrastare la messa al bando di tutte le forme di amianto (55-57). La discussione sulla sicurezza del crisotilo venne alla ribalta nel 1997 in seguito al divieto generale dell'uso dell'amianto in Francia. Ne nacque una controversia con il Canada, chiamando in causa dei danni negli interessi economici e il blocco del libero commercio di un materiale sicuro come il crisotilo. Dopo una serie innumerevole di discussioni, l'organizzazione Mondiale del Commercio ha deciso che il crisotilo era pericoloso e negli anni seguenti, la messa al bando di tutte le forme di amianto divenne un obbligo per tutti quei paesi che volevano entrare nell'Unione Europea. La posizione anti-crisotilo è stata poi adottata anche dalle Nazioni Unite, dall'Agenzia Governativa Americana per la Protezione del Territorio (sebbene non ufficialmente dal governo americano) e dall'Organizzazione Internazionale del Lavoro (WHO, Riduzione delle patologie legate all'amianto 2006). Va ricordato che il supporto canadese all'utilizzo sicuro del crisotilo non era unanime. La Società Canadese per la Lotta al Cancro (2010), l'Associazione dei Medici del Canada (2009), l'Associazione Canadese di Salute Pubblica (2010) si opposero all'esportazione del crisotilo nei paesi in via di sviluppo. Dopo le elezioni provinciali nel Quebec del 2012, il partito vincitore diede seguito alle promesse elettorali di bloccare l'estrazione di amianto e di cancellare il prestito di molti milioni di dollari promesso dal governo canadese per riaprire le miniere chiuse nel 2011. Da quel momento in poi l'Associazione Internazionale del Crisotilo (ICA) fondata e controllata da interessi stranieri per l'amianto, ha continuato a sostenere il concetto del "utilizzo sicuro del crisotilo" nonostante una pletora di evidenze scientifiche dimostrassero il contrario. I direttori dell'ICA rappresentano gli interessi economici dell'amianto in Russia, Kazakistan, Brasile, India, Messico e Zimbabwe e le lobby governative contrarie alla messa al bando dell'amianto (58-59). È verosimile che il motto: "utilizzo sicuro del crisotilo" abbia accompagnato lo sviluppo economico in Asia, contribuendo al drammatico spostamento nei paesi asiatici del consumo mondiale di amianto (60).

La complessità nello stabilire una relazione causale tra esposizione all'amianto (crisotilo) e mesotelioma non deve essere sottovalutata. Il lungo periodo di latenza che intercorre tra la (prima) esposizione e l'insorgenza del tumore (mesotelioma) è un fattore confondente, e i decessi per patologie cardiovascolari o altri tipi di tumore, diversi dal mesotelioma, oscurano parzialmente il nesso causale tra mesotelioma e amianto (61). Inoltre, gli studi osservazionali non sono disegnati per coprire un periodo di tempo di oltre 50 anni, mentre studi con un periodo di follow-up di 10-20 anni non sono in grado di stabilire un reale nesso causale tra esposizione al crisotilo e mesotelioma. L'importanza del monitoraggio in continuo è sottolineato dai dati del registro australiano del mesotelioma che ha rivelato un marcato aumento nel tasso di incidenza specifico per età del mesotelioma in persone con un'età dai 75 anni in su (21). Inoltre, prendendo anche in considerazione la difficoltà di una corretta diagnosi di mesotelioma (62) si riesce a comprendere perché ci siano voluti così tanti anni per confermare l'associazione tra esposizione al crisotilo e mesotelioma (63, 64).

I promotori della sicurezza del crisotilo sostengono che questa forma di amianto sia incapace di dare tossicità perché le fibre di crisotilo vengono frammentate longitudinalmente e molto rapidamente in frammenti più piccoli. Le fibre più corte risultano più facilmente eliminabili dai tessuti polmonari (dimezzamento dell'emi-vita) e per questo sarebbero meno cancerogene (65). Infatti, studi precedenti condotti su modelli animali avevano suggerito una relazione tra le dimensioni delle fibre e il loro potere cancerogeno (ipotesi di Stanton), ritenendo che le fibre più lunghe fossero anche quelle più cancerogene (66). Studi patologici con la conta delle fibre presenti nel tessuto polmonare e la classificazione del tipo di fibre, avevano dimostrato un aumento significativo della presenza di fibre anfibolo (tremolite) nei polmoni delle persone professionalmente esposte al crisotilo (67, 68). Queste fibre di amianto anfibolo più che il crisotilo

erano ritenute la vera causa dell'insorgenza del mesotelioma. Studi simili su autopsie di persone decedute per mesotelioma hanno confermato un'alta quantità di fibre di tipo anfibolo (69). Inoltre, la relazione tra tipo di fibre/quantità di amianto presenti nel polmone è stata confermata dai risultati di uno studio caso-controllo (70). Un'analisi mediante microscopia elettronica ad alta risoluzione su 186 campioni umani di tessuto polmonare e di mesotelioma, ha rivelato che le fibre di amianto lunghe e sottili costituiscono solo 2,3% di tutte le fibre presenti, mentre l'89,4% delle fibre avevano una larghezza $\leq 5 \mu\text{m}$ e il 92,7% avevano una larghezza $\leq 0,25 \mu\text{m}$. Sulla base di questi dati è verosimile ritenere che siano le fibre più corte a dare il maggior contributo alla patogenesi del mesotelioma (71). Nel 2017, si sono resi disponibili i primi dati sulla quantificazione longitudinale intra-pazienti delle fibre di amianto (72). Biopsie sequenziali di 12 pazienti con patologie legate all'amianto sono state raccolte con un intervallo temporale di circa 8 anni (range 4-21 anni). Si è visto che la quantità di fibre presenti sembrava aumentare nel tempo e il crisotilo è stato riconosciuto come la principale fibra presente nei tessuti (66,7%). Se riprendiamo in esame la teoria della "rimozione rapida" del crisotilo dai polmoni, la scoperta dell'alta bio-persistenza delle fibre di crisotilo nei polmoni dei pazienti con patologie legate all'amianto è stata una vera sorpresa. Questo studio ha inoltre rivelato la complessità dell'analisi delle fibre di amianto, aggiungendo una nuova dimensione al dibattito sul crisotilo. Gli studi precedenti che avevano misurato le fibre di amianto nel polmone dei pazienti hanno sempre preso in considerazione la quantità totale di fibre presente come surrogato della potenzialità cancerogena dell'amianto ma hanno potenzialmente trascurato i passaggi più importanti del processo di cancerogenesi del mesotelioma e cioè che questo processo ha inizio a livello della pleura parietale (10).

La potenza delle fibre di amianto anfibolo di indurre il mesotelioma è stata recentemente rivalutata. Mentre i minerali di natura anfibola sembrano avere un maggior legame con il mesotelioma, l'amianto crisotilo sembra avere la stessa potenza degli anfiboli nell'indurre il tumore al polmone (73). L'alta percentuale di tumori al polmone registrata in uno studio prospettico di 37 anni sui minatori cinesi di crisotilo, indipendentemente dal fatto che fossero fumatori o meno, ha fornito un supporto scientifico a questa ipotesi (74).

Infine, è importante sottolineare che molti ricercatori con un pesante conflitto di interessi (a seguito di supporti finanziari dalle industrie dell'amianto) hanno influenzato la serietà del dibattito scientifico sulla pericolosità del crisotilo. Questi scienziati sono oggi responsabili di una delle pagine più nere della storia della ricerca scientifica nelle patologie correlate all'esposizione all'amianto (75).

2.6 Cause del mesotelioma non riconducibili alla esposizione all'amianto

2.6.1 Erionite

Non tutte le forme di mesotelioma sono causate dalla esposizione ai minerali della famiglia dell'amianto. L'esposizione all'erionite, un minerale fibroso, simile all'amianto, della famiglia degli zeoliti (76) e presente in diverse regioni vulcaniche in tutto il mondo, è stata associata all'insorgenza del mesotelioma. Una delle cause principali di elevata incidenza di mesotelioma in Cappadocia, regione della Turchia, è stata l'utilizzo negli intonaci per le case dell'erionite naturale presente in diversi depositi vulcanici della zona (77, 78). Successivi studi sperimentali hanno confermato il potenziale cancerogeno di questo minerale (79). Sfortunatamente è stato registrato anche un aumento di casi di tumore al polmone tra gli abitanti di queste regioni (80); osservazioni simili sono state fatte anche in altre regioni del mondo (81, 82). A seguito dell'alta incidenza di casi di mesotelioma associati all'esposizione all'erionite, sono stati fatti anche studi di predisposizione genetica, in quanto si ritiene che l'epidemia di mesotelioma debba essere messa in relazione sia all'esposizione all'erionite sia alla sua interazione con un preciso background genetico (83, 84).

2.6.2 Radiazioni ionizzanti

Dati ottenuti in una serie di studi descrittivi tipo “case reports” e “case series” e da studi di coorte retrospettivi hanno messo in luce una associazione tra insorgenza del mesotelioma e esposizione alle radiazioni ionizzanti. Il numero totale di individui analizzati per gli studi relativi alle radiazioni ionizzanti è di gran lunga inferiore rispetto al numero di casi analizzati per esposizione all’amianto. Una serie di studi hanno dimostrato un elevato rischio di sviluppare mesotelioma in pazienti con linfoma di Hodgkin, non-Hodgkin, tumori pediatrici e tumori al seno trattati con radioterapia (85-88). Dati confrontabili sono stati ottenuti in pazienti trattati con mezzi di contrasto radioattivi (Torotrasto) e in persone esposte per motivi professionali alle radiazioni degli impianti nucleari (89, 90). Esperimenti con ratti fatti iniettando nel peritoneo diossido di plutonio hanno evidenziato negli animali trattati, rispetto agli animali controllo, un’alta percentuale (30%) di insorgenza di diversi tipi di neoplasie, tra cui anche il mesotelioma (91).

2.6.3 Infiammazione cronica

Dati sporadici sull’insorgenza del mesotelioma in seguito a infiammazione cronica della pleura sono stati registrati fin dagli anni ‘80. L’empiema cronico, la tubercolosi, la diverticolite cronica e le peritoniti croniche (morbo di Crohn) sono alcune tra le patologie infiammatorie che si sospetta possano avere una causa nell’insorgenza del mesotelioma (92-95). Questi rapporti sporadici non autorizzavano altro che delle semplici speculazioni sui pathway del processo di cancerogenesi e dei mediatori dell’infiammazione coinvolti, sebbene la continua sovra produzione di alcune citochine si sospetti possa giocare un ruolo importante nell’eziopatogenesi del mesotelioma (96).

2.6.4 Nanotubi di carbonio

Una varietà di fibre artificiali sono state studiate per il loro potenziale eziopatogenico nel mesotelioma. Una serie di reviews sistematiche sul ruolo delle fibre di vetro hanno concluso che non ci sono al momento sufficienti dati per suggerire un maggior rischio di mesotelioma in seguito ad esposizione alla lana di roccia e alle fibre di vetro (97). I nanotubi di carbonio sono oggi utilizzati in una ampia gamma di prodotti e -come è successo in passato per l’amianto- sono diventati di uso comune; i nanotubi di carbonio sono delle fibre con una lunga bio-persistenza e quindi dotati di un potenziale cancerogeno (98). Come per le fibre di amianto, i nanotubi di carbonio, una volta inalati, tendono ad accumularsi nel polmone e poi migrano nella pleura dove innescano una reazione infiammatoria cronica (99). Nonostante siano ancora oggi scarse le informazioni in letteratura sugli effetti dei nanotubi di carbonio nell’eziopatogenesi del mesotelioma, la tragedia dell’amianto ci ha insegnato a prestare molta attenzione ai rischi sulla salute legati ai manufatti a base di fibre minerali. In altre parole sarebbe opportuno che tutti questi nanomateriali venissero rilasciati nell’ambiente solo dopo aver studiato in modo dettagliato la loro sicurezza (10).

2.6.5 Il Simian Virus SV40

Nel 1996, alcuni ricercatori inglesi ipotizzarono un potenziale ruolo nell’insorgenza del mesotelioma da parte del Simian Virus SV40, un poliomavirus con potenzialità oncogeniche, endemico nelle scimmie rhesus e risultato un contaminante della produzione dei vaccini antipolio negli anni ‘50 (100). Fu ipotizzato che circa 30-100 milioni di persone negli Stati Uniti e molte di più in tutto il mondo, fossero state contaminate dal virus SV40 presente nel vaccino antipolio, così da aumentare il rischio futuro di sviluppare il mesotelioma (101). Inizialmente solo alcuni studi sembravano supportare questa teoria, ma nessuno dei principali studi epidemiologici successivi fu in grado di confermare questa associazione (102-104). E’ opportuno riportare anche i risultati di

alcuni studi sperimentali preclinici *in vivo* che hanno dimostrato come i topi infettati con SV40 o transfettati con l'antigene largo del SV40 (Tag) diventassero più suscettibili al processo di cancerogenesi indotto dall'amianto (105). Inoltre, i topi transgenici che esprimono il Tag nel mesotelio sono particolarmente suscettibili alla cancerogenesi da amianto (106). È interessante notare che questi modelli murini di cancerogenesi non hanno lo stesso profilo mutazionale riportato nei mesoteliomi umani.

2.7 Il processo di cancerogenesi del mesotelioma

Fino a poco tempo fa si è pensato che le cellule del mesotelio rappresentassero i precursori del mesotelioma. Tuttavia, quando le cellule mesoteliali sono danneggiate, le cellule staminali del sub-mesotelio (multipotenti) contribuiscono alla sua riparazione/rigenerazione (10, 107, 108). Per questo motivo non è ancora chiaro se le cellule progenitrici del mesotelioma derivino dal compartimento delle cellule sub-mesoteliali (multipotenti), oppure dalle cellule differenziate del mesotelio, o da entrambi (10). Un altro punto che merita di essere preso in considerazione è l'ipotesi che il mesotelioma si origini inizialmente nella pleura parietale e solo successivamente coinvolga la pleura viscerale. E' verosimile che le fibre di amianto inneschino un processo cancerogeno accumulandosi in prossimità della pleura parietale, ma poiché gli studi patologici si sono principalmente concentrati sulle fibre di amianto accumulate nel parenchima polmonare, la nostra comprensione del processo di cancerogenesi del mesotelioma non è ancora ben chiara.

Mettendo insieme sia le evidenze cliniche che quelle sperimentali, sembra che le fibre di amianto inalate si accumulino inizialmente nella pleura, inducano quindi una infiammazione cronica che porta ad una "fagocitosi frustrata", a cui fanno seguito tutta una serie di cambiamenti genetici ed epigenetici a carico del mesotelio (109, 110). Altri fattori che si ritiene possano essere potenzialmente coinvolti nel processo di cancerogenesi sono: i) i cambiamenti nei sistemi di trasduzione del segnale indotto dalle fibre (111). ii) la generazione di radicali liberi catalizzati dal ferro (112). iii) il rilascio di sostanze "allarmanti" come HMGB1 (113).

Studi citogenetici hanno dimostrato che il mesotelioma è una patologia causata dalla perdita di funzione nei geni ad attività anti-oncogenica piuttosto che essere causato da mutazioni a carico di oncogeni. Studi più recenti utilizzando tecniche di sequenziamento massivo del DNA, note con il termine inglese di Next Generation Sequencing (abbreviato con l'acronimo: NGS) hanno rafforzato questa ipotesi (114-116). I geni che codificano per l'inibitore 2A della chinasi ciclino dipendenti (*CDKN2A*), per la neurofibromatosi di tipo 2 (*NF2*) e il gene che codifica per la proteina associata al gene BRCA1 (*BAP1*) sono i geni ad attività onco-soppressiva che risultano più frequentemente mutati nei pazienti affetti da mesotelioma (114). Delezioni a carico del gene *CDKN2A* sono state riscontrate in circa il 70% dei casi; mutazioni inattivanti nel gene *NF2* in circa 35%-40% dei casi e alterazioni del gene *BAP1* sono state riportate in oltre il 60% dei casi di mesotelioma. In modelli sperimentali murini, è stato dimostrato che delezioni a carico di *NF2*, *CDKN2A* e *BAP1* possono avere un ruolo nello sviluppo del mesotelioma (117-120). E' oggi plausibile ritenere che in alcune persone possa esistere una base genetica di predisposizione alla cancerogenesi da amianto (121-123). I portatori della mutazione germinale nel gene *BAP1* hanno un'alta incidenza di questa neoplasia rispetto ai famigliari che non hanno questa mutazione. Mutazioni nel gene *BAP1* sono meno frequenti nei pazienti con forme sporadiche di mesotelioma, per questo si spera che ulteriori approfondimenti sul nesso tra gene-mesotelioma possano mettere in luce altri fattori genetici di suscettibilità (124). Studi funzionali hanno messo in luce come sia oggi possibile modulare alcune proteine ancillari del gene *BAP1* o di altri geni che sono "up-stream" o "down-stream" alla funzione di *BAP1*. Ad esempio modulare l'iper-espressione di *EZH2* nelle cellule tumorali prive della funzionalità di *BAP1*, rappresenta un possibile approccio terapeutico, oggi in fase di sperimentazione clinica (126).

Oltre alla perdita di funzione di geni oncosoppressori, i dati ottenuti in questi anni con la tecnologia array hanno permesso di: i) dimostrare differenze nel profilo di espressione genica tra le cellule del mesotelioma e quelle del mesotelio (127); ii) definire una firma prognostica (128); iii) identificare potenziali targets terapeutici (129); iv) definire i diversi sottogruppi molecolari (130). Molte di queste differenze causano una alterazione nei processi di crescita cellulare grazie alla up-regolazione di geni coinvolti nel metabolismo cellulare (131), nella regolazione del ciclo cellulare e della mitosi (129), nei sistemi di comunicazione intracellulare (127) e infine nel processo di transizione da cellula epiteliale a mesenchimale (130). Questi dati trascrittomici sono stati anche ulteriormente confermati con le più recenti tecniche di NGS (114, 132). Secondo lo stesso criterio con cui sono stati analizzati i cambiamenti nei profili trascrizionali tra cellule neoplastiche e cellule del mesotelio, sono stati studiati, sia in modelli *in vitro* che *in vivo*, anche i cambiamenti nei profili trascrizionali tra cellule del mesotelio e quelle del parenchima polmonare dopo esposizione all'amianto (133-137). I cambiamenti trascrizionali indotti dall'esposizione all'amianto comprendono alterazioni nei sistemi di trasduzione del segnale a livello intracellulare, apoptosi, risposta all'infiammazione e fibrinogenesi. Tuttavia, il contributo specifico di ognuna di queste alterazioni nell'eziopatogenesi del mesotelioma deve ancora essere completamente chiarito.

Di recente la ricerca di fattori molecolari implicati nel processo di cancerogenesi del mesotelioma si è concentrata sulla famiglia delle molecole di RNA non codificanti, ed in particolar modo i microRNA (abbreviati con l'acronimo: miRNA) sono quelli maggiormente studiati e caratterizzati. Queste piccole molecole di RNA (21-23 nucleotidi di lunghezza) agiscono come dei repressori post-trascrizionali dell'mRNA e poiché sono poco espressi nelle cellule tumorali causano una iperattivazione dei geni che controllano la crescita cellulare (138). Molti dati molecolari suggeriscono un ruolo causale dei miRNA nel processo di cancerogenesi del mesotelioma e nella sua biologia (139).

Se confrontiamo i dati che gli effetti dell'esposizione all'amianto hanno sulla trascrizione dei geni codificanti, ci accorgiamo che le informazioni oggi disponibili sulle alterazioni nella espressione dei miRNA indotte dall'amianto sono ancora scarse. Sebbene altri studi di espressione genica, condotti sia in modelli di cellule mesoteliali che in modelli murini esposti all'amianto, siano oggi necessari per chiarire il ruolo dei miRNA nel processo di cancerogenesi del mesotelioma, diversi dati suggeriscono un loro ruolo nelle fasi iniziali della malattia. Per esempio il silenziamento genico della famiglia dei *miR-34*, noti miRNA ad attività oncosoppressiva, favorisce l'acquisizione di caratteristiche maligne delle cellule del mesotelio (140); topi geneticamente modificati per avere perdita di eterozigosi (dall'inglese: Loss Of Heterozygosity, LOH) nel locus genico di *Nf2* e *Cdkn2a* sviluppano tumori aggressivi con una ridotta espressione della proteina p53 e del *miR-34a* (141). Inoltre, gli effetti pro infiammatori delle fibre di amianto sono associati ad un alterato profilo di metilazione del genoma delle cellule di mesotelioma (142, 143), mentre il silenziamento epigenetico è stato visto abbassare i livelli di espressione dei *miR-34b/c* (144), *miR-145* (145) e *miR-126* (146). Altri meccanismi sono ritenuti responsabili della ridotta espressione dei miRNA: il *miR-131* è spesso co-deleto insieme al locus genico di CDKN2A (147), mentre il dosaggio genico influenza l'espressione del *miR-137* (148). Un dato interessante è che mentre nelle cellule di mesotelioma il *miR-137* ha le caratteristiche di un gene ad attività onco soppressiva, i suoi livelli di espressione sono più alti nei pazienti che hanno una breve sopravvivenza, suggerendo quindi un ruolo diverso a seconda delle diverse fasi della progressione tumorale (148, 149).

Evidenze sperimentali suggeriscono che cambiamenti nell'espressione dei miRNA contribuiscono all'acquisizione delle caratteristiche di aumentata capacità migratoria e di invasività, tipica delle cellule del mesotelioma. Un aumento nei livelli di espressione del *miR-29c-3p* (150), *miR-31* (147), *miR-34b/c* (144), *miR-137* (148) e *miR-145* (145) inibisce la capacità di invasione. Cambiamenti nei livelli di espressione del *miR-205* favoriscono la transizione da cellula epiteliale a cellula

mesenchimale; il *miR-205* risulta meno espresso nei tumori con sottotipo non epitelioide e nelle linee cellulari (151). Altri miRNA, compresi i membri della famiglia del *miR-15* (152), e del *miR-34* (144), il *miR-193a-3p* (153) e il *miR-302b* (154) sono noti regolatori del ciclo cellulare e dei geni della apoptosi e della proliferazione. Tuttavia, mentre la lista dei miRNA con attività di oncosoppressori nel mesotelioma continua a crescere, solo una manciata di miRNA ha dimostrato *in vivo* una valenza terapeutica nell'inibire la crescita tumorale (139). Tra questi, il *miR-16* è quello che ha avuto un promettente sviluppo clinico. Nei tumori di pazienti con mesotelioma e in diversi modelli cellulari l'espressione di questo miRNA risulta più bassa. Dati ottenuti in modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che la sua ri-espressione mediante transfezione con un miRNA analogo, di natura sintetica, è in grado di inibire la crescita tumorale (152); questi risultati hanno supportato lo sviluppo di un trial clinico di fase I che si spera possa portare dei risultati promettenti (155). Il contributo dei membri della famiglia del *miR-16* alla resistenza (152), all'espressione di PD-L1 (156) e della mesotelina (157) suggerisce che i miRNA possono giocare un ruolo importante nello sviluppo e nella pianificazione di nuovi approcci terapeutici

2.8 Conclusioni

La relazione tra sviluppo del mesotelioma e esposizione professionale, -o meno- all'amianto è ormai ben consolidata. Negli studi sulle esposizioni di tipo professionale il numero di uomini con diagnosi di mesotelioma è decisamente più alto di quello registrato nelle donne. Tuttavia questa differenza di genere sembra annullarsi quando vengono presi in esame le esposizioni all'amianto di tipo non professionale. Negli ultimi anni è stato anche meglio precisato il ruolo dell'amianto naturale e anche i rischi associati all'esposizione alle radiazioni ionizzanti. Una attenzione particolare deve essere rivolta all'utilizzo di materiali fatti con i nanotubi in carbonio, che sembrano avere caratteristiche strutturali simili all'amianto. Nonostante sia ormai accettato da parte delle principali organizzazioni mondiali che si occupano di salute pubblica che dopo oltre 40 anni di evidenze, tutte le forme di amianto sono cancerogene, i produttori mondiali di amianto continuano la loro opera di "lobby" al motto di: "utilizzo sicuro della crisotilo". Questa lobby, che richiama molto la lobby del tabacco, sta oggi contribuendo in modo massiccio alla contaminazione ambientale da amianto nei paesi in via di sviluppo e la creazione un domani di nuovi problemi di salute pubblica.

La rivelazione che alcuni ricercatori esperti nel campo dell'amianto abbiano partecipato al dibattito inerente la "sicurezza del crisotilo" pagati (direttamente o indirettamente) dalle industrie dell'amianto, costituisce una delle pagine più nere della storia della ricerca sulle patologie correlate all'amianto e sottolinea il ruolo cruciale che ha la dichiarazione dei propri conflitti di interessi.

Numerosi progressi sono stati fatti nella comprensione della biologia del mesotelioma e sui cambiamenti molecolari che si succedono nelle cellule di mesotelioma. In generale, il numero dei geni che risultano frequentemente mutati nei pazienti con mesotelioma è molto basso, e i geni ad attività onco soppressiva sono quelli che risultano più frequentemente mutati.

E' molto probabile il coinvolgimento delle mutazioni a carico del gene *BAP1* nelle forme famigliari di mesotelioma. Mutazioni in *BAP1* sono state rinvenute anche nelle forme sporadiche di mesotelioma, e studi aggiuntivi possono provare nuovi approcci per il trattamento di questi tumori che hanno una perdita di *BAP1* o in altri geni oncosoppressori. Allo stesso modo, i miRNA sono stati visti deregolati nel mesotelioma e il loro ruolo nel processo di carcinogenesi e di progressione tumorale sta diventando sempre più evidente. La continua caratterizzazione della biologia del mesotelioma è essenziale per identificare nuove strategie preventive e nuove strategie terapeutiche e dare speranza ai pazienti colpiti da questo devastante tumore, provocato dall'uomo.

Ringraziamenti e Conflitto di Interessi

Il prof. Nico van Zandwijk esprime il suo ringraziamento per il supporto alla scrittura di questo capitolo al distretto sanitario locale di Sidney. Il Professore associato Glen Reid, mentre scriveva questo capitolo, ha cambiato la propria affiliazione, dall'Università di Sidney a quella di Otago. Entrambi gli autori dichiarano di non aver alcuno conflitto di interessi

Referenze

1. Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med.* 1960;17:260–71.
2. Attanoos RL, Churg A, Galateau-Salle F, Gibbs AR, Roggli VL. Malignant mesothelioma and its non-Asbestos causes. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(6):753–60.
3. Bianchi C, Giarelli L, Grandi G, Brolo A, Ramani L, Zuch C. Latency periods in asbestos-related mesothelioma of the pleura. *Eur J Cancer Prev.* 1997;6(2):162–6.
4. Linton A, Vardy J, Clarke S, van Zandwijk N. The ticking time-bomb of asbestos: its insidious role in the development of malignant mesothelioma. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;84(2):200–12.
5. Ferrante D, Mirabelli D, Tunesi S, Terracini B, Magnani C. Pleural mesothelioma and asbestos exposure: a case-control study with quantitative risk assessment-response to Marsh and Benson's letter. *Occup Environ Med.* 2017;74(2):157–8.
6. Pira E, Romano C, Violante FS, Farioli A, Spatari G, La Vecchia C, et al. Updated mortality study of a cohort of asbestos textile workers. *Cancer Med.* 2016;5(9):2623–8.
7. Ndlovu N, Rees D, Murray J, Vorajee N, Richards G, teWaterNaude J. Asbestos-related diseases in mineworkers: a clinicopathological study. *ERJ Open Res.* 2017;3(3):00022-2017.
8. Pairon JC, Andujar P, Rinaldo M, Ameille J, Brochard P, Chamming's S, et al. Asbestos exposure, pleural plaques, and the risk of death from lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190(12):1413–20.
9. Ngamwong Y, Tangamornsuksan W, Lohitnavy O, Chaiyakunapruk N, Scholfield CN, Reisfeld B, et al. Additive synergism between asbestos and smoking in lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015;10(8):e0135798.
10. Roe OD, Stella GM. Malignant pleural mesothelioma: history, controversy and future of a manmade epidemic. *Eur Respir Rev.* 2015;24(135):115–31.
11. Pira E, Donato F, Maida L, Discalzi G. Exposure to asbestos: past, present and future. *J Thorac Dis.* 2018;10(Suppl 2):S237–S45.
12. Boulanger G, Andujar P, Pairon JC, Billon-Galland MA, Dion C, Dumortier P, et al. Quantification of short and long asbestos fibers to assess asbestos exposure: a review of fiber size toxicity. *Environ Health.* 2014;13:59.
13. Roggli VL, Sharma A, Butnor KJ, Sporn T, Vollmer RT. Malignant mesothelioma and occupational exposure to asbestos: a clinicopathological correlation of 1445 cases. *Ultrastruct Pathol.* 2002;26(2):55–65.
14. Cooke WE. Fibrosis of the lungs due to the inhalation of asbestos dust. *Br Med J.* 1924;2(3317):140–2, 147.
15. Cooke WE. Pulmonary asbestosis. *Br Med J.* 1927;2(3491):1024–5.
16. Gloyne SR, Merewether ER. Asbestos. In: *Occupation and health: encyclopedia of hygiene, pathology, and social welfare.* Geneva: International Labour Office; 1938. p. S1–15.
17. Doll R. Mortality from lung cancer in asbestos workers. *Br J Ind Med.* 1955;12(2):81–6.
18. Van Der Schoot HC. (Asbestosis & pleural tumors). *Ned Tijdschr Geneesk.* 1958;102(23):1125–6.
19. Weiss A. (Cancer of pleura in pulmonary asbestosis determined morphologically in vivo). *Medizinische.* 1953;6(3):93–4.
20. Lehnert M, Kraywinkel K, Heinze E, Wiethage T, Johnen G, Fiebig J, et al. Incidence of malignant mesothelioma in Germany 2009-2013. *Cancer Causes Control.* 2017;28(2):97–105.
21. Soeberg MJ, Leigh J, van Zandwijk N. Malignant mesothelioma in Australia 2015: current incidence and asbestos exposure trends. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2016;19(5–6):173–89.
22. Agudo A, Gonzalez CA, Bleda MJ, Ramirez J, Hernandez S, Lopez F, et al. Occupation and risk of malignant pleural mesothelioma: a case-control study in Spain. *Am J Ind Med.* 2000;37(2):159–68.
23. Aguilar-Madrid G, Robles-Perez E, Juarez-Perez CA, Alvarado-Cabrero I, Rico-Mendez FG, Javier KG. Case-control study of pleural mesothelioma in workers with social security in Mexico. *Am J Ind Med.* 2010;53(3):241–51.
24. Howel D, Arblaster L, Swinburne L, Schweiger M, Renvoize E, Hatton P. Routes of asbestos exposure and the development of mesothelioma in an English region. *Occup Environ Med.* 1997;54(6):403–9.
25. Iwatsubo Y, Pairon JC, Boutin C, Menard O, Massin N, Caillaud D, et al. Pleural mesothelioma: dose-response relation at low levels of asbestos exposure in a French population-based case-control study. *Am J Epidemiol.* 1998;148(2):133–42.
26. Rees D, Goodman K, Fourie E, Chapman R, Blignaut C, Bachmann MO, et al. Asbestos exposure and mesothelioma in South Africa. *S Afr Med J.* 1999;89(6):627–34.

27. Rodelsperger K, Jockel KH, Pohlabeln H, Romer W, Voitowitz HJ. Asbestos and man-made vitreous fibers as risk factors for diffuse malignant mesothelioma: results from a German hospital-based case-control study. *Am J Ind Med.* 2001;39(3):262–75.
28. Pintos J, Parent ME, Case BW, Rousseau MC, Siemiatycki J. Risk of mesothelioma and occupational exposure to asbestos and man-made vitreous fibers: evidence from two case-control studies in Montreal, Canada. *J Occup Environ Med.* 2009;51(10):1177–84.
29. Lacourt A, Gramond C, Rolland P, Ducamp S, Audignon S, Astoul P, et al. Occupational and non-occupational attributable risk of asbestos exposure for malignant pleural mesothelioma. *Thorax.* 2014;69(6):532–9.
30. Noonan CW. Environmental asbestos exposure and risk of mesothelioma. *Ann Transl Med.* 2017;5(11):234.
31. Donovan EP, Donovan BL, McKinley MA, Cowan DM, Paustenbach DJ. Evaluation of take home (para-occupational) exposure to asbestos and disease: a review of the literature. *Crit Rev Toxicol.* 2012;42(9):703–31.
32. Reid A, Berry G, Heyworth J, de Klerk NH, Musk AW. Predicted mortality from malignant mesothelioma among women exposed to blue asbestos at Wittenoom, Western Australia. *Occup Environ Med.* 2009;66(3):169–74.
33. Goswami E, Craven V, Dahlstrom DL, Alexander D, Mowat F. Domestic asbestos exposure: a review of epidemiologic and exposure data. *Int J Environ Res Public Health.* 2013;10(11):5629–70.
34. Tarres J, Alberti C, Martinez-Artes X, Abos-Herrandiz R, Rosell-Murphy M, Garcia-Allas I, et al. Pleural mesothelioma in relation to meteorological conditions and residential distance from an industrial source of asbestos. *Occup Environ Med.* 2013;70(8):588–90.
35. Kurumatani N, Kumagai S. Mapping the risk of mesothelioma due to neighborhood asbestos exposure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178(6):624–9.
36. Korda RJ, Clements MS, Armstrong BK, Law HD, Guiver T, Anderson PR, et al. Risk of cancer associated with residential exposure to asbestos insulation: a whole-population cohort study. *Lancet Public Health.* 2017;2(11):e522–e8.
37. Olsen NJ, Franklin PJ, Reid A, de Klerk NH, Threlfall TJ, Shilkin K, et al. Increasing incidence of malignant mesothelioma after exposure to asbestos during home maintenance and renovation. *Med J Aust.* 2011;195(5):271–4.
38. Zeig-Owens R, Webber MP, Hall CB, Schwartz T, Jaber N, Weakley J, et al. Early assessment of cancer outcomes in New York City firefighters after the 9/11 attacks: an observational cohort study. *Lancet.* 2011;378(9794):898–905.
39. Bianchi C, Bianchi T. Global mesothelioma epidemic: trend and features. *Indian J Occup Environ Med.* 2014;18(2):82–8.
40. Henderson DW, Reid G, Kao SC, van Zandwijk N, Klebe S. Challenges and controversies in the diagnosis of mesothelioma: part 1. Cytology-only diagnosis, biopsies, immunohistochemistry, discrimination between mesothelioma and reactive mesothelial hyperplasia, and biomarkers. *J Clin Pathol.* 2013;66(10):847–53.
41. Henderson DW, Reid G, Kao SC, van Zandwijk N, Klebe S. Challenges and controversies in the diagnosis of malignant mesothelioma: part 2. Malignant mesothelioma subtypes, pleural synovial sarcoma, molecular and prognostic aspects of mesothelioma, BAP1, aquaporin-1 and microRNA. *J Clin Pathol.* 2013;66(10):854–61.
42. Soeberg MJ, Luong MA, Tran VT, Tran AT, Nguyen TT, Bui D, et al. Estimating the incidence of malignant mesothelioma in Vietnam: a pilot descriptive cancer registration study. *Int J Occup Environ Health.* 2016;22(2):167–72.
43. Park EK, Takahashi K, Hoshuyama T, Cheng TJ, Delgermaa V, Le GV, et al. Global magnitude of reported and unreported mesothelioma. *Environ Health Perspect.* 2011;119(4):514–8.
44. Harper M. 10th Anniversary critical review: naturally occurring asbestos. *J Environ Monit.* 2008;10(12):1394–408.
45. Bayram M, Bakan ND. Environmental exposure to asbestos: from geology to mesothelioma. *Curr Opin Pulm Med.* 2014;20(3):301–7.
46. Constantopoulos SH. Environmental mesothelioma associated with tremolite asbestos: lessons from the experiences of Turkey, Greece, Corsica, New Caledonia and Cyprus. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2008;52(1 Suppl):S110–5.
47. McConnochie K, Simonato L, Mavrides P, Christofides P, Mitha R, Griffiths DM, et al. Mesothelioma in cyprus. *IARC Sci Publ.* 1989;90:411–9.
48. Luce D, Brochard P, Quenel P, Salomon-Nekiriai C, Goldberg P, Billon-Galland MA, et al. Malignant pleural mesothelioma associated with exposure to tremolite. *Lancet.* 1994;344(8939–8940):1777.
49. Luo S, Liu X, Mu S, Tsai SP, Wen CP. Asbestos related diseases from environmental exposure to crocidolite in Da-yao, China. I. Review of exposure and epidemiological data. *Occup Environ Med.* 2003;60(1):35–41; discussion-2.
50. Baumann F, Maurizot P, Mangeas M, Ambrosi JP, Douwes J, Robineau B. Pleural mesothelioma in New Caledonia: associations with environmental risk factors. *Environ Health Perspect.* 2011;119(5):695–700.
51. Baumann F, Buck BJ, Metcalf RV, McLaurin BT, Merkler DJ, Carbone M. The presence of asbestos in the natural environment is likely related to mesothelioma in young individuals and women from Southern Nevada. *J Thorac Oncol.* 2015;10(5):731–7.

52. Frank AL, Joshi TK. The global spread of asbestos. *Ann Glob Health*. 2014;80(4):257–62.
53. Lin RT, Takahashi K, Karjalainen A, Hoshuyama T, Wilson D, Kameda T, et al. Ecological association between asbestos-related diseases and historical asbestos consumption: an international analysis. *Lancet*. 2007;369(9564):844–9.
54. Allen TC, Cagle PT, Churg AM, Colby TV, Gibbs AR, Hammar SP, et al. Localized malignant mesothelioma. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(7):866–73.
55. Kazan-Allen L. The debate on banning asbestos. *CMAJ*. 2001;165(9):1189; author reply 91-3.
56. Kazan-Allen L. Asbestos poisons World Trade Organization atmosphere. *Int J Health Serv*. 2001;31(3):481–93.
57. Greenberg M. The defence of chrysotile, 1912-2007. *Int J Occup Environ Health*. 2008;14(1):57–66.
58. Ruff K. How Canada changed from exporting asbestos to banning asbestos: the challenges that had to be overcome. *Int J Environ Res Public Health*. 2017;14(10):E1135.
59. Ruff K. How Canada's asbestos industry was defeated in Quebec. *New Solut*. 2017;26(4):543–56.
60. Courtice MN, Lin S, Wang X. An updated review on asbestos and related diseases in China. *Int J Occup Environ Health*. 2012;18(3):247–53.
61. Andersen PK, Geskus RB, de Witte T, Putter H. Competing risks in epidemiology: possibilities and pitfalls. *Int J Epidemiol*. 2012;41(3):861–70.
62. Guo Z, Carbone M, Zhang X, Su D, Sun W, Lou J, et al. Improving the accuracy of mesothelioma diagnosis in China. *J Thorac Oncol*. 2017;12(4):714–23.
63. Jiang Z, Chen T, Chen J, Ying S, Gao Z, He X, et al. Hand-spinning chrysotile exposure and risk of malignant mesothelioma: a case-control study in Southeastern China. *Int J Cancer*. 2018;142(3):514–23.
64. Gao Z, Hiroshima K, Wu X, Zhang J, Shao D, Shao H, et al. Asbestos textile production linked to malignant peritoneal and pleural mesothelioma in women: analysis of 28 cases in Southeast China. *Am J Ind Med*. 2015;58(10):1040–9.
65. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(5 Pt 1):1666–80.
66. Harington JS. Fiber carcinogenesis: epidemiologic observations and the Stanton hypothesis. *J Natl Cancer Inst*. 1981;67(5):977–89.
67. Gaudichet A, Sebastien P, Clark NJ, Pooley FD. Identification and quantification of asbestos fibres in human tissues. *IARC Sci Publ*. 1980;30:61–8.
68. Rowlands N, Gibbs GW, McDonald AD. Asbestos fibres in the lungs of chrysotile miners and millers—a preliminary report. *Ann Occup Hyg*. 1982;26(1–4):411–5.
69. Rogers AJ, Leigh J, Berry G, Ferguson DA, Mulder HB, Ackad M. Relationship between lung asbestos fiber type and concentration and relative risk of mesothelioma. A case-control study. *Cancer*. 1991;67(7):1912–20.
70. Dufresne A, Harrigan M, Masse S, Begin R. Fibers in lung tissues of mesothelioma cases among miners and millers of the township of Asbestos, Quebec. *Am J Ind Med*. 1995;27(4):581–92.
71. Suzuki Y, Yuen SR, Ashley R. Short, thin asbestos fibers contribute to the development of human malignant mesothelioma: pathological evidence. *Int J Hyg Environ Health*. 2005;208(3):201–10.
72. Feder IS, Tischoff I, Theile A, Schmitz I, Merget R, Tannapfel A. The asbestos fibre burden in human lungs: new insights into the chrysotile debate. *Eur Respir J*. 2017;49(6):1602534.
73. Berman DW, Crump KS. Update of potency factors for asbestos-related lung cancer and mesothelioma. *Crit Rev Toxicol*. 2008;38(Suppl 1):1–47.
74. Wang X, Yano E, Qiu H, Yu I, Courtice MN, Tse LA, et al. A 37-year observation of mortality in Chinese chrysotile asbestos workers. *Thorax*. 2012;67(2):106–10.
75. Pezerat H. Chrysotile biopersistence: the misuse of biased studies. *Int J Occup Environ Health*. 2009;15(1):102–6.
76. Dogan AU, Dogan M, Hoskins JA. Erionite series minerals: mineralogical and carcinogenic properties. *Environ Geochem Health*. 2008;30(4):367–81.
77. Baris YI, Sahin AA, Ozesmi M, Kerse I, Ozen E, Kolacan B, et al. Outbreak of pleural mesothelioma and chronic fibrosing pleurisy in village of Karain-Urgup in Anatolia. *Thorax*. 1978;33(2):181–92.
78. Baris YI, Grandjean P. Prospective study of mesothelioma mortality in Turkish villages with exposure to fibrous zeolite. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(6):414–7.
79. Wagner JC, Skidmore JW, Hill RJ, Griffiths DM. Erionite exposure and mesotheliomas in rats. *Br J Cancer*. 1985;51(5):727–30.
80. Baris B, Demir AU, Shehu V, Karakoca Y, Kisacik G, Baris YI. Environmental fibrous zeolite (erionite) exposure and malignant tumors other than mesothelioma. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1996;15(2–4):183–9.
81. Ortega-Guerrero MA, Carrasco-Nunez G, Barragan-Campos H, Ortega MR. High incidence of lung cancer and malignant mesothelioma linked to erionite fibre exposure in a rural community in Central Mexico. *Occup Environ Med*. 2015;72(3):216–8.
82. Carbone M, Baris YI, Bertino P, Brass B, Comertpay S, Dogan AU, et al. Erionite exposure in North Dakota and Turkish villages with mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(33):13618–23.
83. Roushdy-Hammady I, Siegel J, Emri S, Testa JR, Carbone M. Genetic-susceptibility factor and malignant mesothelioma in the Cappadocian region of Turkey. *Lancet*. 2001;357(9254):444–5.

84. Dogan AU, Baris YI, Dogan M, Emri S, Steele I, Elmishad AG, et al. Genetic predisposition to fiber carcinogenesis causes a mesothelioma epidemic in Turkey. *Cancer Res.* 2006;66(10):5063–8.
85. De Bruin ML, Burgers JA, Baas P, van 't Veer MB, Noordijk EM, Louwman MW, et al. Malignant mesothelioma after radiation treatment for Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2009;113(16):3679–81.
86. Travis LB, Fossa SD, Schonfeld SJ, McMaster ML, Lynch CF, Storm H, et al. Second cancers among 40,576 testicular cancer patients: focus on long-term survivors. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(18):1354–65.
87. Peterson JT Jr, Greenberg SD, Buffler PA. Non-asbestos-related malignant mesothelioma. A review. *Cancer.* 1984;54(5):951–60.
88. Farioli A, Ottone M, Morganti AG, Compagnone G, Romani F, Cammelli S, et al. Radiation-induced mesothelioma among long-term solid cancer survivors: a longitudinal analysis of SEER database. *Cancer Med.* 2016;5(5):950–9.
89. Stey C, Landolt-Weber U, Vetter W, Sauter C, Marincek B. Malignant peritoneal mesothelioma after Thorotrast exposure. *Am J Clin Oncol.* 1995;18(4):313–7.
90. Goodman JE, Nascarella MA, Valberg PA. Ionizing radiation: a risk factor for mesothelioma. *Cancer Causes Control.* 2009;20(8):1237–54.
91. Sanders CL, Jackson TA. Induction of mesotheliomas and sarcomas from “hot spots” of ²³⁹PuO₂ activity. *Health Phys.* 1972;22(6):755–9.
92. Hillerdal G, Berg J. Malignant mesothelioma secondary to chronic inflammation and old scars. Two new cases and review of the literature. *Cancer.* 1985;55(9):1968–72.
93. Roviario GC, Sartori F, Calabro F, Varoli F. The association of pleural mesothelioma and tuberculosis. *Am Rev Respir Dis.* 1982;126(3):569–71.
94. Riddell RH, Goodman MJ, Moossa AR. Peritoneal malignant mesothelioma in a patient with recurrent peritonitis. *Cancer.* 1981;48(1):134–9.
95. Butnor KJ, Pavlisko EN, Sporn TA, Roggli VL. Malignant peritoneal mesothelioma and Crohndisease. *J Clin Pathol.* 2017;70(3):228–32.
96. Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014;2014:149185.
97. Boffetta P, Donaldson K, Moolgavkar S, Mandel JS. A systematic review of occupational exposure to synthetic vitreous fibers and mesothelioma. *Crit Rev Toxicol.* 2014;44(5):436–49.
98. Moller P, Jacobsen NR. Weight of evidence analysis for assessing the genotoxic potential of carbon nanotubes. *Crit Rev Toxicol.* 2017;47(10):867–84.
99. Ryman-Rasmussen JP, Cesta MF, Brody AR, Shipley-Phillips JK, Everitt JI, Tewksbury EW, et al. Inhaled carbon nanotubes reach the subpleural tissue in mice. *Nat Nanotechnol.* 2009;4(11):747–51.
100. Pepper C, Jasani B, Navabi H, Wynford-Thomas D, Gibbs AR. Simian virus 40 large T antigen (SV40LTag) primer specific DNA amplification in human pleural mesothelioma tissue. *Thorax.* 1996;51(11):1074–6.
101. Poulin DL, DeCaprio JA. Is there a role for SV40 in human cancer? *J Clin Oncol.* 2006;24(26):4356–65.
102. Cristaudo A, Foddis R, Vivaldi A, Buselli R, Gattini V, Guglielmi G, et al. SV40 enhances the risk of malignant mesothelioma among people exposed to asbestos: a molecular epidemiologic case-control study. *Cancer Res.* 2005;65(8):3049–52.
103. Strickler HD, International SVWG. A multicenter evaluation of assays for detection of SV40 DNA and results in masked mesothelioma specimens. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2001;10(5):523–32.
104. Strickler HD, Goedert JJ, Devesa SS, Lahey J, Fraumeni JF Jr, Rosenberg PS. Trends in U.S. pleural mesothelioma incidence rates following simian virus 40 contamination of early poliovirus vaccines. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(1):38–45.
105. Kane AB. Animal models of malignant mesothelioma. *Inhal Toxicol.* 2006;18(12):1001–4.
106. Robinson C, Dick IM, Wise MJ, Holloway A, Diyagama D, Robinson BW, et al. Consistent gene expression profiles in MexTAG transgenic mouse and wild type mouse asbestos-induced mesothelioma. *BMC Cancer.* 2015;15:983.
107. Herrick SE, Mutsaers SE. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(4):621–42.
108. Bolen JW, Hammar SP, McNutt MA. Reactive and neoplastic serosal tissue. A light microscopic, ultrastructural, and immunocytochemical study. *Am J Surg Pathol.* 1986;10(1):34–47.
109. Jaurand MC, Fleury-Feith J. Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Respirology.* 2005;10(1):2–8.
110. Roe OD, Anderssen E, Helge E, Pettersen CH, Olsen KS, Sandeck H, et al. Genome-wide profile of pleural mesothelioma versus parietal and visceral pleura: the emerging gene portrait of the mesothelioma phenotype. *PLoS One.* 2009;4(8):e6554.
111. Heintz NH, Janssen-Heininger YM, Mossman BT. Asbestos, lung cancers, and mesotheliomas: from molecular approaches to targeting tumor survival pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;42(2):133–9.
112. Chew SH, Toyokuni S. Malignant mesothelioma as an oxidative stress-induced cancer: an update. *Free Radic Biol Med.* 2015;86:166–78.

113. Yang H, Rivera Z, Jube S, Nasu M, Bertino P, Goparaju C, et al. Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(28):12611–6.
114. Bueno R, Stawiski EW, Goldstein LD, Durinck S, De Rienzo A, Modrusan Z, et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet*. 2016;48(4):407–16.
115. Guo G, Chmielecki J, Goparaju C, Heguy A, Dolgalev I, Carbone M, et al. Whole-exome sequencing reveals frequent genetic alterations in BAP1, NF2, CDKN2A, and CUL1 in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res*. 2015;75(2):264–9.
116. Lo Iacono M, Monica V, Righi L, Grosso F, Libener R, Vatrano S, et al. Targeted next-generation sequencing of cancer genes in advanced stage malignant pleural mesothelioma: a retrospective study. *J Thorac Oncol*. 2015;10(3):492–9.
117. Altomare DA, Menges CW, Xu J, Pei J, Zhang L, Tadevosyan A, et al. Losses of both products of the *Cdkn2a/Arf* locus contribute to asbestos-induced mesothelioma development and cooperate to accelerate tumorigenesis. *PLoS One*. 2011;6(4):e18828.
118. Altomare DA, Vaslet CA, Skele KL, De Rienzo A, Devarajan K, Jhanwar SC, et al. A mouse model recapitulating molecular features of human mesothelioma. *Cancer Res*. 2005;65(18):8090–5.
119. Jongsma J, van Montfort E, Vooijs M, Zevenhoven J, Krimpenfort P, van der Valk M, et al. A conditional mouse model for malignant mesothelioma. *Cancer Cell*. 2008;13(3):261–71.
120. Xu J, Kadariya Y, Cheung M, Pei J, Talarchek J, Sementino E, et al. Germline mutation of *Bap1* accelerates development of asbestos-induced malignant mesothelioma. *Cancer Res*. 2014;74(16):4388–97.
121. Ascoli V, Romeo E, Carnovale Scalzo C, Cozzi I, Ancona L, Cavariani F, et al. Familial malignant mesothelioma: a population-based study in central Italy (1980-2012). *Cancer Epidemiol*. 2014;38(3):273–8.
122. Matullo G, Guarrera S, Betti M, Fiorito G, Ferrante D, Voglino F, et al. Genetic variants associated with increased risk of malignant pleural mesothelioma: a genome-wide association study. *PLoS One*. 2013;8(4):e61253.
123. Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet*. 2011;43(10):1022–5.
124. Ascoli V, Cozzi I, Vatrano S, Izzo S, Giorcelli J, Romeo E, et al. Mesothelioma families without inheritance of a BAP1 predisposing mutation. *Cancer Genet*. 2016;209(9):381–7.
125. LaFave LM, Beguelin W, Koche R, Teater M, Spitzer B, Chramiec A, et al. Loss of BAP1 function leads to EZH2-dependent transformation. *Nat Med*. 2015;21(11):1344–9.
126. Zauderer MG, Szlosarek P, Le Moulec S, Popat S, Taylor P, Planchard D, et al. Phase 2, multicenter study of the EZH2 inhibitor tazemetostat as monotherapy in adults with relapsed or refractory (R/R) malignant mesothelioma (MM) with BAP1 inactivation. *J Clin Oncol*. 2018;36(15_suppl; abstr):8515.
127. Gordon GJ, Rockwell GN, Jensen RV, Rheinwald JG, Glickman JN, Aronson JP, et al. Identification of novel candidate oncogenes and tumor suppressors in malignant pleural mesothelioma using large-scale transcriptional profiling. *Am J Pathol*. 2005;166(6):1827–40.
128. Pass HI, Liu Z, Wali A, Bueno R, Land S, Lott D, et al. Gene expression profiles predict survival and progression of pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2004;10(3):849–59.
129. Lopez-Rios F, Chuai S, Flores R, Shimizu S, Ohno T, Wakahara K, et al. Global gene expression profiling of pleural mesotheliomas: overexpression of aurora kinases and P16/CDKN2A deletion as prognostic factors and critical evaluation of microarray-based prognostic prediction. *Cancer Res*. 2006;66(6):2970–9.
130. de Reynies A, Jaurand MC, Renier A, Couchy G, Hysi I, Elarouci N, et al. Molecular classification of malignant pleural mesothelioma: identification of a poor prognosis subgroup linked to the epithelial-to-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res*. 2014;20(5):1323–34.
131. Singhal S, Wiewrodt R, Malden LD, Amin KM, Matzie K, Friedberg J, et al. Gene expression profiling of malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2003;9(8):3080–97.
132. Sugarbaker DJ, Richards WG, Gordon GJ, Dong L, De Rienzo A, Maulik G, et al. Transcriptome sequencing of malignant pleural mesothelioma tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(9):3521–6.
133. Nymark P, Lindholm PM, Korpela MV, Lahti L, Ruosaari S, Kaski S, et al. Gene expression profiles in asbestos-exposed epithelial and mesothelial lung cell lines. *BMC Genomics*. 2007;8:62.
134. Ramos-Nino ME, Heintz N, Scappoli L, Martinelli M, Land S, Nowak N, et al. Gene profiling and kinase screening in asbestos-exposed epithelial cells and lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29(3 Suppl):S51–8.
135. Shukla A, MacPherson MB, Hillegass J, Ramos-Nino ME, Alexeeva V, Vacek PM, et al. Alterations in gene expression in human mesothelial cells correlate with mineral pathogenicity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2009;41(1):114–23.
136. Putnam EA, Smartt A, Groves A, Schwanke C, Brezinski M, Pershouse MA. Gene expression changes after exposure to six-mix in a mouse model. *J Immunotoxicol*. 2008;5(2):139–44.
137. Sabo-Attwood T, Ramos-Nino M, Bond J, Butnor KJ, Heintz N, Gruber AD, et al. Gene expression profiles reveal increased *mClca3* (*Gob5*) expression and mucin production in a murine model of asbestos-induced fibrogenesis. *Am J Pathol*. 2005;167(5):1243–56.

138. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med.* 2009;60:167–79.
139. Reid G. MicroRNAs in mesothelioma: from tumour suppressors and biomarkers to therapeutic targets. *J Thorac Dis.* 2015;7(6):1031–40.
140. Tanaka N, Toyooka S, Soh J, Tsukuda K, Shien K, Furukawa M, et al. Downregulation of microRNA-34 induces cell proliferation and invasion of human mesothelial cells. *Oncol Rep.* 2013;29(6):2169–74.
141. Menges CW, Kadariya Y, Altomare D, Talarchek J, Neumann-Domer E, Wu Y, et al. Tumor suppressor alterations cooperate to drive aggressive mesotheliomas with enriched cancer stem cells via a p53-miR-34a-c-Met axis. *Cancer Res.* 2014;74(4):1261–71.
142. Christensen BC, Houseman EA, Godleski JJ, Marsit CJ, Longacker JL, Roelofs CR, et al. Epigenetic profiles distinguish pleural mesothelioma from normal pleura and predict lung asbestos burden and clinical outcome. *Cancer Res.* 2009;69(1):227–34.
143. Christensen BC, Godleski JJ, Roelofs CR, Longacker JL, Bueno R, Sugarbaker DJ, et al. Asbestos burden predicts survival in pleural mesothelioma. *Environ Health Perspect.* 2008;116(6):723–6.
144. Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2011;17(15):4965–74.
145. Cioce M, Ganci F, Canu V, Sacconi A, Mori F, Canino C, et al. Protumorigenic effects of mir-145 loss in malignant pleural mesothelioma. *Oncogene.* 2014;33(46):5319–31.
146. Andersen M, Trapani D, Ravn J, Sorensen JB, Andersen CB, Grauslund M, et al. Methylation-associated silencing of microRNA-126 and its host gene EGFL7 in malignant pleural mesothelioma. *Anticancer Res.* 2015;35(11):6223–9.
147. Ivanov SV, Goparaju CM, Lopez P, Zavadil J, Toren-Haritan G, Rosenwald S, et al. Pro-tumorigenic effects of miR-31 loss in mesothelioma. *J Biol Chem.* 2010;285(30):22809–17.
148. Johnson TG, Schelch K, Cheng YY, Williams M, Sarun KH, Kirschner MB, et al. Dysregulated expression of the microRNA miR-137 and its target YBX1 contribute to the invasive characteristics of malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2018;13(2):258–72.
149. Matsumoto S, Nabeshima K, Hamasaki M, Shibuta T, Umemura T. Upregulation of microRNA-31 associates with a poor prognosis of malignant pleural mesothelioma with sarcomatoid component. *Med Oncol.* 2014;31(12):303.
150. Pass HI, Goparaju C, Ivanov S, Donington J, Carbone M, Hoshen M, et al. hsa-miR-29c* is linked to the prognosis of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res.* 2010;70(5):1916–24.
151. Fassina A, Cappellesso R, Guzzardo V, Dalla Via L, Piccolo S, Ventura L, et al. Epithelial-mesenchymal transition in malignant mesothelioma. *Mod Pathol.* 2012;25(1):86–99.
152. Reid G, Pel ME, Kirschner MB, Cheng YY, Mugridge N, Weiss J, et al. Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol.* 2013;24(12):3128–35.
153. Williams M, Kirschner MB, Cheng YY, Hanh J, Weiss J, Mugridge N, et al. miR-193a-3p is a potential tumor suppressor in malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget.* 2015;6(27):23480–95.
154. Khodayari N, Mohammed KA, Lee H, Kaye F, Nasreen N. MicroRNA-302b targets Mcl-1 and inhibits cell proliferation and induces apoptosis in malignant pleural mesothelioma cells. *Am J Cancer Res.* 2016;6(9):1996–2009.
155. van Zandwijk N, Pavlakis N, Kao SC, Linton A, Boyer MJ, Clarke S, et al. Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study. *Lancet Oncol.* 2017;18(10):1386–96.
156. Kao SC, Cheng YY, Williams M, Kirschner MB, Madore J, Lum T, et al. Tumor suppressor microRNAs contribute to the regulation of PD-L1 expression in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2017;12(9):1421–33.
157. De Santi C, Vencken S, Blake J, Haase B, Benes V, Gemignani F, et al. Identification of MiR-21-5p as a functional regulator of mesothelin expression using MicroRNA capture affinity coupled with next generation sequencing. *PLoS One.* 2017;12(1):e0170999.

Capitolo 4

MECCANISMI GENETICI ED EPIGENETICI DEL MESOTELIOMA

Anna Aspesi, Marika Sculco, Simonetta Guarrera, Elisabetta Casalone, Laura Moro, Corrado Magnani, Giuseppe Matullo e Irma Dianzani

4.1 Introduzione

La caratterizzazione del genoma del mesotelioma maligno (MM) può avere degli importanti risvolti, sia sul piano delle conoscenze patologiche e biologiche della malattia, sia sul miglioramento della pratica clinica. In generale, la definizione delle alterazioni a carico del DNA del genoma tumorale è risultata utile per arrivare ad identificare quegli eventi molecolari, definiti in gergo tecnico “mutazioni driver” che sostengono il processo di cancerogenesi o la progressione tumorale. I primi studi si sono focalizzati sul ruolo dei singoli geni, in particolar modo della *TP53*. Se prendiamo in esame le informazioni generate dalla caratterizzazione del genoma dei tumori al polmone e del melanoma, i risultati fin qui ottenuti hanno permesso di raggiungere importanti traguardi nel definire i profili mutazionali (definite in inglese con il termine tecnico di: “signature”) generati dai due principali fattori che favoriscono la cancerogenesi, cioè le radiazioni UV e le sostanze carcinogene contenute nel tabacco (1, 2). La rivoluzione operata dalla tecnologia di sequenziamento del DNA di nuova generazione (dall’inglese: “Next Generation Sequencing, abbreviato con l’acronimo: “NGS”) e dai nuovi strumenti bioinformatici, ha permesso di analizzare in modo sistematico il genoma di un gran numero di tumori. I brillanti risultati ottenuti negli studi di Stratton e collaboratori, non solo hanno identificato nel genoma delle cellule tumorali la presenza di diverse *signatures*, ma hanno evidenziato che ognuna di queste *signatures* deriva dalla esposizione ad uno specifico cancerogeno o è la conseguenza di precisi percorsi di trasformazione neoplastica, quali l’inattivazione dei meccanismi di riparazione del DNA o l’attivazione di enzimi che presiedono ai processi di deaminazione (2).

L’identificazione di alterazioni in specifici pathways ha permesso di identificare dei meccanismi di cancerogenesi comuni a tumori che non necessariamente hanno la stessa origine istologica, gettando così le basi per sviluppare terapie mirate verso quei determinati *pathways*. Inoltre, la classificazione dei tumori oggi può essere supportata anche dalle conoscenze delle caratteristiche del genoma e del trascrittoma delle cellule tumorali. Va inoltre ricordato che le caratteristiche germinali del genoma di ogni individuo possono modulare la risposta ai vari carcinogeni e quindi il processo di trasformazione neoplastica. I fattori genetici di rischio sono molto ben caratterizzati in diversi tumori e possono avere importanti conseguenze sul piano traslazionale. Ad esempio, individui che sono portatori di questi fattori di rischio possono beneficiare dell’implementazione dei programmi di screening finalizzati ad una diagnosi precoce della malattia. Inoltre, lo stesso fattore di rischio può modificare la funzionalità dei *pathways* di trasformazione neoplastica e anche la risposta alle specifiche terapie.

Infine, è noto che molti geni onco-soppressori sono inattivati da meccanismi epigenetici. Il termine epigenetico si riferisce a cambiamenti ereditabili e reversibili nei meccanismi che regolano l’attività di un gene senza che ne sia alterata la sequenza genica. Negli ultimi anni, numerose evidenze scientifiche hanno sottolineato il ruolo sempre meno marginale che i meccanismi epigenetici hanno nel regolare sia il processo di cancerogenesi sia la risposta alla terapia. Particolare attenzione è anche posta al ruolo dei meccanismi epigenetici quali biomarcatori (cfr. biomarkers) della diagnosi precoce, della prognosi e della risposta alla terapia.

In questo capitolo verranno discussi i diversi aspetti, sia genetici che epigenetici che caratterizzano il genoma del mesotelioma pleurico maligno (MPM), dando enfasi anche ad alcuni aspetti relativi alla predisposizione genetica e alla interazione gene/ambiente. Verrà inoltre messo in luce il

potenziale uso di queste *signatures* genetiche ed epigenetiche nella pianificazione di nuovi approcci terapeutici.

4.2 Fattori genetici di rischio del Mesotelioma

Il processo di cancerogenesi del MPM è in gran parte innescato dall'esposizione alle fibre di amianto o simili all'amianto. È noto che i livelli di esposizione all'amianto correlano con il rischio di sviluppare un MPM (3), tuttavia diversi studi epidemiologici hanno suggerito che ogni individuo può rispondere in maniera diversa all'esposizione a questa sostanza cancerogena. Una importante osservazione è che solo il 10% dei lavoratori professionalmente esposti all'amianto sviluppano il MPM (4). Inoltre, molti lavori scientifici riportano una segregazione familiare di casi di MPM (5). Queste osservazioni hanno suggerito l'ipotesi di una predisposizione genetica, di tipo ereditario, che è in grado di modificare gli effetti dell'esposizione all'amianto.

Generalmente, i fattori di predisposizione ereditaria sono dei cambiamenti (definiti in gergo tecnico, "varianti") nella sequenza del DNA, presenti nella linea germinale, che modificano la funzione di uno specifico gene. Possono essere divise in tre classi, a seconda del rischio relativo (RR) a loro associato: fattori di rischio bassi, medi e alti.

I fattori a basso rischio sono in genere delle varianti nella sequenza del DNA che solo in minima parte modificano la funzione del gene o del *pathway* biochimico di cui il gene fa parte. In questo caso, una singola variante nella sequenza del DNA non ha un sostanziale effetto sul fenotipo, mentre molte varianti del DNA presenti in più geni che afferiscono allo stesso *pathway* possono alterarne le funzioni, favorendo lo sviluppo della patologia. In questo caso la malattia non segue le classiche regole dell'eredità mendeliana perché ogni variante risulta ereditata in modo indipendente dalle altre.

Questi fattori di rischio vengono identificati mediante studi definiti di "Genome Wide Association" (abbreviato dall'inglese con l'acronimo: GWAS) e vengono fatti confrontando il DNA di migliaia di pazienti con quello di individui sani (6). Poiché ogni singola variante conferisce un rischio basso, è necessario reclutare un alto numero di individui per ottenere dei dati che siano statisticamente significativi. Lo scopo di questi studi è quello di identificare varianti nel DNA che sono presenti solo nei pazienti e non negli individui sani. Ci si aspetta che questi studi possano aumentare le attuali conoscenze sugli effetti cancerogeni dell'amianto e permettano di valutare meglio il rischio associato alla sua esposizione.

Ad oggi, sono stati condotti solo due studi di GWAS nel MPM, entrambi hanno reclutato diverse centinaia di pazienti e di controlli sani, ma il numero di casi analizzati non è risultato sufficiente per ottenere una valenza statistica (7, 8). Nonostante questo, entrambi gli studi hanno identificato una regione genica associata al genoma dei pazienti con MPM che mappa in prossimità del gene *FOXK1*, un gene che codifica per un fattore che interagisce con il gene *BAP1* (i.e., *BRCAl-Associated Protein 1*), un noto fattore di rischio associato al MPM.

Il gene *BAP1* codifica per un gene ad attività onco-soppressiva che risulta frequentemente deletato nel genoma di diversi tumori, compreso il melanoma cutaneo, il melanoma uveale, e il mesotelioma (9). Varianti germinali in *BAP1* caratterizzano le sindromi di predisposizione ai tumori associati a *BAP1* (*BAP1-TPDS*, MIM#614327) (10). Le sindromi con predisposizione allo sviluppo di tumori sono causate da mutazioni germinali in geni ad attività onco-soppressiva e sono ereditate con tratti autosomici dominanti. I pazienti con queste sindromi hanno un alto o moderato rischio di sviluppare specifiche neoplasie durante l'arco della loro vita. Spesso sviluppano in modo indipendente diverse forme di neoplasia.

Individui con *BAP1-TPDS* hanno un elevato rischio di sviluppare il mesotelioma, il melanoma cutaneo e uveale, il carcinoma renale a cellule chiare e il carcinoma baso cellulare (10). Inoltre

sviluppano a livello epiteliale diversi tumori benigni chiamati tumori di “Spitz atipici” o MBAITs (*i.e.*, mutated-*BAP1* Atypical Intradermal Tumors) noti anche con il termine di “bapomi” (10, 11).

Pazienti con diagnosi di melanoma uveale dovuto ad una sindrome BAP1-TPDS hanno una scarsa prognosi (10, 12), mentre pazienti con diagnosi di mesotelioma con sindrome BAP1-TPDS sembrano avere una prognosi migliore rispetto a quelli con mesotelioma non associato alla sindrome (13).

Fino ad oggi sono state identificate novanta famiglie con sindrome BAP1-TPDS, di cui 48 includono pazienti con diagnosi di MM. Questa sindrome è in effetti molto rara (11, 14-38). In pazienti con sindrome BAP1-TPDS, l'età alla diagnosi del mesotelioma è più precoce rispetto ai pazienti con diagnosi di mesotelioma non associati a questa sindrome (13, 26).

Molti dei MM sono dei MPM con istotipo epitelioide, mentre i mesoteliomi peritoneali (PM) sono rari (10). La prevalenza di sindromi BAP1-TPDS tra pazienti con familiarità per MPM varia dal 6% (9/153) al 7,7% (3/39) (26, 31) ed è risultata più alta di quella osservata nei casi sporadici (23, 39, 40).

Altri tipi di tumore sono stati riscontrati in pazienti con sindrome BAP1-TPDS, *i.e.*, tumori al seno (12, 14, 21, 22), colangio-carcinoma (12, 22, 41), meningioma (18, 25, 38, 41), tumori neuro endocrini (18, 19), tumori del polmone non a piccole cellule (NSCLC) (12, 18, 19, 42), carcinomi della tiroide (21, 43) e carcinoma muco epidermoide della lingua (23).

Il gene *BAP1* (#MIM 603089) mappa sul cromosoma 3p21.1 e codifica per “ubiquitin-carbossi-terminale idrolasi”. In breve, si tratta di un enzima nucleare ad attività de-ubiquitinante, ossia e' un enzima che grazie alla sua attività idrolasica, catalizza la rimozione di un residuo di ubiquitina dalle sue proteine bersaglio. Il prodotto del gene *BAP1* ha tre domini funzionali: un dominio ubiquitin carbossi-terminale idrolasi e due sequenze di localizzazione nucleare. La proteina BAP1 forma un complesso multiproteico in associazione con le proteine FOXK1, HCFC1, ASXL1/2 e OGT (44).

BAP1 è coinvolto nei meccanismi di riparazione del DNA, di modulazione della cromatina, di regolazione trascrizionale, di proliferazione e morte cellulare e del metabolismo glucidico (45-49). Il meccanismo di cancerogenesi *BAP1*-dipendente non è oggi ancora noto, anche se tutte queste funzioni non sono mutualmente esclusive. *BAP1* è coinvolto nella riparazione del DNA interagendo con il sistema di riparazione mediante ricombinazione omologa (noto come Homologous Recombination Repair, di cui l'acronimo: HRR) (49).

Topi eterozigoti per il gene *Bap1*(+/-) sono più sensibili all'amianto dei topi che hanno il locus genico funzionante (in gergo tecnico definito con il termine: wild type) (50, 51). La quantificazione dei livelli di esposizione all'amianto è stata riportata solo per quattro individui con MPM e sindrome BAP1-TPDS: in tutti i casi sono stati registrati bassi livelli di esposizione (31, 52). Mutazioni ricorrenti possono essere dovute a hot spot mutazionali, come ad esempio i dinucleotidi CpG.

Sono stati identificati altri undici geni che, se mutati, possono contribuire alla predisposizione al MPM: *CDKN2A*, *PALB2*, *BRCA1*, *FANCI*, *ATM*, *SLX4*, *BRCA2*, *FANCC*, *FANCF*, *PMS1*, e *XPC* (32, 53) (Tabella 4.1). Tutti questi geni, tranne *PMS1*, sono geni ad attività onco soppressiva, responsabili di sindromi di predisposizione al cancro con diversi spettri tumorali. In particolare, mutazioni nei geni *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *SLX4* e *PALB2* conferiscono una particolare predisposizione nelle donne ai tumori al seno e all'ovaio, mentre mutazioni nei geni *BRCA1* e *BRCA2* possono predisporre ai tumori alla prostata e al pancreas (61); mutazioni nel gene *CDKN2A* danno predisposizione al melanoma e al tumore al pancreas (54), mentre mutazioni nel gene *XPC* conferiscono predisposizione al carcinoma baso cellulare, al carcinoma a cellule squamose e al melanoma (62). Il gene *PMS1* è coinvolto nel sistema di riparazione noto come “Mismatch Repair” (da cui l'acronimo: MMR) e, se mutato, predispone a diversi tipi di neoplasie (63,64).

Tabella 4.1. Lista dei geni di predisposizione con rischio medio-alto

Gene	Funzione	Referenza
<i>BAP1</i>	Enzima deubiquitinante, proliferazione cellulare, sistema di riparazione del DNA (HRR)	(11, 12, 14-39, 41-43, 54-60)
<i>CDKN2A</i>	Regolazione del ciclo cellulare	(32)
<i>ATM</i>	Regolazione del ciclo cellulare. Sistema di riparazione del DNA (HRR)	(53)
<i>BRCA1</i>	Sistema di riparazione del DNA (HRR)	(53)
<i>BRCA2</i>	Sistema di riparazione del DNA (HRR)	(53)
<i>FANCC</i>	Sistema di riparazione del DNA (HRR)	(53)
<i>FANCF</i>	Sistema di riparazione del DNA (HRR)	(53)
<i>FANCI</i>	Sistema di riparazione del DNA (HRR)	(53)
<i>PALB2</i>	Sistema di riparazione del DNA (HRR)	(53)
<i>SLX4</i>	Sistema di riparazione del DNA (HRR)	(53)
<i>XPC</i>	Sistema di riparazione del DNA (NER)	(53)

Nella tabella sono riportati solo i geni che nei pazienti con MM sono responsabili delle sindromi PTV. HRR, Homologous Recombination Repair. NER, Nucleotide Excision Repair.

Varianti germinali in omozigosi nel gene *BRCA1* (noto anche come *FANCS*), *BRCA2* (noto anche come *FANCD1*), *FANCC*, *FANCI*, *FANCF*, *SLX4* (noto anche come *FANCP*) e *PALB2* (noto anche come *FANCN*) sono state riscontrate in pazienti con anemia di Fanconi, una malattia recessiva che predispone ad una ampia gamma di tumori solidi ed ematologici. Questa patologia può essere causata da almeno 20 geni diversi (65), ma che funzionalmente afferiscono tutti ad uno specifico *pathway* attivato in risposta ad agenti che fanno legami covalenti con il DNA (noti come: “agenti cross linkanti”).

Mutazioni nel gene *XPC*, causano una malattia recessiva chiamata xeroderma pigmentosum (MIM#278720). Il gene *XPC* è coinvolto nel sistema di riparazione del DNA chiamato “nucleotide excision repair” (NER), un sistema di riparazione che rimuove i dimeri di pirimidina indotti dalle esposizioni ai raggi ultravioletti.

In molti casi, la perdita dell’allele *wild type* a seguito di una mutazione acquisita successivamente, innesca un processo di cancerogenesi nel tessuto target dei pazienti che hanno ereditato una variante

germinale. Con l'eccezione di *CDKN2A*, coinvolto nel processo di controllo della proliferazione cellulare, tutti questi geni sono coinvolti a diverso titolo nei meccanismi di riparazione del DNA.

Studi aneddotici hanno permesso di includere anche altri due geni nelle sindromi da predisposizione al cancro: *NF2* e *TP53* in quanto il MPM è stato diagnosticato in pazienti affetti da neurofibromatosi di Tipo 2 e nella sindrome di Li-Fraumeni, in seguito a mutazioni germinali rispettivamente nelle varianti *NF2* o *TP53* (66, 67). È importante sottolineare che nei casi di MPM, alcuni di questi geni sono risultati mutati anche nella linea somatica: *i.e.*, *BAP1*, *CDKN2A*, *NF2* e *TP53* (55, 68, 69).

Il coinvolgimento nel rischio di insorgenza del MPM dei geni coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA è stato confermato da diversi autori (70) ed è in accordo con le osservazioni che circa il 12% dei pazienti con diversi tipi di tumori metastatici sono portatori di mutazioni germinali, il 75% delle quali mappano in geni coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA (71).

Verosimilmente lo sviluppo di uno specifico tipo di tumore in pazienti con queste mutazioni germinali dipende dal tipo di cancerogeno a cui sono stati esposti. Se il cancerogeno è l'amianto, il tumore che ne deriva è verosimilmente il MPM. L'analisi dei profili mutazionali dei diversi tumori che colpiscono questi pazienti potrebbe confermare questa ipotesi.

4.3 Il genoma del mesotelioma

Decifrare le alterazioni presenti nel genoma delle cellule tumorali è un passaggio importante sia per avere informazioni sui processi che inducono la cancerogenesi, sia per identificare quei *pathways* molecolari che, nell'era della medicina di precisione, possono diventare dei bersagli terapeutici.

Per identificare le mutazioni puntiformi, i grossi riarrangiamenti genici e le variazioni nel numero di copie dei geni (*alias* CNVs, acronimo del termine inglese *Copy Number Variations*) sono necessari diversi approcci metodologici. Idealmente, i riarrangiamenti genici e le CNVs sono studiate analizzando l'intero genoma mediante la tecnologia array-CGH (acronimo del termine inglese: *Comparative Genomic Hybridization*), con gli array-SNPs (acronimo del termine inglese: *Single Nucleotide Polymorphism*) o mediante sequenziamento dell'intero genoma. Queste metodologie identificano simultaneamente tutti gli aumenti (*cfr.*, *gain*) o perdite (*cfr.*, *loss*) di DNA nel genoma. Le mutazioni puntiformi (*alias* SNVs, acronimo del termine inglese: *Single Nucleotide Variants*) sono invece identificabili mediante tecnologia NGS, attraverso diversi approcci metodologici. Il sequenziamento di tipo "targhettato" analizza le sequenze nucleotidiche di centinaia di geni a funzione nota, associati al cancro, focalizzandosi prevalentemente sulle regioni genomiche corrispondenti agli esoni (analisi in NGS con un "pannello di geni"). Diversamente, l'analisi dell'intero esoma ha il vantaggio di studiare tutti i geni presenti sul genoma umano, focalizzandosi solo sugli esoni, cioè sulle regioni del genoma codificanti. In questo caso le CNVs e i riarrangiamenti genici possono essere identificati, grazie all'utilizzo di opportuni approcci bioinformatici, solo nelle regioni esoniche, mentre non è possibile identificare quelle alterazioni che si verificano nelle regioni non codificanti. L'analisi dell'intero genoma mira a sequenziare tutto il genoma e questo rende possibile, in teoria, identificare tutte le varianti presenti. La gestione della enorme quantità di dati che vengono generati da questo approccio comporta un grosso dispendio di tempo. Inoltre, il ruolo delle principali regioni non codificanti è ancora poco conosciuto, pertanto l'interpretazione funzionale delle varianti identificate in queste regioni risulta complessa.

Generalmente vengono sequenziati in parallelo sia il genoma delle cellule tumorali che quello dei globuli bianchi del sangue, in modo da poter distinguere le varianti somatiche da quelle germinali. Bisogna tenere presente che, a causa della instabilità genetica, una grossa quantità di mutazioni vengono generate in ogni cellula tumorale ad ogni singola divisione cellulare. Pertanto, molte varianti identificate sono definite "*passenger*" (*alias*, di passaggio, neutrali); solo un piccolo numero sono mutazioni "*driver*", cioè mutazioni che conferiscono un preciso vantaggio selettivo

alla cellula. È stato calcolato che solo la metà delle mutazioni *driver* identificate nei tumori interessano geni noti per un ruolo nel cancro, mentre il resto delle mutazioni interessano geni o regioni geniche il cui ruolo nel processo di cancerogenesi deve ancora essere chiarito (72).

I primi studi che hanno riportato *gain* o *loss* di materiale genomico nel genoma delle cellule di mesotelioma sono stati pubblicati per la prima volta circa 20 anni fa (Tabella 4.2) (9, 55, 56, 69, 73-80), mentre le analisi delle singole mutazioni puntiformi nelle cellule di mesotelioma sono state identificate solo con l'avvento della tecnologia NGS (Tabella 4.3) (9, 55-59, 68, 69, 74, 76, 78, 79, 81-85). La maggior parte degli studi focalizzati sulle biopsie di pazienti con diagnosi di MPM hanno dimostrato che, rispetto ad altri tumori, il genoma dei MPM è caratterizzato principalmente da un'ampia gamma di anomalie cromosomiche, come le CNVs e le traslocazioni cromosomiche che generano spesso geni di fusione, mentre sono poco frequenti le mutazioni puntiformi che alterano la funzione delle proteine (60). Queste alterazioni si verificano più frequentemente nei geni oncosoppressori, con una marcata eterogeneità inter-individuale.

In uno studio recente Hylebos e collaboratori hanno identificato le CNVs caratteristiche del mesotelioma, analizzando i dati di array-CGH di 85 pazienti affetti da MPM e conservati nel database pubblico del Cancer Genome Atlas (TCGA) (77). I dati sono stati poi validati in una coorte indipendente di 21 pazienti utilizzando un approccio di sequenziamento del genoma a bassa profondità. I dati validati in entrambe le due coorti hanno confermato la perdita di materiale genomico sui cromosomi 1, 3, 4, 6, 9, 13, e 22 nel 25% dei tumori. Queste perdite interessano prevalentemente le regioni in cui mappano i geni *CDKN2A*, *NF2*, *BAP1*, *EP300*, *SETD2* e *PBRM1*. Alterazioni di tipo *gain* sono meno frequenti delle alterazioni di tipo *loss*. Le principali regioni interessate da *gain* sono riportate sui cromosomi 1, 5, 7, e 17 e sono presenti in circa il 15% dei casi. I geni interessati da queste alterazioni sono principalmente *TERT*, *FCGR2B*, *CD79B*, e *PRKARIA*. In conclusione, le CNVs identificate in entrambi i data-sets, sono delle alterazioni caratteristiche del MPM e interessano sia geni già noti per il loro ruolo nel processo di eziopatogenesi del MPM, sia altri geni non ancora associati al MPM.

I primi studi che hanno analizzato il profilo mutazionale del MPM sono stati condotti in modo indipendente nel 2015 da due distinti ricercatori, Lo Iacono e Guo, usando due diversi approcci di NGS (55, 68). Il limite di entrambi gli studi è che sono stati presi in esame pazienti che avevano già fatto la chemioterapia; questo vuol dire che è possibile che una quota delle mutazioni identificate fosse imputabile all'effetto mutageno dei farmaci utilizzati (60). Lo studio di Lo Iacono e collaboratori ha analizzato 52 geni in 123 pazienti affetti da MPM di cui era disponibile il pezzo bioptico incluso in paraffina (FFPE) (68). I geni trovati mutati erano: *TP53*, *SMARCB1*, *BAP1*, *PDGFRA*, *KIT*, *KDR*, *HRAS*, *PIK3CA*, *STK11* e *NF2*. I *pathways* principalmente affetti erano quelli della p53/riparazione del DNA e quello legato alle chinasi del fosfatidil-inositolo 3/AKT. Utilizzando un diverso approccio metodologico, nel lavoro pubblicato da Guo e collaboratori viene riportato il sequenziamento dell'intero esoma di 22 pazienti di cui era disponibile il tessuto fresco (55). In questi pazienti sono state riscontrate frequenti alterazioni nei geni *BAP1*, *NF2*, *CDKN2A* e *CUL1*. Le vie di trasduzione del segnale che coinvolgono i *pathways* delle MAPK-chinasi e di Wnt sono quelle in cui sono presenti più alterazioni.

Tabella 4.2: lista dei geni in cui sono state riscontrate CNV nel genoma di pazienti affetti da mesotelioma

#	Gene	Alterazione	Funzione	Referenza
1	<u><i>NF2</i></u>	Perdita, riarrangiamenti cromosomici, fusione	Regolazione della: - forma cellulare, - crescita cellulare, - adesione cellulare	(55, 56, 69, 73-77)
2	<u><i>BAP1</i></u>	Perdita, riarrangiamenti cromosomici, fusione	Enzima deubiquitinante, coinvolto nella proliferazione cellulare, e regolazione del sistema di riparazione del DNA (HRR)	(9, 69, 74, 76, 77)
3	<u><i>CDKN2A</i></u> ^o	Riarrangiamenti cromosomici, perdita	Regolazione del ciclo cellulare	(55, 56, 69, 73, 75, 77, 78), (79) ^a
4	<u><i>TRAF7</i></u>	Perdita	Attività ubiquitina transferasi	(76)
5	<u><i>LATS2</i></u>	Perdita	Regolazione della: - mitosi - danni al citoscheletro - risposta al danno	(69, 74, 76)
6	<u><i>CDKN2B</i></u> ^o	Perdita	Regolazione del ciclo cellulare	(55, 69, 78), (79) ^a
7	<u><i>SETD2</i></u>	Fusione, perdita	Regolazione della cromatina	(69, 75- 77)
8	<u><i>FGFR3</i></u>	Perdita	Regolazione della: - forma cellulare - crescita cellulare - adesione cellulare	(76)
9	<i>PBRM1</i>	Fusione, perdita	Regolazione della: cromatina replicazione del DNA	(69, 75, 77)
10	<u><i>HUWE1</i></u>	Perdita	Meccanismi di ubiquitinazione	(76)
11	<i>GRM8</i>	Perdita	Regolazione della trascrizione	(76)
12	<i>PTEN</i>	Perdita, fusione	Proteina con attività fosfataseica	(69, 74)
13	<u><i>TP53</i></u>	Perdita	Regolazione della: divisione cellulare, sistema di riparazione del DNA senescenza, apoptosi	(55, 69, 74, 76)
14	<u><i>LATS1</i></u>	Perdita	Regolazione del ciclo cellulare	(69, 74)
15	<u><i>STK11</i></u>	Fusione	Proteina ad attività tirosin kinasica	(69, 74), (75) ^b
16	<i>CDH5</i>	Perdita	Regolazione della: - adesione cellulare, - riorganizzazione del citoscheletro	(74)
17	<i>ERRF11</i>	Perdita	Regolazione della: - crescita cellulare - risposta allo stress cellulare sistemi comunicazione cellulare	(74)
18	<i>SDHB</i>	Perdita	Regolazione del: - ciclo dell'acido citrico - catena respiratoria	(74)
19	<i>RAP1</i>	Perdita	Regolazione del: - sistema di trasduzione del segnale - adesione cellulare - formazione delle giunzioni cellulari.	(74)
20	<u><i>RASSF1</i></u> ^o	Perdita	Regolazione del: - ciclo cellulare - apoptosi	(74)

			- sistema di riparazione del DNA	
21	<i>DUSP7</i>	Perdita	Coinvolto nel pathway delle MAP chinasi	(74)
			Regolazione della:	
22	<i>PTPN13</i>	Perdita	- apoptosi - crescita cellulare - differenziazione - ciclo mitotico	(74,77)
			Regolazione della:	
23	<i>PTPRD</i>	Perdita	crescita cellulare - differenziamento - ciclo mitotico	(74)
24	<i>RB1</i>	Perdita	Regolazione del ciclo cellulare	(74,77)
			Regolazione del:	
25	<i>ING1</i>	Perdita	- blocco della crescita cellulare - apoptosi	(74)
26	<i>SPRY2</i>	Perdita	Regolazione del processo di traslocazione delle proteine	(74)
27	<i>CDKN3</i>	Perdita	Regolazione del ciclo cellulare	(74)
28	<u>SMARCB1</u>	Perdita	Regolazione della cromatina	(74, 75, 77)
			Coinvolto nel:	
29	<i>CHEK2</i>	Perdita	- sistema di riparazione del DNA - blocco del ciclo cellulare - apoptosi	(74, 75, 77)
30	<i>DMC1</i>	Perdita	Ricombinazione omologa durante la meiosi	(74)
			Regolazione della:	
31	<i>RICTOR</i>	Aumento	- crescita cellulare - proliferazione cellulare	(74)
			Coinvolto nella:	
32	<i>TRIO</i>	Aumento	- rimodellamento dell'actina - migrazione cellulare - regolazione della crescita cellulare	(74)
			Regolazione del:	
33	<i>RHEB</i>	Aumento	- ciclo cellulare - crescita cellulare	(74)
34	<i>DPP10</i>	Rottura cromosomica	Regolazione dei canali del Potassio	(80)
35	<i>EPHA6</i>	Rottura cromosomica	Proteina ad attività transferasica	(80)
36	<i>EYS/PRIM2</i>	Rottura cromosomica	Coinvolto nel mantenimento dell'integrità delle cellule dei fotorecettori	(80)
			Regolazione della:	
37	<i>NRG3</i>	Rottura cromosomica	- proliferazione dei neuroblasti - migrazione - differenziamento	(80)
38	<i>NOS2A</i>	Rottura cromosomica	Proteina con attività ossido/reduttiva coinvolta nella neurotrasmissione con attività antimicrobica	(80)
39	<i>RAB11FIP4</i>	Rottura cromosomica	Regolazione del traffico dell'endocitosi	(80)
40	<i>CA10</i>	Rottura cromosomica	Proteina coinvolta nello sviluppo cerebrale	(80)

41	<i>MAP2K6/CA10</i>	Rottura cromosomica	Proteina con attività stimolatoria della attività chinasi	(80)
42	<i>ARSG</i>	Rottura cromosomica	Regolazione della: - biosintesi ormonale - modulazione del segnale cellulare - degradazione delle macromolecole	(80)
43	<i>CCDC123 (CEP89)</i>	Rottura cromosomica	Regolazione della: - biogenesi e mantenimento degli organelli - progressione del ciclo cellulare	(80)
44	<i>CHODL</i>	Rottura cromosomica	Regolazione della: - neurogenesi - crescita e orientamento dei motoneuroni	(80)
45	<i>DLG2</i>	Rottura cromosomica	Regolazione della stabilità sinaptica	(80)
46	<i>GRK5/KCNJ12</i>	Rottura cromosomica	Regolazione della: - apoptosi - proliferazione - ciclo cellulare - controllo e stabilità del potenziale di membrana	(80)
47	<i>CCDC46 (CEP112)</i>	Rottura cromosomica	Regolazione della: -divisione cellulare -centrosoma	(80)
48	<i>TANC2</i>	Rottura cromosomica	Morfogenesi del bulbo oculare	(72)
49	<u>TERT</u>	Aumento	Mantenimento della funzionalità della telomerase	(77, 81)
50	<u>CUL1</u>	Perdita	Regolazione del processo di ubiquitinazione e degradazione proteica	(55)
51	<i>NOSIP</i>	Fusione	Regolazione del processo di ubiquitinazione	(69)
52	<i>LIFR</i>	Fusione	Regolazione della: - differenziamento cellulare - proliferazione cellulare - sopravvivenza cellulare	(69, 77)
53	<i>CLTC</i>	Fusione	Controllo del traffico intracellulare	(69, 77)
54	<i>RRBP1</i>	Fusione	Regolazione del trasporto e traslocazione proteica	(69)
55	<i>DTD1</i>	Fusione	Replicazione del DNA	(69)
56	<i>RPTOR</i>	Aumento	Regolazione della crescita cellulare	(69)
57	<i>BRD4</i>	Aumento	Regolazione della: - cromatina - sistema di riparazione del DNA - replicazione del DNA	(69)
58	<i>TNFRSF14</i>	Aumento	Interazione virus-ospite	(75)
59	<i>DVL1</i>	Aumento	Regolazione delle proteine coinvolte nello sviluppo e proliferazione cellulare	(75)
60	<i>ACSL6</i>	Aumento	Metabolismo degli acidi grassi	(75)
61	<i>RECQL4</i>	Aumento	Regolazione della segregazione e della riparazione del danno al DNA	(75, 77)
62	<i>MYC</i>	Aumento	Regolazione della: -progressione del ciclo cellulare	(75)

			- apoptosi - trasformazione cellulare	
63	<i>KDM5A</i>	Aumento	Regolazione della funzione della cromatina	(75)
64	<i>HOXC11</i>	Aumento	Regolazione processo di morfogenesi e della crescita cellulare	(75)
65	<i>HOXC13</i>	Aumento	Regolazione processo di morfogenesi e della crescita cellulare	(75)
66	<i>TRIM33</i>	Perdita	Regolazione della trascrizione e del processo di ubiquitinazione	(75, 77)
67	<i>UBE4B</i>	Perdita	Regolazione del processo di ubiquitinazione	(75)
68	<i>MLL3</i> (<i>KMT2C</i>)	Perdita	Regolazione della trascrizione e metilazione	(75)
			Regolazione dei sistemi di:	
69	<i>WRN</i>	Perdita	- Riparazione del DNA - Replicazione - Trascrizione - Mantenimento dei telomeri	(75)
70	<i>BMPRIA</i>	Perdita	Controllo del differenziamento cellulare	(75)
71	<i>SUFU</i>	Perdita	Regolazione delle proteine coinvolte nello sviluppo e proliferazione cellulare	(75)
72	<i>PTPN11</i>	Perdita	Regolazione della crescita, del differenziamento cellulare e del ciclo mitotico	(75)
73	<i>CASC5 (KNL1)</i>	Perdita	Controllo della segregazione dei cromosomi e allungamento del fuso mitotico	(75)
			Regolazione dei processi di:	
74	<i>RABEP1</i>	Perdita	- endocitosi - trasporto di proteine - apoptosi	(75)
75	<i>SUZ12</i>	Perdita	Regolazione della cromatina e metilazione	(75)
76	<u><i>ASXL1</i></u>	Perdita	Regolazione della cromatina e trascrizione	(75)
			Regolazione dei processi di:	
77	<i>PDGFB</i>	Perdita	- sviluppo embrionale - proliferazione cellulare - migrazione cellulare - sopravvivenza cellulare - chemotassi	(75, 77)
78	<i>MKLI</i>	Perdita	Differenziamento cellulare della muscolatura liscia	(75, 77)
			Regolazione della:	
79	<i>EP300</i>	Perdita	- Cromatina - crescita cellulare - divisione cellulare - differenziamento cellulare	(75, 77)
80	<i>PATZ1</i>	Perdita	Regolazione della cromatina	(75, 77)
81	<u><i>MYH9</i></u>	Perdita	Controllo dei processi coinvolti nella citocinesi, regolazione della forma cellulare e riorganizzazione del citoscheletro	(56, 75, 77)

82	<i>CLTCL1</i>	Perdita	Regolazione del rimodellamento della cromatina e regolazione della trascrizione	(75, 77)
83	<i>BCR</i>	Perdita	Regolazione dei segnali chimici e della migrazione	(75, 77)
84	<i>RAF1</i>	Aumento	Controllo dei processi coinvolti nella: - proliferazione cellulare, - differenziamento cellulare, - apoptosi, - sopravvivenza cellulare	(75) ^b
85	<i><u>KIT</u></i>	Aumento	Regolazione della: - crescita cellulare - divisione cellulare - sopravvivenza cellulare - migrazione cellulare	(75) ^b
86	<i>CCND3</i>	Aumento	Regolazione del ciclo cellulare	(75) ^b
87	<i>TFEB</i>	Aumento	Regolazione della trascrizione genica	(75) ^b
88	<i>ELN</i>	Aumento	Componente strutturale della matrice extracellulare	(75) ^b
89	<i>HIP1</i>	Aumento	Componente strutturale del citoscheletro	(75) ^b
90	<i>RUNX1T1</i>	Aumento	Fattore di trascrizione	(75) ^b
91	<i>NOTCH1</i>	Aumento	Fattore di trascrizione	(75) ^b
92	<i>RALGDS</i>	Aumento	Coinvolto nel processo di regolazione della attività GTPase	(75) ^b
93	<i>FGFR2</i>	Aumento	Coinvolto nei meccanismi di crescita e di regolazione forma cellulare	(75) ^b
95	<i>CCDN1</i>	Aumento	Regolazione del ciclo cellulare	(75) ^b
96	<i>KRAS</i>	Aumento	Controllo dei processi coinvolti nella: - proliferazione cellulare, - differenziamento cellulare, - apoptosi - sopravvivenza cellulare	(75) ^b
97	<i>FUS</i>	Aumento	Regolazione della trascrizione genica	(75) ^b
98	<i>HERPUD1</i>	Aumento	Coinvolto nei sistemi di maturazione delle proteine nel reticolo endoplasmatico e nella risposta cellulare in presenza di proteine non assemblate correttamente	(75) ^b
99	<i>BRCA1</i>	Aumento	Sistema di riparazione del DNA (HRR)	(75) ^b
100	<i>RARA</i>	Aumento	Controllo dei processi coinvolti nello: - sviluppo e differenziamento cellulare - apoptosi - regolazione della trascrizione	(75) ^b
101	<i>CANTI</i>	Aumento	Regolazione del metabolismo delle pirimidine	(75) ^b
102	<i>ELL</i>	Aumento	Regolazione della trascrizione genica	(75) ^b

		Regolazione del:	(75) ^b
		- metabolismo	
		- proliferazione cellulare	
		- sopravvivenza cellulare,	
		- crescita cellulare	
		- angiogenesi	
103	<i>AKT2</i>	Aumento	
104	<i>APOBEC3B</i>	Perdita	Attività di deamminazione della desossicitidina (77)
105	<i>MNI</i>	Perdita	Regolazione della trascrizione genica (77)
106	<i>EWSR1</i>	Perdita	Controllo della espressione genica, dei sistemi di comunicazione cellulari e processamento e maturazione dell'RNA (77)
107	<i>MAPK1</i>	Perdita	Controllo della proliferazione cellulare, differenziamento. Regolazione della trascrizione e dello sviluppo (77)
108	<i>SEPT5</i>	Perdita	Controllo della divisione cellulare e riorganizzazione del citoscheletro. (77)
109	<i>LZTR1</i>	Perdita	Regolatore della trascrizione genica (77)
110	<i>NCKIPSD</i>	Perdita	Controllo dei sistemi di trasduzione del segnale e nella formazione delle fibre del fuso mitotico (77)
111	<i>SDHA</i>	Aumento	Componente del complesso della catena respiratoria mitocondriale (77)
112	<i>DROSHA</i>	Aumento	Controllo della sintesi dei miRNA (77)
113	<i>ILR7</i>	Aumento	Ricombinazione delle catene VDJ (linfociti) (77)
114	<i>FCGR2B</i>	Aumento	Controllo della fagocitosi e della produzione di anticorpi (77)
115	<i>CDC73</i>	Aumento	Regolazione della divisione e del ciclo cellulare (77)
116	<i>PTPRC</i>	Aumento	Regolazione della crescita cellulare, differenziamento, mitosi (77)
117	<i>MDM4</i>	Aumento	Regolatore della stabilità della p53 (77)
118	<i>ELK4</i>	Aumento	Coinvolto nei meccanismi di regolazione della cromatina e della trascrizione genica (77)
119	<i>SLC45A3</i>	Aumento	Trasportatore di membrana (77)
120	<i>HLF</i>	Aumento	Regolazione della trascrizione genica (77)
121	<i>MSI2</i>	Aumento	Regolazione della trascrizione genica (77)
122	<u>RNF43</u>	Aumento	Processi di ubiquitinazione (77)
123	<i>PPM1D</i>	Aumento	Risposta allo stress cellulare (77)
124	<u>BRIP1</u>	Aumento	Sistema di riparazione del DNA (HRR) (77)

125	<i>CD79B</i>	Aumento	Attività sulla trasduzione del segnale dei recettori di membrana	(77)
126	<i>DDX5</i>	Aumento	Co-regolatore della trascrizione, regolatore dei meccanismi di splicing e coinvolto nel processamento dei piccoli RNA non codificanti	(77)
127	<i>AXIN2</i>	Aumento	Coinvolto nei: - sistemi di riparazione del DNA (MMR) - proliferazione cellulare - morte cellulare - ubiquitinazione	(77)
128	<i>PRKARIA</i>	Aumento	Processi di ubiquitinazione	(77)
129	<i>ROS1</i>	Perdita	Regolazione della crescita cellulare e del differenziamento	(77)
130	<i>CACNA1D</i>	Perdita	Controllo della contrazione muscolare, rilascio di ormoni e neurotrasmettitori	(77)
131	<i>FLT3</i>	Perdita	Regolazione dell'ematopoiesi	(75, 77)
132	<i>FOXO1</i>	Perdita	Crescita dei miociti e differenziamento	(77)
133	<i>EPS15</i>	Perdita	Regolazione della crescita cellulare	(77)
134	<i>WHSC1</i>	Perdita	Regolazione della trascrizione genica e dei fattori trascrizionali coinvolti nello sviluppo	(77)
135	<i>RAP1GDS1</i>	Perdita	Attività ATPasica dipendente del trasporto dei protoni	(77)
136	<u>FBXW7</u>	Perdita	Regolazione del ciclo cellulare e ubiquitinazione	(77)
137	<i>FAT1</i>	Perdita	Regolazione della proliferazione cellulare	(77)
138	<i>NFIB</i>	Perdita	Attivatore trascrizionale	(77)
139	<i>MLLT3</i>	Perdita	Controllo della cromatina e della trascrizione genica	(77)
140	<i>BRCA2</i>	Perdita	Sistema di riparazione del DNA (HRR)	(77)
141	<i>LHFP</i>	Perdita	Proteina transmembrana	(77)
142	<i>LCPI</i>	Perdita	Proteina che si lega all'actina	(77)
143	<i>PMS2</i>	Aumento	Sistema di riparazione del DNA (MMR)	(77)
144	<i>EIF4A2</i>	Aumento	Regolatore dei processi traslazionali	(77)
145	<i>HNRNPA2B1</i>	Aumento	Regolazione del metabolismo e del trasporto dell'RNA	(77)
146	<u>EGFR</u>	Aumento	Regolazione della crescita cellulare	(75, 77)
147	<u>MET</u>	Aumento	Controllo della sopravvivenza cellulare, processi di migrazione cellulare, dell'embriogenesi e della invasione	(77)
148	<i>RAD21</i>	Aumento	Meccanismi di riparazione del rotture a doppio filamenti del DNA strand breaks	(77)

149	<i>KLF6</i>	Aumento	Attivatore trascrizionale	(75) ^b , (77)
150	<i>NAB2</i>	Aumento	Regolatore della trascrizione	(77)
151	<i>MLLT6</i>	Aumento	Proteina legante gli istoni	(77)
152	<i>CIC</i>	Aumento	Regolatore della trascrizione	(77)
153	<i>FAM131B</i>	Aumento	Controllo dei processi di proliferazione e differenziamento cellulare	(77)
154	<i>PLAG1</i>	Aumento	Attivatore trascrizionale	(77)
155	<i>CHCHD7</i>	Aumento	Controllo del metabolismo proteico e import delle proteine mitocondriali	(77)
156	<i>NUTM2B</i>	Aumento	Proteina intracellulare	(77)
157	<i>NUTM2A</i>	Aumento	Proteina intracellulare	(77)
158	<i>ETNK1</i>	Aumento	Attività transferasica	(77)
159	<i>DICER1</i>	Aumento	Metabolismo dell'RNA	(77)
160	<u>ZNF521</u>	Aumento	Proteina in grado di legare in maniera sequenza specifica il DNA	(77)
161	<i>ABL1</i>	Aumento	Controllo dei meccanismi di differenziamento/divisione/adesione cellulare e risposta allo stress	(79) ^a
162	<i>COL1A1</i>	Aumento	Collagene di tipo I	(79) ^a
163	<i>PITCH1</i>	Perdita	Controllo dei meccanismi di sviluppo embrionale	(78)

Tabella 4.2. I geni evidenziati in grassetto sono coinvolti nelle sindromi PTVs. ^aGene che può essere perso anche per meccanismi epigenetici. ^bTipo di tumore non specificato. ^cmesotelioma peritoneale. HRR, homologous recombination repair; MMR, mismatch repair.

Tabella 4.3. lista dei geni in cui sono state riscontrate mutazioni puntiformi o piccole inserzioni o delezioni (indel) nel genoma di pazienti affetti da mesotelioma

# Gene	Funzione	Referenza
1 <u>BAP1</u>	Coinvolto nei processi di: - de-ubiquitinazione - proliferazione cellulare - riparazione del DNA (HRR)	(9, 55-57, 59, 68, 69, 74, 76, 78, 81-85), (79) ^a
2 <u>NF2</u>	Controllo della crescita, adesione e dimensioni cellulari	(55, 56, 68, 69, 74, 76, 81, 84), (78) ^d , (58) ^c
3 <u>TP53</u>	Regolazione dei processi di: - divisione cellulare - sistemi di riparazione del DNA - senescenza - apoptosi	(55, 56, 68, 69, 76, 81, 84, 85), (79) ^a , (58) ^c
4 <u>LATS2</u>	Coinvolto nella regolazione della mitosi e nella risposta al danno del citoscheletro	(76, 84)
5 <u>TERT</u> ^b	Regolazione della attività della telomerasi e controllo della senescenza	(81)
6 <u>RIF1</u>	Regolazione delle seguenti funzioni: - sistemi di riparazione del DNA - cromatina - durata del tempo di duplicazione	(76)
7 <u>CUL1</u>	Regolazione dei processi di ubiquitinazione e degradazione delle proteine	(55)
8 <u>RDX</u>	Organizzazione del citoscheletro	(55)
9 <u>TAOK1</u>	Attività transferasica	(55)
10 <u>PIK3C2B</u>	Regolazione dei processi cellulari di: - proliferazione - sopravvivenza - migrazione - traffico intracellulare delle proteine	(55)
11 <u>EGFR</u>	Recettore per il fattore di crescita coinvolto nella regolazione della: - proliferazione - apoptosi - angiogenesi - migrazione cellulare - adesione cellulare - invasione	(68), (79) ^a
12 <u>LATS1</u>	Controllo del ciclo cellulare	(55, 84)
13 <u>SMARCB1</u>	Regolatore della cromatina	(68, 74)
14 <u>CDKN2A</u> ^c	Controllo del ciclo cellulare	(69, 78, 81, 78, 84), (58) ^c
15 <u>CDKN2B</u> ^c	Controllo del ciclo cellulare	(78, 81, 84)

	Coinvolto nelle funzioni cellulari di:	
16 <i>PIK3C2A</i>	- proliferazione - sopravvivenza - migrazione - traffico proteico	(68)
17 <i>PDGFRA</i>	Recettore per i fattori di crescita	(68)
18 <i>HRAS</i>	Coinvolto nei meccanismi di trasduzione del segnale, crescita e divisione cellulare	(68)
	Coinvolto nei meccanismi di:	
19 <u>KIT</u>	- crescita - divisione cellulare - sopravvivenza - migrazione cellulare	(68)
20 <i>KDR</i>	Attività transferasica	(68)
21 <u>STK11</u>	Proteina ad attività tirosin-chinasica	(68, 78)
	Coinvolto nei meccanismi di:	
22 <u>MET</u> ^o	- sopravvivenza cellulare - migrazione - embriogenesi - invasione	(68)
23 <u>FBXW7</u>	Controllo del ciclo cellulare e regolazione del processo di ubiquitinazione.	(68)
24 <i>SMAD4</i>	Proliferazione cellulare	(68)
25 <i>ERBB4</i>	Crescita cellulare	(68)
26 <i>CSF1R</i>	Citochina coinvolta nella produzione, differenziamento e funzionalità dei macrofagi.	(68)
27 <i>APC</i> ^o	Regolazione dei processi di divisione, adesione e polarizzazione cellulare	(68)
28 <i>RET</i>	Proliferazione cellulare	(68)
	Coinvolto nei meccanismi cellulari di:	
29 <u>FGFR3</u>	- controllo della forma e dimensioni - crescita - adesione	(68, 76)
30 <u>TRAF7</u>	Proteina con attività ubiquitin-transferase	(78)
31 <i>DDX3X</i>	Proteina con attività RNA elicasi, ATP dipendente	(78)
32 <i>RYR2</i>	Regolatore dei livelli di Calcio	(78)
33 <i>CFAP45</i>	Migrazione cellulare	(78)
34 <i>SETDB1</i>	Proteina con attività metil-transferase	(69), (58) ^c
35 <i>SETD5</i>	Proteina con attività metil-transferase	(69)
36 <i>ULK2</i>	Allungamento assonale	(69)
37 <i>DDX51</i>	Proteina che si lega agli acidi nucleici con	(69)

	attività idrolasica	
38 <u>SETD2</u>	Regolazione della cromatina	(69), (78) ^d , (57) ^c
39 <u>APOBEC2</u>	Citidina deamminase e editing dell'RNA ,	(56)
	Coinvolto nei meccanismi cellulari di:	
40 <u>MYH9</u>	- controllo della forma e dimensioni - organizzazione del citoscheletro - citocinesi	(56)
41 <u>PTPRT</u>	Regolazione del sistema di trasduzione del segnale e di adesione cellulare	(56)
42 <u>RNF43</u>	Ubiquitinazione	(56)
43 <u>SCRN2</u>	Attività dipeptidasica	(56)
44 <u>CENPE</u>	Coinvolto nella movimentazione dei cromosomi e allungamento del fuso mitotico	(56)
45 <u>RHOA</u>	Coinvolto nei sistemi di trasduzione del segnale e di adesione cellulare	(56)
46 <u>SAVI</u>	Coinvolto nei processi di degradazione delle proteine, trascrizione e splicing dell'RNA	(84), (58) ^c
47 <u>RASSF1^o</u>	Controllo del ciclo cellulare, apoptosi, e nel sistema di riparazione del DNA	(84)
48 <u>STK3 (MST2)</u>	Apoptosi	(84)
49 <u>MST1</u>	Controllo della motilità ciliare (cellule del polmone) e segnalazione inter cellulare	(84)
50 <u>HUWE1</u>	Ubiquitinazione	(76)
51 <u>NF1</u>	Coinvolto nel pathway delle MAP-chinasi	(79) ^a
52 <u>PREX2</u>	Attivatore delle GTPase	(79) ^a
53 <u>KDM5C</u>	Rimodellamento della cromatina	(79) ^a
54 <u>KDM6A</u>	Meccanismi di demetilazione	(78) ^c
55 <u>ASXL1</u>	Regolazione della cromatina e della trascrizione	(78) ^c
56 <u>BRIP1</u>	Sistema di riparazione del DNA (HRR)	(78) ^c
	Coinvolto nei meccanismi cellulari di:	
57 <u>SMPD4</u>	- Risposta al danno al DNA - stress cellulare - pathway del "Tumor Necrosis Factor"	(58) ^c
58 <u>ARPC1A</u>	Lega i filamenti di actina	(58) ^c
59 <u>PLA2G5</u>	Risposta Infiammatoria	(58) ^c
60 <u>INTS4</u>	Meccanismi di trascrizione	(58) ^c
61 <u>PIBF1</u>	Coinvolto nel pathway del progesterone e degli ormoni steroidei	(58) ^c
62 <u>ATP1B2</u>	Coinvolto nel mantenimento e nella creazione del potenziale elettrochimico	(58) ^c

63	<i>PMSD3</i>	Coinvolto nello sviluppo embrionale, controllo della crescita e omeostasi	(58) ^c
64	<i>TTYH</i>	Trasporto degli ioni	(58) ^c
65	<i>LACE1</i>	Omeostasi delle proteine mitocondriali	(58) ^c
66	<i>ORM1</i>	Infiammazione acuta	(58) ^c
67	<i>RHBDF1</i>	Coinvolto nei meccanismi cellulari di sopravvivenza, proliferazione e migrazione	(58) ^c
68	<i>KCNJ2</i>	Canale del Potassio	(58) ^c
69	<i>P2RY12</i>	Aggregazione piastrinica e coagulazione sanguinea	(58) ^c
70	<i>ANKRD65</i>	Proteina intracellulare	(58) ^c
71	<i>OIT3</i>	Sviluppo e funzionamento del fegato	(58) ^c
72	<i>EED</i>	Proteina con attività metil-transferase sugli Istoni, controllo della senescenza e dello sviluppo embrionale	(58) ^c
73	<i>FOXMI</i>	Attivatore trascrizionale e regolatore della proliferazione cellulare	(58) ^c
74	<i>ICAM2</i>	Molecola di adesione intracellulare	(58) ^c
75	<i>KNCJ2</i>	Differenziamento dei condrociti	(58) ^c
76	<u><i>ZNF521</i></u>	Proteina con un dominio “zinc finger” in grado di legare in maniera sequenza specifica il DNA	(58) ^c
77	<i>NLRP9</i>	Risposta immunitaria di tipo innato	(58) ^c
78	<i>PLXNB2</i>	Coinvolto nei processi di migrazione cellulare e maturazione degli assoni	(58) ^c
79	<i>MSH5</i>	Sistema di riparazione del DNA (MMR)	(58) ^c
80	<i>EPBH2</i>	Processi di sviluppo del Sistema Nervoso	(59) ^c
81	<i>GTPBP3</i>	Modificazioni del tRNA mitocondriale	(59) ^c
82	<i>STYK1</i>	Attività trasferasica	(59) ^c
83	<i>TMEM18</i>	Proteina transmembrana.	(59) ^c

Tabella 4.3. I geni sottolineati e in grassetto sono quelli la cui funzione può essere alterata anche dalle alterazioni cromosomiche, tipo CNV. ^aIl tipo di tumore non è specificato. ^bSia per il mesotelioma pleurico che per quello peritoneale. ^cMesotelioma peritoneale ^dGOF (gain of function, acquisto della funzione). ^e Il gene può essere perso anche per meccanismi epigenetici. HRR, homologous recombination repair; MMR, mismatch repair.

Il lavoro pubblicato da Bueno et al. riporta i dati di 216 genomi di pazienti con MPM, 99 dei quali sono stati sequenziati mediante analisi dell'intero esoma e 103 sono stati sequenziati analizzando un

“pannello” di 344 geni (69). Questi dati sono stati poi integrati con quelli ottenuti mediante RNAseq, una tecnologia di sequenziamento in NGS del RNA che permette di analizzare tutte le specie di RNA che vengono trascritte e di validare gli effetti funzionali delle alterazioni genetiche. I principali geni trovati mutati o persi nei casi analizzati di MPM sono: *BAP1*, *NF2*, *TP53*, *SETD2*, *DDX3X*, *ULK2*, *RYR2*, *CFAP45*, *SETDB1*, *DDX51*, *TRAF7* e *SF3B1*. I *pathways* principalmente modificati sono: “Hippo”, “mTOR”, “metilazione degli istoni”, “RNA elicasi”, e il “segnale di p53” (69). Nel lavoro di De Rienzo e collaboratori, è stato sequenziato l'intero genoma di 10 pazienti affetti da MPM (56). Le mutazioni e le alterazioni cromosomiche identificate sono state successivamente validate mediante un approccio di sequenziamento targhettato, utilizzando un pannello di 9 geni (*BAP1*, *NF2*, *TP53*, *MYH9*, *MYH6*, *MYH10*, *PIK3C2A*, *RHOA*, *TNFRSF1A*) su una coorte indipendente di 147 casi. Successivamente sono stati analizzati altri 136 pazienti, focalizzandosi solo sulle sequenze dei geni *TP53*, *BAP1*, *NF2*, e *CDKN2A*, in quanto erano quelli risultati i più frequentemente mutati. Mutazioni nel gene *TP53* sono state riscontrate principalmente nelle donne. È da notare che in tre pazienti sono state identificate mutazioni germinali del gene *BAP1* che alteravano la funzione della proteina (*alias PTVs*, acronimo del termine inglese *Protein Truncation Variants*) (56).

Dati di sequenziamento dell'esoma con tecnologia NGS sono stati ottenuti anche da cellule prelevate dal versamento pleurico di 27 pazienti con diagnosi di MPM. Le analisi hanno identificato mutazioni nei geni *BAP1*, *CDKN2A* e *NF2* e *loss* nelle regioni in cui mappano i geni *TRAF7*, *LATS2*, *SETD2* e *TP53*, suggerendo che l'analisi del versamento pleurico potrebbe essere usata per monitorare l'evoluzione del profilo molecolare del MPM (76). Studiando 61 culture primarie di mesotelioma, Tranchant e collaboratori hanno identificato un sottogruppo di tumori con mutazioni sia nei geni *LATS2* che *NF2* (84). La presenza di entrambe queste mutazioni nel genoma dei pazienti era associata ad una prognosi peggiore. Queste linee cellulari hanno mostrato anomalie sia nei *pathways* del segnale di “Hippo”, sia nell'espressione delle proteine mTOR, suggerendo la possibilità di sviluppare nuove strategie terapeutiche.

Analizzando con tecnologia NGS un pannello di 236 geni, Ugurluer e collaboratori hanno analizzato fettine di tumore conservate in FFPE di 11 pazienti (7 con diagnosi di MPM e 4 con diagnosi di PM) (78). Nei casi di MPM le mutazioni trovate più frequentemente interessavano i geni *BAP1*, *CDKN2A/B* e *NF2*. Altre PTVs sono state identificate nei geni *PTCH1*, *SETD2*, *STK11*, *KDM6A*, *ASXL1* e *BRIPI*. Anche due casi di PM inclusi nello studio di Ugurluer e collaboratori portavano mutazioni nei geni *BAP1* e *NF2* mentre negli altri due casi non sono state riscontrate delle PTVs. Lo studio di Sheffield e collaboratori del 2015 riporta il sequenziamento dell'intero genoma di due pazienti affetti da PM (58). I due pazienti avevano una diversa istologia e una diversa risposta alla chemioterapia. Il primo caso aveva un istotipo epitelioide, un alto carico tumorale e non aveva risposto alla terapia mentre il secondo caso era un paziente con scarsa sintomatologia clinica, un referto istologico di MM, tipo sarcomatoide con una scarsa prognosi ma che aveva dato una buona risposta alla chemioterapia. Entrambi i pazienti portavano molteplici ma diverse PTVs nel gene *NF2*. Il primo paziente aveva 18 varianti mentre il secondo ne aveva ben 260 in ciascuno dei due reperti biotipici analizzati, una condizione questa definita di ipermutazione somatica. In un altro studio sono analizzati 12 pazienti con PM (59). Mediante diversi approcci tecnologici, quali analisi del numero globale di alterazioni di copie geniche, sequenziamento dell'esoma e sequenziamento targhettato, gli autori hanno dimostrato un basso numero di CNV (prevalentemente *losses*) e di SNVs. Il gene più frequentemente mutato era *BAP1* mentre non risultavano mutati i geni *NF2* e *CDKN2A*. Uno dei pazienti portava una variante germinale di tipo nonsense, che si accoppiava ad una perdita di funzione dell'altro allele nel tumore, una condizione riconducibile ad una sindrome BAP1-TPDS.

In generale possiamo dire che il PM ha una frequenza di mutazioni più bassa rispetto al MPM ma le mutazioni driver identificate nel PM sono le stesse che vengono identificate nel MPM.

Un limite di tutti questi studi è che non viene preso in considerazione il problema dell'eterogeneità intra-tumorale che rappresenta un fattore importante nel processo di cancerogenesi del mesotelioma in quanto ci sono numerosi suggerimenti di una origine policlonale della cancerogenesi (86). Il lavoro di Zhang sul MM del testicolo è un ottimo esempio del problema della eterogeneità intra-tumorale e della sua rapida evoluzione molecolare (87). Lo studio è stato condotto facendo sequenziamento dell'intero genoma su DNA purificato da sezioni in FFPE di quattro diversi reperti bioptici dello stesso paziente. Il primo campione è stato prelevato dal tumore primario, mentre gli altri da una recidiva locale, una metastasi linfonodale all'inguine e una recidiva nella stessa localizzazione anatomica. Questo studio ha analizzato la progressione tumorale attraverso l'indagine molecolare. Le firme delle lesioni molecolari e dei geni mutati erano molto diverse da quelle riportate per i MPM. Ulteriori analisi su altri pazienti devono essere fatte per poter chiarire se realmente i MM del testicolo sono diversi dai MPM (87).

Sequenziare l'intero esoma di un tumore può fornire importanti informazioni riguardo al processo di cancerogenesi in quelle persone che hanno sviluppato in modo indipendente diverse forme di neoplasia. Questo approccio è stato eseguito in un caso di un uomo di 73 anni che ha sviluppato due tumori indipendenti al polmone (un adenocarcinoma e un carcinoma squamoso) e un MPM con istologia di tipo epitelioide. Il paziente era un forte fumatore e non riportava alcuna esposizione all'amianto. Le firme mutazionali identificate nei tumori polmonari erano compatibili con le firme mutazionali riportate per l'esposizione al tabacco, e i geni principalmente mutati erano in linea con quelli descritti in letteratura per queste due neoplasie. Diversamente i dati ottenuti sul PM hanno dimostrato un basso numero di eventi somatici tra cui una PTV nel gene *BAP1* e una nel gene *SETD2*. Una numerosa serie di varianti a basso rischio nei geni coinvolti nei meccanismi di riparazione del DNA potrebbero essere coinvolte nella predisposizione di questo paziente al PM.

I tipi prevalenti di mutazioni presenti nel genoma tumorale sono stati ampiamente descritti in diversi studi (69), in particolare, nel lavoro di Bueno sono state prese in esame non solo le transizioni (C>T, T>C) e le trasversioni (C>A, C>G, T>A, T>G), ma anche le basi nucleotidiche fiancheggianti al 5' e al 3' della base mutata (chiamate in gergo tecnico le "triplette"). Nei pazienti con MPM sono state identificate 5 diverse firme molecolari (*signature* S1, S2, S4, S5, S6) ma le più rappresentate sono la *signature* S1 e la S2. Il dato interessante è che il profilo delle *signatures* associate con l'eziopatogenesi del MPM è diverso da quello identificato nelle biopsie di pazienti con tumore al polmone. Questo dato è in accordo con gli studi epidemiologici che sottolineano come il MPM non sia causato dall'esposizione al fumo come per il tumore al polmone. Per esempio non viene identificata nel genoma del MPM la *signature* S3, caratterizzata dalla trasversione C>A e dovuta alla presenza di addotti ingombranti sul DNA che si formano in seguito al fumo di sigarette, un'esposizione che gli studi epidemiologici non riportano associata all'insorgenza di MPM.

La *signature* S1 non è caratterizzata da alcuna peculiare transizione o trasversione ed è considerata indicativa di una mutazione di tipo "agnostico", come sono quelle indotte dalle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (88, 89). La *signature* S2 è rappresentata da transizioni C>T nella tripletta NpCpG ed è conseguenza di un meccanismo endogeno, la deamminazione della 5-metil citosina a timina nelle coppie dinucleotidiche CpG. La *signature* S4 è caratterizzata da transizioni C>T ed è tipica degli errori di riparazione del DNA indotti dai dimeri di pirimidina, come si osserva nei melanomi. La *signature* S5, caratterizzata da transizioni C>T o da trasversioni C>G nelle triplette TpCpN, è stata associata alla funzione della proteina APOBEC, un enzima frequente attivato nei tumori e responsabile della deamminazione delle citidine (88, 89).

In conclusione lo studio di Bueno, ha identificato un profilo mutazionale in linea con l'esposizione all'amianto (*signature* S1) (69). Gli autori non hanno evidenziato tuttavia differenze significative tra individui esposti (n=69) e non esposti (n=17) all'amianto, anche se questo dato può essere inficiato dal fatto che la corretta quantificazione delle fibre di amianto presenti nel polmone era

disponibile solo per 64 su 217 casi, mentre per tutti gli altri casi l'esposizione all'amianto è stata registrata ma non quantificata.

In generale, si sospetta che l'esposizione all'amianto possa indurre danni al DNA in almeno due modi: *i*) inducendo rotture nei cromosomi, in quanto interferisce con le fibre del fuso mitotico durante la divisione cellulare; *ii*) inducendo un processo infiammatorio e la produzione di ROS. Il primo meccanismo spiegherebbe i grossi riarrangiamenti cromosomici mentre il secondo alcune mutazioni puntiformi.

4.4 La trasferibilità sul piano clinico: i bersagli terapeutici

La possibilità di identificare mutazioni *driver* nel mesotelioma dovrebbe rendere possibile lo sviluppo della medicina di precisione anche in questo tipo di patologia. Come commento generale, questo obiettivo risulta essere oggi particolarmente difficile nei MPM a causa della ampia eterogeneità tumorale che esiste sia a livello inter-paziente ma soprattutto a livello intra-tumorale. Inoltre, sebbene le mutazioni *driver* nei geni codificanti siano molto più rare nei MPM che negli altri tumori (72), tutti gli studi hanno comunque riportato un frequente coinvolgimento dei geni *BAP1*, *NF2*, *CDKN2A* e *SETD2*.

Sebbene sia fuori dagli obiettivi di questa review una discussione dettagliata dei passaggi per raggiungere una trasferibilità terapeutica delle informazioni genomiche-e alcune informazioni sono già state descritte in altri capitoli del libro (90, 91)- è importante ricordare che gli inibitori di *PARP* e di *EZH2* sono stati presi in considerazione per quei tumori caratterizzati da perdita di funzione di *BAP1*, mentre inibitori di *CDK4/6* o *PRMT5* per quei tumori con mutazioni nel gene *CDKN2A*. Inibitori di *FAK* sembrano indicati per quei tumori con mutazioni nel gene *NF2* e inibitori di *PI3K-AKT* per quei tumori con difetti nei geni *PI3K* e *AKT* (90). Nel dettaglio, è appena iniziata la fase di arruolamento di uno studio clinico di fase II per valutare l'attività del tazemesostat, un inibitore di *EZH2*, in pazienti con difetti nel gene *BAP1* (NCT002860286). È stato disegnato uno studio clinico di fase II (NCT002187783) per valutare, anche nei MPM, l'inibitore di *CDK4/6*, ribociclib, in tumori che hanno alterazioni rilevanti a carico di *CDK4/6*, della ciclina *D1/3*, o alterazioni in *P16^{ink4A}*. Nel 2015 è stato invece bloccato uno studio clinico randomizzato (NCT01870609) con l'inibitore di *FAK*, defactinib (VS-6063), versus placebo. Nel 2016, un nuovo studio clinico randomizzato monocentrico ha valutato l'attività di defactinib prima della chirurgia nel MPM (NCT002004028). Le modeste risposte ottenute in uno studio di fase I con apitolisib (GDC-0980), un inibitore sia della *PI3K* (acronimo dall'inglese: *Phosphatidil Inositolo 3 Kinase*) che di *mTOR* (acronimo dall'inglese: *mammalian Target Of Rapamycin*) (NCT0854152), hanno suggerito la necessità di valutare in modo più approfondito nuovi schemi di combinazione.

I fattori di predisposizione possono offrire delle finestre terapeutiche ai pazienti che ne sono portatori. Pazienti con sindromi eredo famigliari di tumore al seno e all'ovaio dovute a mutazioni nei geni *BRCA1/2* è noto che rispondano alla terapia con *PARP* inibitori attraverso un meccanismo noto come "sintesi letale" (92, 93). Questo meccanismo viene attivato quando due o più varianti, se prese singolarmente non sono letali, ma diventano letali quando sono presenti contemporaneamente nella stessa cellula (94). *PARP1* è un enzima nucleare che funziona in tre distinti sistemi di riparazione del DNA: *i*) la rottura a singolo filamento del DNA (in inglese: *Single Strand Break*, *SSB*); *ii*) il sistema di riparazione per scissione di una base (in inglese *Base Excision Repair*, *BER*); *iii*) il sistema alternativo di riparazione non omologa del DNA (in inglese *alternative Non Homologous End Joining* alt-NHEJ) (95). *PARP1* si lega ai *SSBs* e causa la formazione di polimeri di ADP-ribosio (*PAR*) sulle proteine bersaglio (fenomeno comunemente noto con il termine inglese di "PARylation"). I *PARs* sono un segnale per richiamare sul sito di *SSB* le proteine strutturali che devono eseguire la riparazione del DNA. La auto *PAR*ilazione di *PARP1* è poi innescata in seguito al suo rilascio dal filamento del DNA con conseguente inattivazione del processo (94). Gli inibitori

di PARP1 intrappolano l'enzima PARP1 sul sito in cui il DNA è danneggiato e interferiscono con il progredire della forca di replicazione, che collassando su se stessa, trasforma le lesioni a singolo filamento in lesioni a doppio filamento del DNA (in inglese *Double Strand Break* DSB). Sia il sistema HRR che il sistema di riparazione non omologa (dall'inglese *Non Homologous End Joining*, NHEJ) sono utilizzati per riparare i DSBs e far ripartire la forca replicativa bloccata dagli inibitori di PARP1. Quando HRR è compromesso, in seguito a mutazioni inattivanti nei geni *BRCA1* o *BRCA2*, il danno non può essere riparato dal sistema alt-NHEJ, in quanto questo sistema richiede che PARP1 sia attivo. Se entrambi questi sistemi sono bloccati, le cellule per continuare a funzionare possono solo utilizzare il classico sistema dell'NHEJ che per sua natura genera anomalie cromosomiche, instabilità genomica e morte cellulare (69).

Gli inibitori di PARP1 possono indurre morte in quelle cellule che hanno perso entrambi gli alleli di *BAP1*, uno a livello germinale e l'altro a livello somatico oppure entrambi a livello somatico. Le cellule tumorali in pazienti che hanno una variante germinale nel gene *BAP1* hanno una alta probabilità di avere una seconda mutazione nell'allele *wild type*. In teoria, nei pazienti con MPM che hanno una variante germinale in *BAP1*, il tessuto tumorale risulta molto più omogeneo per quanto riguarda la perdita dell'allele di *BAP1* rispetto ai pazienti con tumore sporadico e quindi si ritiene possa rispondere meglio alla terapia. Anche i pazienti con difetti germinali in altri geni coinvolti nell'HRR tendono ad avere lo stesso comportamento.

4.5 Meccanismi epigenetici

I meccanismi che sottendono le fasi di iniziazione e progressione tumorale coinvolgono anche aberrazioni a livello epigenomico creando una complessa connessione con l'instabilità genomica nel processo di evoluzione tumorale.

I meccanismi epigenetici comprendono tre principali processi regolatori: *i*) modificazione degli istoni; *ii*) metilazione del DNA; *iii*) regolazione dell'espressione genica mediante microRNA (miRNA).

Gli istoni sono membri di una famiglia di proteine altamente conservate che si associano al DNA per organizzare la struttura della cromatina nel nucleo. Diverse modificazioni post-traslazionali possono avvenire nelle code istoniche, sul dominio N-terminale, inclusa l'aggiunta o la rimozione di gruppi acetili e metili. Le modificazioni degli istoni sono associate con la regolazione trascrizionale dei geni, favorendo la transizione della cromatina dalla conformazione aperta a quella chiusa.

La metilazione del DNA consiste nell'aggiunta di un residuo metilico (-CH₃) ai residui di cisteina nelle sequenze dinucleotidiche CpG. La metilazione del DNA avviene in posizione 5' sul residuo carbossi-terminale dell'anello della citosina (97), anche se una piccola frazione (2%) può interessare i residui di citosina in ogni sequenza del genoma, o anche nelle regioni non-CpG, come si può osservare nelle cellule staminali embrionali (98). La metilazione del DNA nelle regioni CpG può interessare quelle sequenze promotrici dei geni che sono arricchite in sequenze CpG e che per questo sono comunemente definite come "isole CpG". La metilazione del promotore del DNA è un meccanismo ben caratterizzato di repressione della trascrizione genica che porta allo spegnimento della funzione del gene attraverso l'inibizione dell'interazione con il DNA dei suoi fattori trascrizionali (99). Cambiamenti nei livelli di metilazione del DNA possono portare a fenomeni di trasformazione cellulare. Nelle cellule tumorali è stato osservato uno stato di globale ipo-metilazione del genoma, associato ad una iper-metilazione limitata solo ad alcune regioni cromosomiche (100, 101).

I miRNA sono una famiglia di piccoli RNA non codificanti coinvolti nel silenziamento genico di tipo post-trascrizionale. Un miRNA si lega in maniera sequenza specifica alla regione 3'-UTR del gene bersaglio, causando una inibizione del processo di traslazione o una degradazione dell'mRNA (102). Cambiamenti nei livelli di espressione dei miRNA sono stati associati allo sviluppo dei

tumori (103-105), e in oncologia sono stati proposti come uno strumento diagnostico, prognostico e terapeutico (106-109).

Alterazioni epigenetiche possono essere un fenomeno critico nel processo di trasformazione maligna delle cellule mesoteliali della pleura dopo esposizione all'amianto. Nelle linee cellulari mesoteliali MeT5A sono state descritte di recente le relazioni tra modifiche dello stato di metilazione del DNA e esposizione *in vitro* all'amianto (110). Dopo esposizione alla crocidolite o al crisotilo, gli autori hanno osservato in queste cellule una debole metilazione del DNA, principalmente nei geni coinvolti nella regolazione della matrice cellulare e della adesione, i meccanismi principalmente coinvolti nelle fasi di infiltrazione e danneggiamento del mesotelio. Questo meccanismo faciliterebbe il processo di transizione epitelio mesenchimale (EMT) nei MPM. Questa scoperta potrebbe suggerire un coinvolgimento dei cambiamenti dello stato di metilazione come possibili modulatori dei danni sulla pleura indotti dalla esposizione all'amianto.

Evidenze di una correlazione tra accumulo di amianto e cambiamenti nello stato di metilazione dei promotori di alcuni geni ad attività onco-soppressiva (*APC*, *CCND2*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *HPPBP1* e *RASSF1*) sono stati riportati nel tessuto polmonare di pazienti affetti da MPM. È stato osservato che l'aumento dei livelli di metilazione di questi geni correla con la quantità di amianto presente nel corpo (111). L'inattivazione del gene *CDKN2A* per metilazione è stata descritta anche da Kobayashi et al. (112).

L'analisi di oltre 6000 isole CpG, ha mostrato che 387 geni (6,3%) risultavano ipermetilati nelle biopsie di pazienti con diagnosi di MPM e 544 geni (8,8%) risultavano ipermetilati in biopsie di pazienti con diagnosi di adenocarcinoma, sottolineando che le due condizioni patologiche avevano profili di metilazione del DNA peculiari, come conseguenza dei diversi processi patologici coinvolti (113). Inoltre, Goto e collaboratori hanno suggerito che i tre geni che risultano metilati in modo specifico solo nei MPM, ossia *KAZALD1*, *MAPK13* e *TMEM30B*, potessero avere un potenziale diagnostico.

In uno studio più ampio su 158 casi di mesotelioma e 18 pleure sane, Christensen e collaboratori hanno dimostrato che il profilo di metilazione del DNA di 803 geni associati al cancro era in grado di distinguere i tessuti di pleura normale dai tessuti di mesotelioma, e correlava con una scarsa sopravvivenza (114).

Alterazioni nello stato di metilazione del promotore dei geni *WIF-1* e di *SFRP1*, 2, 4 sono state riscontrate sia nel tessuto biotico di MPM che nelle linee cellulari di mesotelioma (115). L'analisi di 52 campioni di MPM e di 38 campioni di polmone non tumorali ha evidenziato una ipermetilazione, solo nei tessuti di MPM, del promotore dei geni *ESR1*, *SCL6A20* e *SYK* (116). Se utilizzati come biomarcatori per il MPM, la combinazione dei tre geni: *SLC6A20*, *SYK* e *APC* ha raggiunto una sensibilità del 92% e una specificità del 73%. L'aggiunta dello stato di metilazione di *ESR1* come marker positivo, aumenta la sensibilità ma riduce la specificità.

Cheng e collaboratori hanno dimostrato nei MPM una down-regolazione del gene *ZIC1* a seguito di una iper-metilazione del promotore del gene (117). *ZIC1* è un gene ad attività onco-soppressiva che inibisce la funzione di alcuni miRNA coinvolti nella regolazione dell'apoptosi. In particolare *miR-23a* e *miR-27a* sono espressi ad alti livelli nei pazienti con MPM di tipo epitelioide con una breve sopravvivenza. Questi studi stanno dimostrando che il silenziamento epigenetico mediato dalla ipermetilazione del promotore è un evento frequente nei MPM.

Altri studi si sono focalizzati sui miRNA coinvolti nello sviluppo del MPM. Guled e collaboratori hanno identificato un numero di miRNAs che risultano differenzialmente espressi tra MPM e il pericardio normale (118).

In modelli *in vitro*, Pass e collaboratori hanno riportato che il *miR-29c-5p* può agire come un onco-soppressore nei MPM e quindi essere un potenziale target terapeutico (119). Diversi approcci terapeutici che hanno come bersaglio i miRNA hanno raggiunto la validazione clinica. Per esempio il *miR-16* è coinvolto nella fase I di uno studio clinico randomizzato denominato MesomiR 1. Il trial

si basa sul lavoro di Reid e collaboratori che hanno dimostrato come la down-regolazione del *miR-15-* e del *miR-16* nei tessuti di MPM e nelle linee cellulari correla con aumentati livelli di espressione dei geni *CCND1* e *Bcl-2* (120). Quando si interviene geneticamente ristabilendo l'espressione dei corretti livelli di questi miRNA, la crescita cellulare è inibita e le cellule ritrovano la sensibilità alla gemcitabina e al pemetrexed. Nei MPM il *miR-16* è anche un regolatore del gene *PD-L1* (dall'inglese *Programmed Cell Death Ligand 1*) e sue alterazioni potrebbero contribuire ai meccanismi di evasione dal controllo del sistema immunitario (120).

Nei MPM, il *miR-34b/c* e il *miR-126* sono regolati dalla metilazione e dallo stress ossidativo (121, 122). Diversi studi hanno dimostrato che il *miR-34b/c* è un regolatore degli oncogeni *C-MET* e di *BCL-2* e la sua down-regolazione promuove la trasformazione delle cellule mesoteliali (122-124). Studi *in vivo* hanno dimostrato che durante lo stress ossidativo, il *miR-126* compromette la funzione mitocondriale, induce autofagia alterando il metabolismo cellulare e inibisce la crescita delle cellule e la formazione del tumore dimostrando che l'aumentata autofagia ha un ruolo protettivo nei MPM (121, 125).

L'identificazione dei targets dei miRNA ha una rilevanza fondamentale per comprendere come queste piccole molecole di RNA non codificante regolino la funzione delle cellule di MPM. Un approccio recente ha dimostrato che il *miR-21-5p* è un regolatore della mesotelina (nota con il termine, *MSLN*) (126). L'aumentata espressione di *miR-21-5p* riduce l'espressione di *MSLN* e inibisce la proliferazione delle cellule di MPM svelando un nuovo miRNA con attività onco-soppressiva nel MPM.

Un singolo miRNA può regolare molteplici geni, e un solo gene può essere il bersaglio di molteplici miRNA. Il gene *MCL-1* è over-espresso nei MPM ed è associato alla resistenza, all'induzione di apoptosi e alla chemioterapia (127). Khodayari et al. hanno dimostrato che la transfezione delle cellule di MPM con *miR-302b* riduce l'espressione di *MCL-1*, rallenta la crescita cellulare e tumorale attivando l'apoptosi (128). La stessa attività antitumorale è stata dimostrata per il *miR-193a-3p* suggerendo che la terapia mirata a ri-esprimere i livelli dei miRNAs che hanno come bersaglio *MCL-1* potrebbe essere una valida opzione terapeutica per i MPM (129).

4.6 L'epigenetica come possibile marcatore diagnostico

I marcatori epigenetici sono spesso stati considerati dei potenziali biomarcatori per la diagnosi precoce e la prognosi in oncologia (130).

La metilazione del DNA è un evento stabile ma può cambiare nel tempo (131), e può essere modificata da diversi fattori durante il corso della vita (132) come lo stile di vita, l'esposizione ai fenomeni ambientali, l'invecchiamento e le condizioni patologiche (133, 134). Lo stato di metilazione del DNA di ogni individuo è pertanto considerato come un fenomeno adattativo che potenzialmente lega i fattori ambientali con lo sviluppo dei fenotipi patologici (135). L'alterazione nello stato di metilazione del DNA è un evento precoce nel processo di sviluppo della neoplasia ed è stato considerato come uno strumento per fare diagnosi precoce e prognosi (136, 137) anche nei MPM (138).

Sebbene lo stato di metilazione del DNA sia stato già ampiamente studiato nei MPM, sono ancora pochi i lavori scientifici che hanno analizzato la relazione tra MPM e lo stato di metilazione del DNA nel sangue .

In uno studio focalizzato sull'analisi del DNA libero nel siero di pazienti affetti da mesotelioma, Fischer e collaboratori hanno analizzato il profilo di metilazione della regione promotoriale di nove geni la cui espressione era stata vista modificata epigeneticamente nei tessuti di MPM e nelle linee cellulari. Nel lavoro, gli autori riportano una marcata iper-metilazione del promotore del gene *FHIT* e del gene che codifica per la E-caderina e in misura minore per i geni: *ACPIA*, *RASSF1A* e *DARK*. Valori di metilazione intermedi sono stati riportati per i geni *CDKN2A*, *APC1*, *ARF* e *RARβ* (139). Nello stesso studio sono stati anche correlati i livelli di metilazione dei geni *DAPK*, *RASSF1A* e

RARβ con la sopravvivenza. L'effetto è stato visto prendendo in esame solo la combinazione di geni e non i valori dei singoli geni.

Uno studio recente ha messo in correlazione per la prima volta i livelli globali di metilazione del DNA nelle cellule del sangue periferico. Scopo dello studio era di valutare la potenzialità dei profili di metilazione del DNA ematici per discriminare i casi di MPM da quelli di individui sani mai esposti all'amianto (140). Gli autori riportano una significativa differenza nel profilo di metilazione del DNA (>800 isole CpG) tra i casi di MPM e i controlli, con una consistente ipo-metilazione del DNA nei casi con diagnosi di MPM. Inoltre, quando sono stati analizzati i dati sulla metilazione del DNA insieme a quelli relativi all'esposizione all'amianto vs la sola esposizione all'amianto, è emerso che un piccolo pannello di sette diverse regioni CpG stratificava meglio i casi di MPM rispetto ai controlli (AUC=0,81 vs AUC=0,89).

Anche l'analisi dei livelli di espressione dei miRNA è un potenziale candidato per lo sviluppo di nuovi approcci non invasivi per la diagnosi precoce o come bersaglio terapeutico (141, 142). Alcuni profili di espressione dei miRNA sono stati proposti come biomarcatori diagnostici/prognostici per i MPM (143-146).

Alterazioni nei profili di espressione dei miRNA sono state descritte sia nei tessuti che nei fluidi biologici (145, 146). In uno studio pilota, Weber e collaboratori hanno identificato alterati livelli di espressione del *miR103a-3p* nelle cellule del sangue periferico come un possibile marcatore per discriminare pazienti con mesotelioma dai controlli esposti all'amianto e dalla popolazione generale. L'uso del *miR-103a3p* aumenta il potere discriminatorio della mesotelina sierica. Quando questi due biomarcatori sono combinati, si raggiunge una sensibilità del 95% e una specificità dell'81% (147). Anche recentemente, in uno studio pubblicato da Cavalleri e collaboratori, è stata confermata la validità del *miR-103a-3p* come biomarcatore nel MPM.

Una *signature* basata sulla espressione di *miR-103a-3p/miR-30e-3p* ottenuta nelle vescicole extracellulari presenti nel plasma è in grado di discriminare pazienti con MPM da individui sani che hanno avuto una precedente esposizione all'amianto, con una sensibilità del 95,5% e una specificità del 80% (148). Mentre vi sono oggi dati concordi che l'espressione del *miR-103a-3p* possa essere un possibile biomarcatore, molti altri studi che hanno identificato nel plasma/siero difetti di espressione in altri miRNA, hanno conseguito risultati contrastanti e inconclusivi.

I membri della famiglia dei *miR-200* sono stati proposti come possibili candidati per discriminare i pazienti con MPM da quelli con tumore al polmone (144,145, 149, 150). In un lavoro pubblicato da Gee e collaboratori è stato riportato che la down-regolazione di alcuni miRNA sono dei potenziali biomarcatori in grado di distinguere i pazienti con MPM da quelli con diagnosi di adenocarcinoma al polmone (149).

Nel lavoro di Benjamin e collaboratori è stato identificato un pannello di tre miRNA (*miR-193-3p*, *miR-200c*, *miR-192*) in grado di discriminare con una sensibilità del 100% e una specificità del 94%, pazienti con MPM da quelli con carcinoma di origine epiteliale che invade la pleura (145, 150). Un'alta accuratezza diagnostica era stata anche raggiunta con un pannello di quattro miRNA (*miR-126*, *miR-143*, *miR-145*, *miR-652*) che risultavano dal punto di vista statistico significativamente down-regolati nei MPM rispetto alle pleure non neoplastiche (151).

Utilizzando un approccio di PCR array customizzato, Santarelli e collaboratori hanno quantificato in dieci campioni di MPM e in un campione di tessuto mesoteliale sano, i livelli di espressione di 88 miRNAs associati ai tumori, (146). Lo studio ha identificato tre miRNA (*miR-335*, *miR-126*, *miR-32*) come differenzialmente espressi, ma solo il *miR-126* è stato successivamente confermato come differenzialmente espresso in una seconda coorte costituita da 27 campioni di cui era disponibile sia il tessuto di MPM conservato in FFPE che le corrispondenti pleure sane. I limiti di questi studi erano dovuti ai pochi miRNA analizzati e ai diversi metodi usati per preservare i campioni biotici (RNA later nella fase di "discovery" e FFPE per la fase di replicazione).

La down-regolazione del *miR-126* è anche un fattore prognostico significativo associato alla scarsa sopravvivenza (152). Andersen e collaboratori, hanno dimostrato una down-regolazione, dovuta ad un meccanismo epigenetico, del *miR-126* e di *EGFL7* il gene su cui questo miRNA viene codificato. Nel istotipo epitelioide, lo spegnimento del gene *EGFL7* è associato ad un decorso clinico infausto (152). La comprensione del meccanismo di ipermetilazione del DNA del gene *EGFL7* e del *miR-126* può suggerire potenziali nuove strategie terapeutiche.

Il primo studio che ha suggerito che i miRNA potessero essere utilizzati per predire la sopravvivenza ha identificato il *miRNA-29c-5p* come un fattore prognostico indipendente per monitorare il tempo della progressione della malattia (119). Uno studio condotto da Pass e collaboratori su 52 biopsie di MPM ha identificato alterazioni nei livelli di espressione di *let-7c-5p* e *miR-151a-5p* come una possibile *signature* prognostica (119).

4.7 Conclusioni e prospettive future

L'identificazione delle mutazioni *drivers* nel MPM è un prerequisito fondamentale per una medicina di precisione, anche se non sono attesi risultati a breve termine. La presenza di mutazioni germinali in geni oncosoppressori può essere utile per identificare i geni *drivers* e pianificare nuove strategie terapeutiche. La famiglia dei miRNAs rappresenta un'ottima attrattiva terapeutica per via delle sue pleiotropiche funzioni regolatorie. Infine lo studio nel sangue periferico dei diversi profili epigenetici, ossia analisi dei miRNA e dei livelli di metilazione del DNA, potrebbe essere un ottimo strumento per monitorare nel tempo la salute delle persone esposte all'amianto.

Referenze

1. Pfeifer GP. Environmental exposures and mutational patterns of cancer genomes. *Genome Med.* 2010;2:54.
2. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 2013;500:415–21.
3. Ferrante D, Mirabelli D, Tunesi S, Terracini B, Magnani C. Pleural mesothelioma and occupational and non-occupational asbestos exposure: a case-control study with quantitative risk assessment. *Occup Environ Med.* 2016;73:147–53.
4. Hodgson JT, Darnton A. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Ann Occup Hyg.* 2000;44:565–601.
5. Ugolini D, Neri M, Ceppi M, Cesario A, Dianzani I, Filiberti R, et al. Genetic susceptibility to malignant mesothelioma and exposure to asbestos: the influence of the familial factor. *Mutat Res.* 2008;658:162–71.
6. Sud A, Kinnersley B, Houlston RS. Genomewide association studies of cancer: current insights and future perspectives. *Nat Rev Cancer.* 2017;17:692–704.
7. Matullo G, Guarrera S, Betti M, Fiorito G, Ferrante D, Voglino F, et al. Genetic variants associated with increased risk of malignant pleural mesothelioma: a genome-wide association study. *PLoS One.* 2013;8:e61253.
8. Cadby G, Mukherjee S, Musk AWB, Reid A, Garlepp M, Dick I, et al. A genome-wide association study for malignant mesothelioma risk. *Lung Cancer.* 2013;82:1–8.
9. Nasu M, Emi M, Pastorino S, Tanji M, Powers A, Luk H, et al. High incidence of somatic BAP1 alterations in sporadic malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2015;10:565–76.
10. Pilarski R, Rai K, Cebulla C, Abdel-Rahman M. BAP1 tumor predisposition syndrome. Seattle: University of Washington; 2016.
11. Carbone M, Ferris LK, Baumann F, Napolitano A, Lum CA, Flores EG, et al. BAP1 cancer syndrome: malignant mesothelioma, uveal and cutaneous melanoma, and MBAITs. *J Transl Med.* 2012;10:179.
12. Njauw C-NJ, Kim I, Piris A, Gabree M, Taylor M, Lane AM, et al. Germline BAP1 inactivation is preferentially associated with metastatic ocular melanoma and cutaneous-ocular melanoma families. *PLoS One.* 2012;7:e35295.
13. Baumann F, Flores E, Napolitano A, Kanodia S, Taioli E, Pass H, et al. Mesothelioma patients with germline BAP1 mutations have 7-fold improved long-term survival. *Carcinogenesis.* 2015;36:76–81.
14. Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet.* 2011;43:1022–5.
15. Haugh AM, Njauw C-N, Bubley JA, Verzi AE, Zhang B, Kudalkar E, et al. Genotypic and phenotypic features of BAP1 Cancer syndrome: a report of 8 new families and review of cases in the literature. *JAMA Dermatol.* 2017;153:999–1006.
16. Rai K, Pilarski R, Boru G, Rehman M, Saqr AH, Massengill JB, et al. Germline BAP1 alterations in familial uveal melanoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2017;56:168–74.

17. O'Shea SJ, Robles-Espinoza CD, McLellan L, Harrigan J, Jacq X, Hewinson J, et al. A populationbased analysis of germline BAP1 mutations in melanoma. *Hum Mol Genet.* 2017;26:717–28.
18. Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Cebulla CM, Massengill JB, Christopher BN, Boru G, et al. Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. *J Med Genet.* 2011;48:856–9.
19. Wadt K, Choi J, Chung J-Y, Kiilgaard J, Heegaard S, Drzewiecki KT, et al. A cryptic BAP1 splice mutation in a family with uveal and cutaneous melanoma, and paraganglioma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2012;25:815–8.
20. Wiesner T, Fried I, Ulz P, Stacher E, Popper H, Murali R, et al. Toward an improved definition of the tumor spectrum associated with BAP1 germline mutations. *J Clin Oncol.* 2012;30:e337–40.
21. Popova T, Hebert L, Jacquemin V, Gad S, Caux- Moncoutier V, Dubois-d'Enghien C, et al. Germline BAP1 mutations predispose to renal cell carcinomas. *Am J Hum Genet.* 2013;92:974–80.
22. Pilarski R, Cebulla CM, Massengill JB, Rai K, Rich T, Strong L, et al. Expanding the clinical phenotype of hereditary BAP1 cancer predisposition syndrome, reporting three new cases. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014;53:177–82.
23. Betti M, Casalone E, Ferrante D, Romanelli A, Grosso F, Guarrera S, et al. Inference on germline BAP1 mutations and asbestos exposure from the analysis of familial and sporadic mesothelioma in a high-risk area. *Genes Chromosomes Cancer.* 2015;54:51–62.
24. Rai K, Pilarski R, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH. Comprehensive review of BAP1 tumor predisposition syndrome with report of two new cases. *Clin Genet.* 2016;89:285–94.
25. Cheung M, Kadariya Y, Talarchek J, Pei J, Ohar JA, Kayaleh OR, et al. Germline BAP1 mutation in a family with high incidence of multiple primary cancers and a potential gene-environment interaction. *Cancer Lett.* 2015;369:261–5.
26. Ohar JA, Cheung M, Talarchek J, Howard SE, Howard TD, Hesdorffer M, et al. Germline BAP1 mutational landscape of Asbestos-exposed malignant mesothelioma patients with family history of Cancer. *Cancer Res.* 2016;76:206–15.
27. Abdel-Rahman MH, Rai K, Pilarski R, Davidorf FH, Cebulla CM. Germline BAP1 mutations misreported as somatic based on tumor-only testing. *Familial Cancer.* 2016;15:327–30.
28. Ribeiro C, Campelos S, Moura CS, Machado JC, Justino A, Parente B. Well-differentiated papillary mesothelioma: clustering in a Portuguese family with a germline BAP1 mutation. *Ann Oncol.* 2013;24:2147–50.
29. Cheung M, Talarchek J, Schindeler K, Saraiva E, Penney LS, Ludman M, et al. Further evidence for germline BAP1 mutations predisposing to melanoma and malignant mesothelioma. *Cancer Genet.* 2013;206:206–10.
30. Turunen JA, Markkinen S, Wilska R, Saarinen S, Raivio V, Täll M, et al. BAP1 germline mutations in finnish patients with uveal melanoma. *Ophthalmology.* 2016;123:1112–7.
31. Betti M, Aspesi A, Ferrante D, Sculco M, Righi L, Mirabelli D, et al. Sensitivity to asbestos is increased in patients with mesothelioma and pathogenic germline variants in BAP1 or other DNA repair genes. *Genes Chromosomes Cancer.* 2018;57(11):573–83.
32. Betti M, Aspesi A, Biasi A, Casalone E, Ferrante D, Ogliara P, et al. CDKN2A and BAP1 germline mutations predispose to melanoma and mesothelioma. *Cancer Lett.* 2016;378:120–30.
33. Harbour JW, Onken MD, Roberson EDO, Duan S, Cao L, Worley LA, et al. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science.* 2010;330:1410–3.
34. Höiom V, Edsgård D, Helgadottir H, Eriksson H, All-Ericsson C, Tuominen R, et al. Hereditary uveal melanoma: a report of a germline mutation in BAP1. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013;52:378–84.
35. Busam KJ, Wanna M, Wiesner T. Multiple epithelioid spitz nevi or tumors with loss of BAP1 expression. *JAMA Dermatol.* 2013;149:335.
36. Gupta MP, Lane AM, DeAngelis MM, Mayne K, Crabtree M, Gragoudas ES, et al. Clinical characteristics of uveal melanoma in patients with germline BAP1 mutations. *JAMA Ophthalmol.* 2015;133:881–7.
37. Gerami P, Yélamos O, Lee CY, Obregon R, Yazdan P, Sholl LM, et al. Multiple cutaneous melanomas and clinically atypical moles in a patient with a novel germline BAP1 mutation. *JAMA Dermatol.* 2015;151:1235–9.
38. de la Fouchardière A, Cabaret O, Savin L, Combemale P, Schwartz H, Penet C, et al. Germline BAP1 mutations predispose also to multiple basal cell carcinomas. *Clin Genet.* 2015;88:273–7.
39. Rusch A, Ziltener G, Nackaerts K, Weder W, Stahel RA, Felley-Bosco E. Prevalence of BRCA-1 associated protein 1 germline mutation in sporadic malignant pleural mesothelioma cases. *Lung Cancer.* 2015;87:77–9.
40. Sneddon S, Leon JS, Dick IM, Cadby G, Olsen N, Brims F, et al. Absence of germline mutations in BAP1 in sporadic cases of malignant mesothelioma. *Gene.* 2015;563:103–5.
41. Wadt KAW, Aoude LG, Johansson P, Solinas A, Pritchard A, Crainic O, et al. A recurrent germline BAP1 mutation and extension of the BAP1 tumor predisposition spectrum to include basal cell carcinoma. *Clin Genet.* 2015;88:267–72.
42. Aoude LG, Wadt K, Bojesen A, Crüger D, Borg A, Trent JM, et al. A BAP1 mutation in a Danish family predisposes to uveal melanoma and other cancers. *PLoS One.* 2013;8:e72144.
43. McDonnell KJ, Gallanis GT, Heller KA, Melas M, Idos GE, Culver JO, et al. A novel BAP1 mutation is associated with melanocytic neoplasms and thyroid cancer. *Cancer Genet.* 2016;209:75–81.
44. White AE, Harper JW. Cancer. Emerging anatomy of the BAP1 tumor suppressor system. *Science.* 2012;337:1463–4.

45. Daou S, Hammond-Martel I, Mashtalir N, Barbour H, Gagnon J, Iannantuono NVG, et al. The BAP1/ASXL2 histone H2A deubiquitinase complex regulates cell proliferation and is disrupted in cancer. *J Biol Chem.* 2015;290:28643–63.
46. Yu H, Pak H, Hammond-Martel I, Ghram M, Rodrigue A, Daou S, et al. Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111:285–90.
47. Ji Z, Mohammed H, Webber A, Ridsdale J, Han N, Carroll JS, et al. The forkhead transcription factor FOXK2 acts as a chromatin targeting factor for the BAP1-containing histone deubiquitinase complex. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:6232–42.
48. Bononi A, Yang H, Giorgi C, Patergnani S, Pellegrini L, Su M, et al. Germline BAP1 mutations induce a Warburg effect. *Cell Death Differ.* 2017;24:1694–704.
49. Ismail IH, Davidson R, Gagné J-P, Xu ZZ, Poirier GG, Hendzel MJ. Germline mutations in BAP1 impair its function in DNA double-strand break repair. *Cancer Res.* 2014;74:4282–94.
50. Napolitano A, Pellegrini L, Dey A, Larson D, Tanji M, Flores EG, et al. Minimal asbestos exposure in germline BAP1 heterozygous mice is associated with deregulated inflammatory response and increased risk of mesothelioma. *Oncogene.* 2016;35:1996–2002.
51. Xu J, Kadariya Y, Cheung M, Pei J, Talarchek J, Sementino E, et al. Germline mutation of Bap1 accelerates development of asbestos-induced malignant mesothelioma. *Cancer Res.* 2014;74:4388–97.
52. Betti M, Aspesi A, Sculco M, Matullo G, Magnani C, Dianzani I. Genetic predisposition for malignant mesothelioma: a concise review. *Mutat Res.* 2019;781:1–10.
53. Betti M, Casalone E, Ferrante D, Aspesi A, Morleo G, Biasi A, et al. Germline mutations in DNA repair genes predispose asbestos-exposed patients to malignant pleural mesothelioma. *Cancer Lett.* 2017;405:38–45.
54. Aoude LG, Wadt KAW, Pritchard AL, Hayward NK. Genetics of familial melanoma: 20 years after *CDKN2A*. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28:148–60.
55. Guo G, Chmielecki J, Goparaju C, Heguy A, Dolgalev I, Carbone M, et al. Whole-exome sequencing reveals frequent genetic alterations in BAP1, NF2, CDKN2A, and CUL1 in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res.* 2015;75:264–9.
56. De Rienzo A, Archer MA, Yeap BY, Dao N, Sciaranghella D, Sideris AC, et al. Gender-specific molecular and clinical features underlie malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res.* 2016;76:319–28.
57. Vanni I, Coco S, Bonfiglio S, Cittaro D, Genova C, Biello F, et al. Whole exome sequencing of independent lung adenocarcinoma, lung squamous cell carcinoma, and malignant peritoneal mesothelioma. *Medicine (Baltimore).* 2016;95:e5447.
58. Sheffield BS, Tinker AV, Shen Y, Hwang H, Li-Chang HH, Pleasance E, et al. Personalized oncogenomics: clinical experience with malignant peritoneal mesothelioma using whole genome sequencing. *PLoS One.* 2015;10:e0119689.
59. Alakus H, Yost SE, Woo B, French R, Lin GY, Jepsen K, et al. BAP1 mutation is a frequent somatic event in peritoneal malignant mesothelioma. *J Transl Med.* 2015;13:122.
60. Carbone M, Gaudino G, Yang H. Recent insights emerging from malignant mesothelioma genome sequencing. *J Thorac Oncol.* 2015;10:409–11.
61. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-associated hereditary breast and ovarian cancer. Seattle: University of Washington; 2016.
62. Kraemer KH, DiGiovanna JJ. Xeroderma pigmentosum. Seattle: University of Washington; 2016.
63. Peltomäki P. Lynch syndrome genes. *Familial Cancer.* 2005;4:227–32.
64. Wang Y, Zhou X, Song Y, Ji X, Zhang A, Zhang G, et al. The mismatch repair gene hPMS1 (human postmeiotic segregation 1) is down regulated in oral squamous cell carcinoma. *Gene.* 2013;524:28–34.
65. Mehta PA, Tolar J. Fanconi Anemia. Seattle: University of Washington; 2018.
66. Ceelen WP, Van Dalen T, Van Bockstal M, Libbrecht L, Sijmons RH. Malignant peritoneal mesothelioma in a patient with Li-Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol.* 2011;29:e503–5.
67. Baser ME, Rai H, Wallace AJ, Evans DGR. Neurofibromatosis 2 (NF2) and malignant mesothelioma in a man with a constitutional NF2 missense mutation. *Familial Cancer.* 2005;4:321–2.
68. Lo Iacono M, Monica V, Righi L, Grosso F, Libener R, Vatrano S, et al. Targeted next generation sequencing of cancer genes in advanced stage malignant pleural mesothelioma: a retrospective study. *J Thorac Oncol.* 2015;10:492–9.
69. Bueno R, Stawiski EW, Goldstein LD, Durinck S, De Rienzo A, Modrusan Z, et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet.* 2016;48:407–16.
70. Panou V, Gadiraju M, Wolin A, Weipert CM, Skarda E, Husain AN, et al. Frequency of germline mutations in cancer susceptibility genes in malignant mesothelioma. *J Clin Oncol.* 2018;36:2863–71.
71. Robinson DR, Wu Y-M, Lonigro RJ, Vats P, Cobain E, Everett J, et al. Integrative clinical genomics of metastatic cancer. *Nature.* 2017;548:297–303.
72. Martincorena I, Raine KM, Gerstung M, Dawson KJ, Haase K, Van Loo P, et al. Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues. *Cell.* 2017;171:1029–1041.e21.
73. Lee WC, Testa JR. Somatic genetic alterations in human malignant mesothelioma (review). *Int J Oncol.* 1999;14:181–8.

74. Bott M, Brevet M, Taylor BS, Shimizu S, Ito T, Wang L, et al. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet.* 2011;43:668–72.
75. Borczuk AC, Pei J, Taub RN, Levy B, Nahum O, Chen J, et al. Genome-wide analysis of abdominal and pleural malignant mesothelioma with DNA arrays reveals both common and distinct regions of copy number alteration. *Cancer Biol Ther.* 2016;17:328–35.
76. Sneddon S, Dick I, Lee YCG, Musk AWB, Patch A-M, Pearson JV, et al. Malignant cells from pleural fluids in malignant mesothelioma patients reveal novel mutations. *Lung Cancer.* 2018;119:64–70.
77. Hylebos M, Van Camp G, Vandeweyer G, Franssen E, Beyens M, Cornelissen R, et al. Large-scale copy number analysis reveals variations in genes not previously associated with malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget.* 2017;8:113673–86.
78. Ugurluer G, Chang K, Gamez ME, Arnett AL, Jayakrishnan R, Miller RC, et al. Genome-based mutational analysis by next generation sequencing in patients with malignant pleural and peritoneal mesothelioma. *Anticancer Res.* 2016;36:2331–8.
79. Kim JE, Kim D, Hong YS, Kim K-P, Yoon YK, Lee DH, et al. Mutational profiling of malignant mesothelioma revealed potential therapeutic targets in EGFR and NRAS. *Transl Oncol.* 2018;11:268–74.
80. Bueno R, De Rienzo A, Dong L, Gordon GJ, Hercus CF, Richards WG, et al. Second generation sequencing of the mesothelioma tumor genome. *PLoS One.* 2010;5:e10612.
81. Tallet A, Nault J-C, Renier A, Hysi I, Galateau-Sallé F, Cazes A, et al. Overexpression and promoter mutation of the TERT gene in malignant pleural mesothelioma. *Oncogene.* 2014;33:3748–52.
82. Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, Emi M, Morinaga T, Fukuoka K, et al. Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. *Cancer Sci.* 2012;103:868–74.
83. Zauderer MG, Bott M, McMillan R, Sima CS, Rusch V, Krug LM, et al. Clinical characteristics of patients with malignant pleural mesothelioma harboring somatic BAP1 mutations. *J Thorac Oncol.* 2013;8:1430–3.
84. Tranchant R, Quétel L, Tallet A, Meiller C, Renier A, de Koning L, et al. Co-occurring mutations of tumor suppressor genes, LATS2 and NF2, in malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2017;23:3191–202.
85. Kiyotani K, Park J-H, Inoue H, Husain A, Olugbile S, Zewde M, et al. Integrated analysis of somatic mutations and immune microenvironment in malignant pleural mesothelioma. *Oncoimmunology.* 2017;6:e1278330.
86. Comertpay S, Pastorino S, Tanji M, Mezzapelle R, Strianese O, Napolitano A, et al. Evaluation of clonal origin of malignant mesothelioma. *J Transl Med.* 2014;12:301.
87. Zhang S, Zhang Q, Sun Q, Tang J, Chen J, Ji N, et al. Genome evolution analysis of recurrent testicular malignant mesothelioma by whole-genome sequencing. *Cell Physiol Biochem.* 2018;45:163–74.
88. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Campbell PJ, Stratton MR. Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer. *Cell Rep.* 2013;3:246–59.
89. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell.* 2012;149:979–93.
90. Yap TA, Aerts JG, Popat S, Fennell DA. Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat Rev Cancer.* 2017;17:475–88.
91. McCambridge AJ, Napolitano A, Mansfield AS, Fennell DA, Sekido Y, Nowak AK, et al. Progress in the management of malignant pleural mesothelioma in 2017. *J Thorac Oncol.* 2018;13:606–23.
92. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med.* 2009;361:123–34.
93. Swisher EM, Lin KK, Oza AM, Scott CL, Giordano H, Sun J, et al. Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2017;18:75–87.
94. Lord CJ, Ashworth A. PARP inhibitors: synthetic lethality in the clinic. *Science.* 2017;355:1152–8.
95. Brown JS, O’Carrigan B, Jackson SP, Yap TA. Targeting DNA repair in cancer: beyond PARP inhibitors. *Cancer Discov.* 2017;7:20–37.
96. Ohmoto A, Yachida S. Current status of poly(ADPribose) polymerase inhibitors and future directions. *Onco Targets Ther.* 2017;10:5195–208.
97. Jin B, Li Y, Robertson KD. DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer.* 2011;2:607–17.
98. Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, et al. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature.* 2009;462:315–22.
99. Deaton AM, Bird A. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* 2011;25:1010–22.
100. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancerinducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:629–56.
101. Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010;28:1057–68.
102. Macfarlane L-A, Murphy PR. MicroRNA: biogenesis, function and role in cancer. *Curr Genomics.* 2010;11:537–61.
103. Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A: miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer. *Cancer Biol Ther.* 2014;15:1444–55.
104. Hata A, Kashima R. Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2016;51:121–34.

105. Melo SA, Esteller M. Disruption of microRNA nuclear transport in human cancer. *Semin Cancer Biol.* 2014;27:46–51.
106. Steer CJ, Subramanian S. Circulating microRNAs as biomarkers: a new frontier in diagnostics. *Liver Transpl.* 2012;18:265–9.
107. Allegra A, Alonci A, Campo S, Penna G, Petrunaro A, Gerace D, et al. Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *Int J Oncol.* 2012;41:1897–912.
108. Wu W, Sun M, Zou G-M, Chen J. MicroRNA and cancer: current status and prospective. *Int J Cancer.* 2007;120:953–60.
109. Tutar L, Tutar E, Özgür A, Tutar Y. Therapeutic targeting of microRNAs in cancer: future perspectives. *Drug Dev Res.* 2015;76:382–8.
110. Casalone E, Allione A, Viberti C, Pardini B, Guarrera S, Betti M, et al. DNA methylation profiling of asbesto-treated MeT5A cell line reveals novel pathways implicated in asbestos response. *Arch Toxicol.* 2018;92(5):1785–95.
111. Christensen BC, Godleski JJ, Marsit CJ, Houseman EA, Lopez-Fagundo CY, Longacker JL, et al. Asbestos exposure predicts cell cycle control gene promoter methylation in pleural mesothelioma. *Carcinogenesis.* 2008;29:1555–9.
112. Kobayashi N, Toyooka S, Yanai H, Soh J, Fujimoto N, Yamamoto H, et al. Frequent p16 inactivation by homozygous deletion or methylation is associated with a poor prognosis in Japanese patients with pleural mesothelioma. *Lung Cancer.* 2008;62:120–5.
113. Goto Y, Shinjo K, Kondo Y, Shen L, Toyota M, Suzuki H, et al. Epigenetic profiles distinguish malignant pleural mesothelioma from lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2009;69:9073–82.
114. Christensen BC, Houseman EA, Godleski JJ, Marsit CJ, Longacker JL, Roelofs CR, et al. Epigenetic profiles distinguish pleural mesothelioma from normal pleura and predict lung asbestos burden and clinical outcome. *Cancer Res.* 2009;69:227–34.
115. Kohno H, Amatya VJ, Takeshima Y, Kushitani K, Hattori N, Kohno N, et al. Aberrant promoter methylation of WIF-1 and SFRP1, 2, 4 genes in mesothelioma. *Oncol Rep.* 2010;24:423–31.
116. Tsou JA, Galler JS, Wali A, Ye W, Siegmund KD, Groshen S, et al. DNA methylation profile of 28 potential marker loci in malignant mesothelioma. *Lung Cancer.* 2007;58:220–30.
117. Cheng YY, Kirschner MB, Cheng NC, Gattasi S, Klebe S, Edelman JJB, et al. ZIC1 is silenced and has tumor suppressor function in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2013;8:1317–28.
118. Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I, Nicholson AG, et al. CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma -A miRNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009;48:615–23.
119. Pass HI, Goparaju C, Ivanov S, Donington J, Carbone M, Hoshen M, et al. hsa-miR-29c* is linked to the prognosis of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res.* 2010;70:1916–24.
120. Reid G, Pel ME, Kirschner MB, Cheng YY, Mugridge N, Weiss J, et al. Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol.* 2013;24:3128–35.
121. Tomasetti M, Nocchi L, Staffolani S, Manzella N, Amati M, Goodwin J, et al. MicroRNA-126 suppresses mesothelioma malignancy by targeting IRS1 and interfering with the mitochondrial function. *Antioxid Redox Signal.* 2014;21:2109–25.
122. Kubo T, Toyooka S, Tsukuda K, Sakaguchi M, Fukazawa T, Soh J, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c plays an important role in the pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2011;17:4965–74.
123. Tanaka N, Toyooka S, Soh J, Tsukuda K, Shien K, Furukawa M, et al. Downregulation of microRNA-34 induces cell proliferation and invasion of human mesothelial cells. *Oncol Rep.* 2013;29:2169–74.
124. Maki Y, Asano H, Toyooka S, Soh J, Kubo T, Katsui K, et al. MicroRNA miR-34b/c enhances cellular radiosensitivity of malignant pleural mesothelioma cells. *Anticancer Res.* 2012;32:4871–5.
125. Tomasetti M, Monaco F, Manzella N, Rohlena J, Rohlenova K, Staffolani S, et al. MicroRNA-126 induces autophagy by altering cell metabolism in malignant mesothelioma. *Oncotarget.* 2016;7:36338–52.
126. Vencken S, Hassan T, McElvaney NG, Smith SGJ, Greene CM: miR-CATCH: microRNA capture affinity technology. *Methods Mol Biol.* 2015;1218:365–73.
127. Soini Y, Kinnula V, Kaarteenaho-Wiik R, Kurttila E, Linnainmaa K, Pääkkö P. Apoptosis and expression of apoptosis regulating proteins bcl-2, mcl-1, bcl-X, and bax in malignant mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 1999;5:3508–15.
128. Khodayari N, Mohammed KA, Lee H, Kaye F, Nasreen N. MicroRNA-302b targets Mcl-1 and inhibits cell proliferation and induces apoptosis in malignant pleural mesothelioma cells. *Am J Cancer Res.* 2016;6:1996–2009.
129. Williams M, Kirschner MB, Cheng YY, Hanh J, Weiss J, Mugridge N, et al. miR-193a-3p is a potential tumor suppressor in malignant pleural mesothelioma. *Oncotarget.* 2015;6:23480–95.
130. Yang X, Dai W, Kwong DL, Szeto CYY, Wong EH, Ng WT, et al. Epigenetic markers for noninvasive early detection of nasopharyngeal carcinoma by methylation-sensitive high resolution melting. *Int J Cancer.* 2015;136:E127–35.
131. Bjornsson HT, Sigurdsson MI, Fallin MD, Irizarry RA, Aspelund T, Cui H, et al. Intra-individual change over time in DNA methylation with familial clustering. *JAMA.* 2008;299:2877–83.

132. Christensen BC, Houseman EA, Marsit CJ, Zheng S, Wrensch MR, Wiemels JL, et al. Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet.* 2009;5:e1000602.
133. Kanherkar RR, Bhatia-Dey N, Csoka AB. Epigenetics across the human lifespan. *Front Cell Dev Biol.* 2014;2:49.
134. Bell CG, Beck S. The epigenomic interface between genome and environment in common complex diseases. *Brief Funct Genomics.* 2010;9:477–85.
135. Marsit CJ. Influence of environmental exposure on human epigenetic regulation. *J Exp Biol.* 2015;218:71–9.
136. Shivapurkar N, Gazdar AF. DNA methylation based biomarkers in non-invasive cancer screening. *Curr Mol Med.* 2010;10:123–32.
137. Dong Y, Zhao H, Li H, Li X, Yang S. DNA methylation as an early diagnostic marker of cancer (review). *Biomed Rep.* 2014;2:326–30.
138. Vandermeers F, Neelature Sriramareddy S, Costa C, Hubaux R, Cosse J-P, Willems L. The role of epigenetics in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer.* 2013;81:311–8.
139. Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, Zemaitis M, Stoffregen C, Kostrzewa M, et al. Promoter methylation of RASSF1A, RARBeta and DAPK predict poor prognosis of patients with malignant mesothelioma. *Lung Cancer.* 2006;54:109–16.
140. Guarrera S, Viberti C, Cugliari G, Allione A, Casalone E, Betti M, et al. Peripheral blood DNA methylation as potential biomarker of malignant pleural mesothelioma in asbestos-exposed subjects. *J Thorac Oncol.* 2019;14:527–39.
141. Bolha L, Ravnik-Glavač M, Glavač D. Circular RNAs: biogenesis, function, and a role as possible cancer biomarkers. *Int J Genomics.* 2017;2017:6218353.
142. Di Leva G, Garofalo M, Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol.* 2014;9:287–314.
143. Ramírez-Salazar EG, Salinas-Silva LC, Vázquez-Manríquez ME, Gayosso-Gómez LV, Negrete-García MC, Ramírez-Rodríguez SL, et al. Analysis of microRNA expression signatures in malignant pleural mesothelioma, pleural inflammation, and atypical mesothelial hyperplasia reveals common predictive tumorigenesis-related targets. *Exp Mol Pathol.* 2014;97:375–85.
144. Birnie KA, Prêle CM, Thompson PJ, Badrian B, Mutsaers SE. Targeting microRNA to improve diagnostic and therapeutic approaches for malignant mesothelioma. *Oncotarget.* 2017;8:78193–207.
145. Kirschner MB, Cheng YY, Badrian B, Kao SC, Creaney J, Edelman JJB, et al. Increased circulating miR-625-3p: a potential biomarker for patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2012;7:1184–91.
146. Santarelli L, Strafella E, Staffolani S, Amati M, Emanuelli M, Sartini D, et al. Association of MiR-126 with soluble mesothelin-related peptides, a marker for malignant mesothelioma. *PLoS One.* 2011;6:e18232.
147. Weber DG, Casjens S, Johnen G, Bryk O, Raiko I, Pesch B, et al. Combination of MiR-103a-3p and mesothelin improves the biomarker performance of malignant mesothelioma diagnosis. *PLoS One.* 2014;9:e114483.
148. Cavalleri T, Angelici L, Favero C, Dioni L, Mensi C, Bareggi C, et al. Plasmatic extracellular vesicle microRNAs in malignant pleural mesothelioma and asbestos-exposed subjects suggest a 2-miRNA signature as potential biomarker of disease. *PLoS One.* 2017;12:e0176680.
149. Gee GV, Koestler DC, Christensen BC, Sugarbaker DJ, Ugolini D, Ivaldi GP, et al. Downregulated microRNAs in the differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer.* 2010;127:2859–69.
150. Benjamin H, Lebanony D, Rosenwald S, Cohen L, Gibori H, Barabash N, et al. A diagnostic assay based on microRNA expression accurately identifies malignant pleural mesothelioma. *J Mol Diagn.* 2010;12:771–9.
151. Andersen M, Grauslund M, Ravn J, Sørensen JB, Andersen CB, Santoni-Rugiu E. Diagnostic potential of miR-126, miR-143, miR-145, and miR-652 in malignant pleural mesothelioma. *J Mol Diagn.* 2014;16:418–30.
152. Andersen M, Trapani D, Ravn J, Sørensen JB, Andersen CB, Grauslund M, et al. Methylation-associated silencing of microRNA-126 and its host gene EGFL7 in malignant pleural mesothelioma. *Anticancer Res.* 2015;35:6223–9.
153. De Santi C, Melaiu O, Bonotti A, Cascione L, Di Leva G, Foddìs R, et al. Deregulation of miRNAs in malignant pleural mesothelioma is associated with prognosis and suggests an alteration of cell metabolism. *Sci Rep.* 2017;7:3140.

Capitolo 5

MICROAMBIENTE E IMMUNOLOGIA DEL MESOTELIOMA PLEURICO MALIGNO

Elisabeth Digifico, Cristina Belgiovine, Alberto Mantovani e Paola Allavena

5.1 Introduzione

Uno stato infiammatorio cronico e persistente è una delle caratteristiche principali del mesotelioma pleurico maligno (MPM), una neoplasia molto aggressiva la cui patogenesi è fortemente correlata con l'esposizione professionale alle fibre volatili di amianto e ad un danno tissutale cronico (1, 2).

Al fine di eliminare le fibre di amianto inalate, i macrofagi vengono richiamati a livello del tessuto polmonare e attivati *in loco* per la fagocitosi, ma questo meccanismo di difesa non risulta efficiente in quanto le fibre di amianto non sono biodegradabili.

Grazie anche alla produzione di diverse citochine e specie chimiche reattive, le cellule epiteliali dei polmoni, della pleura e in particolar modo le cellule del sistema immunitario reclutate in sede sono coinvolte in un processo infiammatorio innescato dall'amianto. Questa "fagocitosi frustrata" delle fibre di amianto innesca sia uno stato cronico e persistente di infiammazione, sia una risposta fibrinogenica che -nel lungo periodo- contribuisce alla trasformazione delle cellule della pleura normale in cellule tumorali (2-4).

In questo contesto, le cellule coinvolte nella risposta infiammatoria locale, in particolar modo le cellule della risposta infiammatoria innata, giocano un ruolo chiave nell'insorgenza del tumore e nel suo sviluppo, in quanto mantengono attivo uno stato infiammatorio cronico.

Lo stato infiammatorio associato al cancro è stato riconosciuto come una delle caratteristiche principali che accomuna tutti i tumori (5). Evidenze epidemiologiche, genetiche e sperimentali hanno dimostrato che l'infiammazione cronica può aumentare il rischio di cancro, promuovere la progressione tumorale e la disseminazione metastatica (6, 7).

Una serie di studi hanno caratterizzato l'infiltrazione locale dei leucociti infiammatori nel mesotelioma maligno e anche l'espressione di diversi mediatori reattivi e infiammatori (2-4, 8-10).

In molti studi purtroppo non è stato possibile ottenere dei dati conclusivi a causa della difficoltà di reclutare ampie coorti di pazienti per questa patologia, che risulta piuttosto rara, e anche perché non tutti i pazienti sono stati sottoposti a resezione chirurgica e quindi hanno potuto fornire il materiale biotico adeguato per le analisi immunoistochimiche.

Proprio a causa della loro bassa incidenza, dei tre principali istotipi che caratterizzano il MPM, epitelioide, bifasico e sarcomatoide, ancora poco sappiamo degli ultimi due sottotipi.

In questo capitolo verrà presentata una descrizione di ciascun subset di cellule del sistema immunitario che popolano il microambiente tumorale e i principali mediatori dell'infiammazione presenti.

5.2 Cellule Immunitarie presenti nel microambiente tumorale del mesotelioma pleurico maligno

La componente stromale dei tumori solidi è generalmente disorganizzata e composta da una complessa ed eterogenea varietà di diverse tipi cellulari, principalmente fibroblasti e cellule immunitarie, e da una matrice alterata dove crescono nuovi vasi sanguinei. La composizione del microambiente tumorale (TMA) è molto variabile tra i diversi pazienti, a seconda dei diversi sottotipi istologici ed è soggetta a cambiamenti dinamici che si possono verificare ad esempio dopo esposizione a terapie antitumorali; in aggiunta può evolvere nel tempo a seguito delle complesse interazioni tra il tumore e l'ospite (11, 12).

Tutti gli studi patologici sui tessuti biotici di pazienti affetti da MPM, riportano la presenza di un ricco tessuto immunitario infiltrante, composto principalmente da macrofagi e linfociti T. Sono state descritte altre cellule immunitarie come i linfociti B, le cellule T regolatorie (Tregs), le cellule

dendritiche (DCs), le cellule soppressive derivate dalla linea mieloide (MDSCs), le cellule Natural Killer (NK), i neutrofili e i mastociti (Fig. 5.1). Le cellule NK, i linfociti T citotossici ed helper, e le DC possono contribuire a sostenere una risposta immunitaria protettiva di tipo antitumorale, mentre i Treg e le cellule della linea mieloide (macrofagi e MDSCs) sono generalmente associati ad un ambiente immunosoppressivo che favorisce la progressione tumorale.

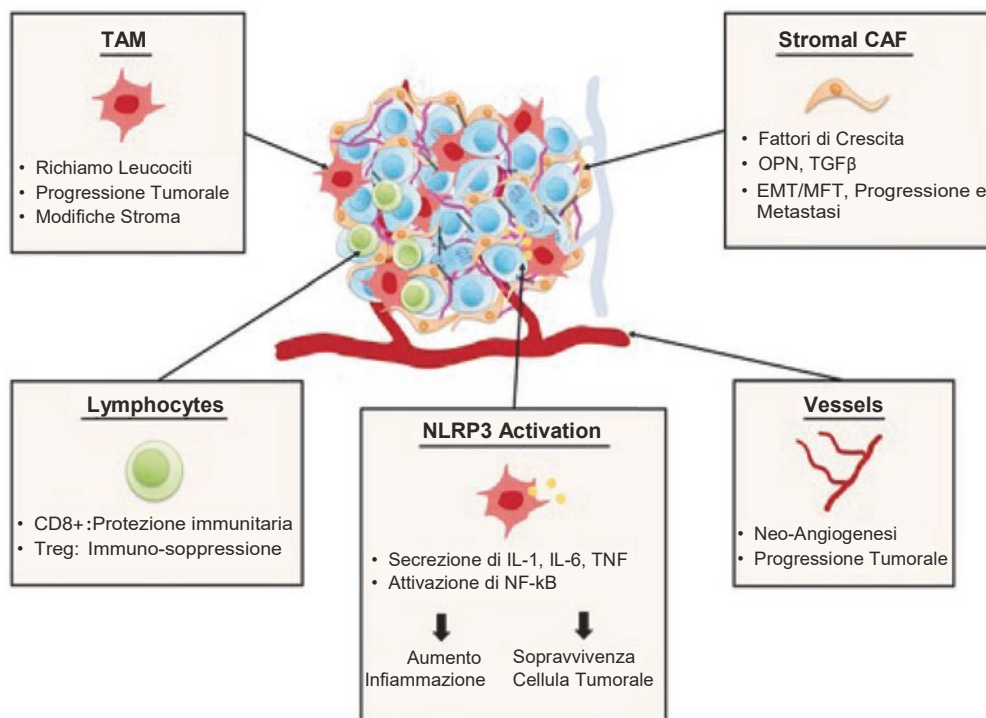


Figura 5.1. Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un tumore caratterizzato da un complesso microambiente, con un'alta percentuale di infiltrato di cellule di natura infiammatoria. Le cellule più rappresentate sono i macrofagi associati al tumore (TAMs) e le cellule dell'immunità innata con le seguenti caratteristiche: i) sono specializzate nel processo di fagocitosi, per cui accumulano al loro interno le fibre di amianto non degradabili presenti nel tessuto polmonare; ii) producono diversi mediatori dell'infiammazione; iii) favoriscono la sopravvivenza delle cellule tumorali. Tra le cellule dell'immunità adattativa, ci sono i linfociti T che comprendono le cellule citotossiche effettrici CD8+, con attività antitumorale, e i Treg che invece sopprimono le risposte antitumorali. Nei MPM, le fibre di amianto (riconosciute come un segnale di pericolo) causano l'attivazione dell'inflammosoma (e.g., NLRP3), con conseguente secrezione delle citochine pro-infiammatorie come la IL-1 β che attiva il fattore di trascrizione NF-kB, dando così inizio alla cascata infiammatoria. Le citochine e le chemochine rilasciate amplificano la reazione infiammatoria grazie al reclutamento *in loco* dei leucociti. La produzione di fattori di crescita favorisce la neo-angiogenesi e la proliferazione delle cellule tumorali. I fibroblasti associati alla matrice del tumore (CAF) producono fattori di crescita, proteine della matrice (ad esempio l'osteopontina, OPN) e il TGF β che inducono la transizione da cellule epiteliali a cellule mesenchimali (EMT) e da mesoteliali a fibroblastiche (MFT).

5.2.1 I macrofagi e le cellule soppressorie di origine mieloide

I macrofagi sono cellule specializzate nella attività fagocitaria, facenti parte del sistema dell'immunità innata e presenti in tutte le fasi dei processi patologici associati al mesotelioma. Fin dalla prima esposizione all'amianto volatile, le fibre non degradabili innescano un segnale di "pericolo" nel tessuto polmonare e nei foglietti pleurici che innescano un rilascio delle citochine e chemochine pro-infiammatorie con conseguente richiamano di nuovi leucociti ad attività fagocitaria (neutrofili e monociti) (13, 14). I neutrofili sono cellule con una breve emivita e muoiono in pochi giorni, mentre i monociti differenziano nei macrofagi a lunga sopravvivenza e diventano i principali produttori di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto e di citochine infiammatorie. Pertanto, i

macrofagi nel loro tentativo di eliminare le fibre sono verosimilmente i principali responsabili del processo infiammatorio cronico che caratterizza i siti pre-maligni a livello della pleura (1, 3).

Una volta che il tumore si è sviluppato, la presenza dei macrofagi associati al tumore (TAMs), è regolata, come in altri tumori solidi, dalla produzione di sostanze che attirano in loco i monociti, come la chemochina CCL2, prodotta sia dalle cellule neoplastiche che da quelle dello stroma (15-17). Le cellule tumorali richiamano i monociti per un loro personale vantaggio in quanto i macrofagi differenziati sotto l'influenza dei fattori secreti dalle cellule tumorali acquisiscono un fenotipo immuno-soppressivo con funzioni che favoriscono la formazione del tumore (ad esempio la produzione di fattori di crescita per le cellule tumorali o la neo-vascolarizzazione) (15). Infatti è oggi ben noto che la densità dei TAM in un tumore è generalmente associata con la progressione tumorale e la scarsa prognosi (15, 18).

I macrofagi infiammatori nei siti delle lesioni pre-maligne e la presenza dei TAMs nei tessuti con diagnosi di mesotelioma hanno un diverso fenotipo e funzione. Questa plasticità è una caratteristica dei macrofagi ed è regolata dalla diversa natura degli stimoli locali incontrati dai monociti che si stanno differenziando. Secondo uno schema molto semplice, lo spettro di attivazione dei macrofagi ha due estremi polarizzati: i macrofagi M1 (attivati in modo classico) e i macrofagi M2 (attivati secondo una via alternativa). I primi (M1) rappresentano le cellule immuno competenti che agiscono contro le infezioni batteriche e producono citochine pro-infiammatorie, quali IL-1 β , TNF α e IL-12, e favoriscono la risposta protettiva ad opera dei Th1. Diversamente, i macrofagi M2 sopprimono l'immunità Th1 e promuovono la proliferazione tumorale e la neo-angiogenesi. Pertanto, sebbene sia stato riconosciuto che l'intero spettro di attivazione dei TAM è molto più complesso di quanto non si potesse pensare, l'idea generale è che i macrofagi che colonizzano un tumore acquisiscano un fenotipo e delle funzioni tipiche dei macrofagi M2 (15-19). Questa conoscenza è importante per l'uso di specifici marcatori per gli M2 nei tessuti di MPM, come possibili biomarcatori delle loro funzioni di promotori tumorali e immuno-soppressive. Tutti gli studi pubblicati hanno indagato la presenza dei TAMs nei tessuti di MPM con un marcatore universale per i macrofagi, il CD68, secondo l'idea che sia i MPM di tipo epiteliale che non epiteliale contenessero una gran quantità di CD68+TAM, la cui percentuale può raggiungere fino al 40-50% di tutte le cellule presenti.

In una serie di 52 pazienti con diagnosi di MPM che hanno subito resezione chirurgica, Burt e collaboratori hanno evidenziato nel sottotipo sarcomatoide, non in quello epitelioide, che un'alta percentuale di macrofagi CD68+ erano associati ad una cattiva prognosi (20). Questi TAMs esprimevano anche i tipici marcatori del tipo M2, come CD163, CD206, e il recettore α dell'IL 4. Risultati confrontabili sono stati riportati successivamente anche da altri due gruppi che hanno dimostrato che la singola conta cellulare delle cellule positive per CD163+ non correlava con il decorso clinico dei pazienti, mentre il rapporto dei macrofagi CD163+/CD68+ era un fattore prognostico di sopravvivenza nel sottotipo epitelioide (21, 22).

L'interazione tra le cellule del MPM e i macrofagi ha un ruolo cruciale nello spostare il differenziamento dei TAMs verso la forma immunosoppressiva e pro-tumorigenica (23). Questo tipo di differenziamento è inoltre favorito dalla presenza dei linfociti infiltranti il tumore (TILs) che producono IL-4, IL-13 e IL-10, i classici stimoli che inducono il differenziamento di tipo M2 delle cellule mieloidi (24, 25). Studi *in vitro* hanno dimostrato che co-culture di macrofagi con cellule tumorali di MPM o con i loro versamenti pleurici acquistano un fenotipo M2 (26) e rilasciano un gran numero di prostaglandine (e.g., PGE2) che, stimolando lo sviluppo dei Tregs, hanno effetti immunosoppressivi sui TME (23, 27). Infatti nei tumori è stato visto che il numero dei macrofagi CD68+ correlava con la densità dei Tregs (28). In un recente studio, effettuato mediante tecnologia tissue-microarray, sono stati analizzati gli immunoscore di 302 pazienti con MPM e la densità di ogni singola popolazione leucocitaria correlata con la sopravvivenza. In linea con i dati precedenti, nei pazienti con MPM un basso numero di macrofagi (CD68+), di Tregs (FOXP3+) e neutrofili

(NP57+) erano associati con una lunga sopravvivenza (29). Alcuni lavori hanno studiato anche il ruolo dei neutrofili, sebbene nei tessuti tumorali queste cellule siano molto meno presenti dei macrofagi. Awad et al. hanno dimostrato una correlazione inversa tra il numero dei neutrofili infiltranti e la densità delle cellule T (30). In linea con questi risultati, nei modelli murini di MPM la deplezione dei macrofagi con acido zolendrico riduceva l'attecchimento e la crescita del tumore (31).

I monociti, i precursori circolanti dei TAM, sono stati studiati quali marcatori prognostici nei MPM. In una ampia serie di 667 casi, alti livelli di monociti prima dell'intervento chirurgico mostravano una correlazione negativa con la sopravvivenza dei pazienti con mesotelioma, sia nel sottotipo epitelioide che in quello sarcomatoide (20). In un altro studio viene riportato che una diminuzione del rapporto linfociti/monociti (dovuto ad un aumento dei monociti) era associato con una bassa sopravvivenza (32). Infine, un alto rapporto tra neutrofili/linfociti risultava essere un fattore prognostico negativo (33). In generale, un alto contenuto di macrofagi nel tessuto tumorale, o di cellule mieloidi circolanti, sembra essere una costante associata ad una più rapida crescita tumorale. Un'altra famiglia di cellule immunitaria a funzione immuno-soppressiva sono quelle denominate: cellule soppressive di derivazione mieloide (MDSCs), una popolazione cellulare eterogenea dal punto di vista fenotipico legata ai monociti e ai neutrofili (34, 35).

Le cellule MDSCs inibiscono la proliferazione e le funzioni delle cellule CD4+ e CD8+ T attraverso la produzione di arginase (ARG1), della sintase inducibile dell'ossido nitrico (iNOS), dell'indolamina 2.3 diossigenasi 1 (IDO1) e delle PEG2. Nei tumori, le MDSCs aumentano in risposta ai fattori di crescita prodotti dalle cellule tumorali come il GM-CSF e le prostaglandine e, inibendo l'immunità adattativa, favoriscono la crescita tumorale e la progressione della malattia. In un modello murino di mesotelioma, il trattamento con celecoxib, un inibitore delle COX-2, riduce la produzione di PGE2 e il numero di MDSCs, generando una risposta antitumorale in seguito a immunoterapia basata sulla presenza di cellule dendritiche (36).

È interessante sottolineare i dati di un altro studio in cui gli autori cercano di inibire la funzionalità delle proteine del complesso bromodomain BRD2, BRD4 e BRD9 che sono molto espresse nella pleura maligna. In modelli preclinici di MPM, gli inibitori dei bromodomain non solo riducono la proliferazione delle cellule tumorali ma inducono anche una morte cellulare immunogenica e modificano la composizione del TME. I risultati indicano che l'efficacia antitumorale degli inibitori dei bromodomain sono in larga parte dovuti ad una diminuzione dei MDSC e ad un aumento dei linfociti CD8+T (37).

5.2.2 I linfociti

I linfociti T e B fanno parte del sistema immunitario adattativo. Nel contesto tumorale, i linfociti infiltranti il tumore (TILs) giocano un ruolo chiave nella risposta antitumorale. Le cellule CD8+T sono in grado, in seguito alla presentazione di un antigene tumorale da parte del Maggiore Complesso di Istocompatibilità, di uccidere direttamente le cellule tumorali attraverso la produzione di fattori citotossici quali le perforine e i granzimi. Le cellule T helper CD4+ sono in grado di attivare le cellule che presentano l'antigene (dall'inglese *Antigen Presenting Cells*, APC) e supportare l'azione dei linfociti CD8+T e delle cellule Natural Killer (NK), attraverso la produzione di INF γ e di stimolare in generale la risposta immunitaria antitumorale (38, 39).

La presenza all'interno della massa tumorale di linfociti CD8+T è in genere considerata come un segno di una risposta immunitaria antitumorale di tipo antigene specifica. In molti tumori solidi, alti livelli di cellule T, in particolar modo di linfociti CD8+T, conferisce un vantaggio per la sopravvivenza dei pazienti (40-42). In molti studi è stato dimostrato che nelle biopsie di pazienti affetti da MPM sono presenti un numero variabile di linfociti T. Già nel 1982 era stato dimostrato che l'infiltrato linfocitario correlava in modo significativo con una maggior sopravvivenza dei pazienti, per quanto in quel periodo, rispetto ad oggi, non fosse ancora possibile identificare le

diverse sottopopolazioni linfocitarie (43). L'idea comune è che una alta concentrazione di CD8+T nei tessuti dei pazienti con MPM sia un marker di una attiva risposta immunitaria, associata ad una prognosi migliore (22, 44, 45).

Anche la presenza di linfociti CD4+T correla con una miglior risposta alla terapia a base di cisplatino e pemetrexed (46) e in una ampia casistica di tumori del sottotipo epitelioide anche con una miglior prognosi, quando associata con la misura dei linfociti CD20+B (29).

Uno studio recente ha analizzato nelle biopsie di pazienti con MPM l'infiltrato leucocitario. I risultati hanno dimostrato che l'istotipo più aggressivo (sarcomatoide/bifasico) ha una più alta concentrazione di linfociti CD8+T e, sulle cellule tumorali, una maggior espressione dell'antigene PD-L1, mentre l'istotipo epitelioide ha una più alta concentrazione di linfociti CD4+T e CD20+B. In contrasto con altri studi, una alta concentrazione di cellule CD8+T correlava con una scarsa risposta alla chemioterapia e una prognosi peggiore (47). Questa differenza nei risultati può essere spiegata dal fatto che una più alta concentrazione di cellule CD8+T era anche associata ad una più alta concentrazione di macrofagi CD68+.

Nei MPM, così come in molti altri tumori solidi, l'attività citotossica dei linfociti CD8+T è inibita dalle proteine coinvolte nel pathway di morte cellulare programmata di tipo 1 (PD-L1) o PD-L2 (noti come i checkpoint del sistema immunitario), espresse sulla superficie delle cellule tumorali o delle cellule a funzione immunosoppressiva presenti nello stroma come i TAMs e i MDSCs (48). Il recettore per queste molecole (PD-1) è espresso sui linfociti attivati CD4+ e CD8+T. L'interazione tra le cellule T che esprimono PD-1 (PD-1+T) e il loro ligando PD-L1 presente sulle cellule tumorali/stromali blocca la funzione dei linfociti T e induce una evasione dal controllo del sistema immunitario (47, 48, 50).

Con l'avvento dell'immunoterapia basata sull'utilizzo degli inibitori dei check-point che, in alcuni pazienti, inducono una marcata regressione del tumore (51-53), risulta oggi fondamentale capire se l'infiltrato linfocitario esprima o meno le molecole PD-1, che sono oggi un marker di deplezione immunitaria. Sulla base dei dati fino ad oggi analizzati, il MPM esprime le molecole di PDL-1 in un range compreso tra il 16 % e il 65%, con la più alta immunoreattività riscontrata nei casi di mesotelioma di tipo non epitelioide (28, 54-59). L'attivazione dell'asse PD-1/PD-L1 innesca una inibizione della risposta immunitaria endogena antitumorale e una più rapida progressione della malattia. I livelli di PD-L1 nei MPM sono risultati un fattore prognostico indipendente di prognosi negativa (46, 55-60). In uno studio in cui sono stati analizzati 43 pazienti affetti da MPM, gli autori hanno indagato mediante tecnica citofluorimetrica su campioni tumorali disaggregati, il fenotipo dei leucociti infiltranti. I loro risultati hanno dimostrato, con valenza statistica, che i tumori PD-L1 positivi avevano un maggior contenuto di leucociti CD45+ e in particolar modo un maggior numero di cellule CD3+ CD8+T esprimenti PD-1 e anche una maggior quantità di CD4+/FOXP3+Treg (30). Una analisi simile è anche stata condotta su campioni ottenuti mediante ago aspirato, un approccio che non richiede alcuna procedura di dissociazione enzimatica prima di poter procedere con l'analisi citofluorimetrica (61). Gli autori sono stati in grado di immuno-fenotipizzare l'infiltrato leucocitario e di determinare lo stato di espressione di PD-1 dei linfociti CD4+ e CD8+, così come di caratterizzare la presenza di cellule mieloidi (monociti CD33+ e granulociti CD66b+). Questo approccio è estremamente interessante perché può essere effettuato direttamente su tessuto fresco ottenuto per fini diagnostici ed è molto più rappresentativo del microambiente tumorale rispetto all'analisi fatta su campioni disaggregati (61).

In uno studio recente, Lee e collaboratori hanno caratterizzato l'infiltrato immunitario e il rapporto PD-1/PD-L1 nei MPM usando l'analisi CyTOF (62). Sono stati identificati due sottotipi tumorali con due distinti fenotipi immunitari: TiME-I e TiME-II. Il primo conteneva un elevato numero di cellule CD8+T non reattive (cellule PD-1+CTLA-4+CD8+T) che mantenevano la capacità di produrre IFN γ , e di plasmocitoidi DC (pDC) esprimenti alti livelli di CD40 e di CD86. Diversamente, il sottotipo TiME-II conteneva principalmente Treg esprimenti alti livelli di ICOS e

di CTLA-4, cellule CXCR4+CD38-(naive)CD8+T, neutrofili, cellule DCs convenzionali (cDC) e TAMs con alti livelli di espressione di PD-L1 e produzione di IL10. Studi successivi più approfonditi hanno dimostrato che i sottotipi TiME-I, rispetto ai TiME-II, hanno una maggior quantità di neo antigeni e alti livelli di proteine del MHC di classe I e II. Va sottolineato che queste *signatures* hanno anche una rilevanza prognostica in quanto la *signature* TiME-I è associata ad una prognosi più favorevole rispetto alla *signature* TiME-II (62). Inoltre, i risultati di questo studio mettono in luce che l'espressione di PD-1 sui linfociti T effettrici non è necessariamente un segnale di spegnimento del sistema immunitario, ma –anzi- testimonia che questi linfociti T sono, o sono stati, attivati da un antigene, e pertanto il tumore deve essere considerato immunogenico. Sulla stessa linea, l'up-regolazione di PD-L1 (che è principalmente dovuta ad IFN γ) da parte delle cellule tumorali o stromali può essere considerata come un segno di una risposta immunitaria di tipo antitumorale. Resta ancora da chiarire se questa risposta immunitaria sia ancora attiva o sia stata completamente spenta dalla presenza di PD-L1.

Sono stati recentemente caratterizzati altri check-points immunitari: l'attività dei linfociti può essere inibita anche dalle molecole TIM-3 e LAG-3. La loro presenza è stata descritta sulle cellule CD4+, CD8+T e sui NK presenti nel versamento pleurico dei pazienti con mesotelioma (46), o nelle biopsie prese a scopo diagnostico (61).

I linfociti B sono in grado di agire come APC, di stimolare le cellule T e di differenziarsi in plasmacellule in grado di secernere anticorpi. Le cellule B non sono generalmente presenti in grosse quantità nei tumori solidi e spesso si trovano localizzate in aggregati con i linfociti T nelle strutture linfoidi terziarie (TLS, Terziary Lymphoid Structures). In alcuni tumori è stato visto che la presenza dei linfociti B nelle TLS si associa con una prognosi migliore (63, 64), mentre i linfociti B sparsi nello stroma non correlano affatto o-peggio-come nel caso del tumore del pancreas-correlano con una prognosi peggiore (65). Nei pazienti con diagnosi di MPM è stato generalmente osservato un basso numero di cellule CD20+B, anche se sono stati riportati dei casi con un più alto infiltrato di cellule B (fino al 50% di cellule CD45+) (44, 66, 67). Sebbene siano stati fatti ancora pochi studi, i dati sembrano suggerire una associazione tra la conta dei linfociti B e la sopravvivenza (22). Ad esempio, in uno studio, è stato riportato che un alto numero di linfociti CD20+B correlava con una prognosi migliore se associato al basso numero di macrofagi CD163+ (22). Va sottolineato che al momento il ruolo esatto delle cellule B nel MPM è ancora controverso. Infatti, con la loro risposta anticorpale questo tipo di cellule può contribuire a sostenere e potenziare il processo di infiammazione cronica che sappiamo essere in grado di favorire la progressione e la crescita del tumore.

Come detto in precedenza, la sottopopolazione di cellule CD4+/FOXP3+T è caratterizzata da una potente attività immunosoppressiva: i Treg hanno un ruolo chiave dal punto di vista fisiologico nel mantenere la tolleranza verso il "self" e controllare le malattie autoimmunitarie. Nei tumori la loro presenza è spesso associata ad una cattiva prognosi, in quanto sono in grado di bloccare l'attivazione e la proliferazione delle cellule T citotossiche (12, 22, 66). Diversamente, nei pazienti con MPM di tipo epitelioide, i bassi livelli di Treg sono associati ad una prognosi favorevole (29). Inoltre si è visto che il numero dei Treg diminuisce nei pazienti che sono stati trattati con cisplatino e pemetrexed (28).

Le cellule NK sono dei linfociti che mostrano una naturale attività citotossica verso le cellule tumorali in una maniera antigene indipendente. Poche cellule NK sono in grado di infiltrare le masse solide dei MPM, ma alcune sono state riscontrate anche nei versamenti pleurici dove possono raggiungere circa il 10-15% delle cellule totali presenti. Queste cellule NK hanno un basso potere citotossico e anche le cellule NK presenti nel sangue hanno un più basso potere citotossico rispetto a quelle di individui sani (68). In modelli *in vitro*, l'esposizione all'amianto sembra bloccare l'attività citotossica delle cellule NK, e diminuire l'espressione del recettore attivante NKp46 (68).

Queste cellule, tuttavia, non risultano anergiche e possono essere nuovamente riattivate mediante trattamento con alcune citochine quali IL-2 (69).

5.3 Il Microambiente infiammatorio dei MPM

5.3.1 Le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto

È noto che le fibre di amianto causano un danno cellulare e favoriscono la generazione di specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS/RNS), che causano ossidazione e nitrosilazione del DNA e delle proteine (70, 71).

Gli agenti ossidanti giocano un ruolo importante nell'attivazione di numerosi segnali di trasduzione del segnale che sono legati ai processi di proliferazione/apoptosi e all'infiammazione (72). RNS sono molecole con attività antimicrobica, derivate dall'ossido nitrico e dal superossido (O_2^-) che sono prodotti nei macrofagi durante il processo infiammatorio, in risposta allo stimolo con LPS o $INF\gamma$ (73).

I ROS sono molecole chimicamente reattive contenenti ossigeno, come i perossidi, superossidi, i radicali idrossilici e l'ossigeno singoletto. In condizioni di omeostasi, bassi livelli di produzione dei ROS hanno diversi e importanti ruoli nel sistema di traduzione del segnale e nella risposta immunitaria; diversamente, in seguito a danno ambientale o cellulare, aumenti nei livelli di ROS/RNS causano uno stress ossidativo che induce un danno sia a livello cellulare che a livello del DNA. Nel caso dei MPM, le fibre di amianto aumentano i livelli di ROS/RNS sia per una azione diretta sulle cellule del mesotelio, sia per una azione indiretta sulle cellule infiammatorie reclutate. L'aumentata produzione di ROS/RNS e l'infiammazione cronica persistente sono tra i principali fattori responsabili del processo di trasformazione cellulare ed evoluzione maligna (74).

Queste molecole estremamente reattive possono indurre danno al DNA e instabilità genomica (rottura del filamento del DNA e modifica della base) e alterazione delle proteine (e.g. enzimi della riparazione del DNA) (75).

È stato dimostrato che nei lavoratori esposti all'amianto sono aumentate le rotture a doppia elica del DNA rispetto ai lavoratori non esposti (76). L'espressione anomala di citochine infiammatorie e l'attivazione del *pathway* di NF- κ B favoriscono il processo di carcinogenesi attraverso diversi meccanismi, per esempio, aumentando la sopravvivenza cellulare, la proliferazione e l'angiogenesi. Gli effetti tossici diretti dell'amianto sulle cellule della pleura sono fortemente inibiti dalla contemporanea produzione di TNF, che mantiene la sopravvivenza cellulare attraverso il *pathway* dell'NF- κ B. Per questo un aumento del numero di cellule della pleura che sopravvivono al danno sono soggette alla trasformazione maligna (77).

Un possibile scenario nel processo di trasformazione neoplastica indotta dall'amianto è che le cellule della pleura che sopravvivono al danno diretto siano poi continuamente esposte ai mediatori dell'infiammazione e alle specie reattive ROS/RNS. All'inizio, il danno al DNA viene riparato in modo efficiente ma con il passare del tempo può succedere che il danno al DNA non sia più riparato e alcune mutazioni colpiscano a caso deigeni ad attività onco-soppressiva o del controllo dei checkpoint cellulari inattivandoli. Questo fatto comporta che le cellule della pleura iniziano a proliferare in modo incontrollato innescando il processo di trasformazione neoplastica (78-81) (Fig. 5.2).

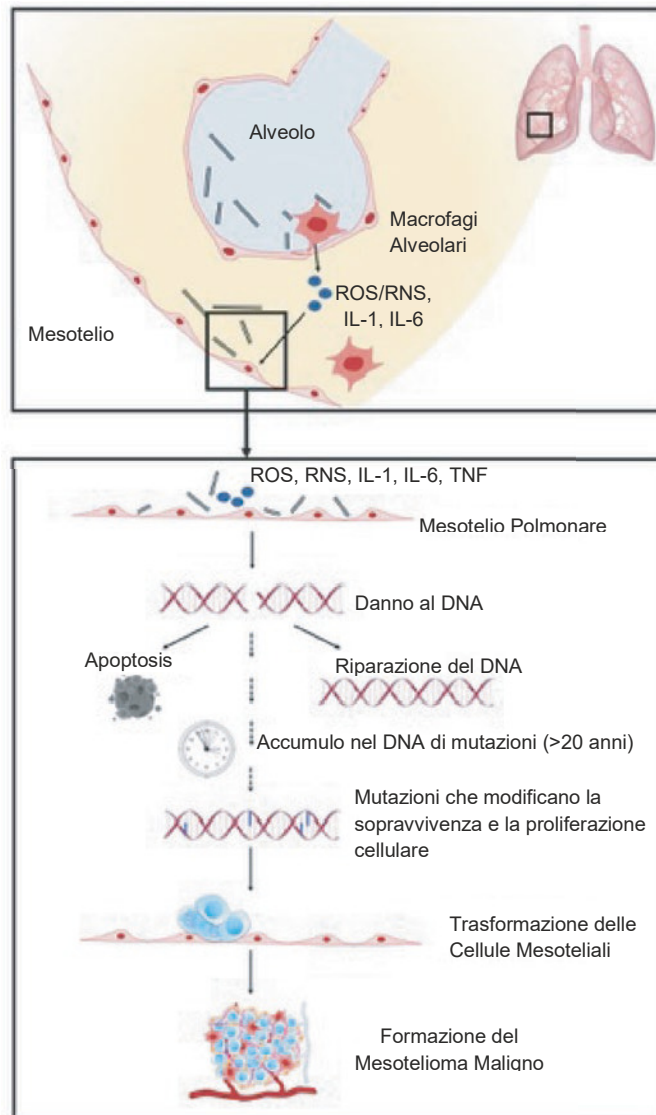


Figura 5.2. In seguito all'accumulo negli alveoli polmonari delle fibre di amianto, i macrofagi locali sono attivati nel tentativo di eliminare le fibre, un processo noto come "fagocitosi frustata", a causa della natura non biodegradabile delle fibre. La reazione infiammatoria indotta dalle fibre di amianto genera uno stato cronico e persistente di infiammazione. Le specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto (ROS/RNS) e le citochine infiammatorie (IL-1, IL-6, TNF) causano nelle cellule mesoteliali dei danni al DNA e alterazioni genetiche (e.g., nei geni ad attività onco-soppressiva) e inibizione dei meccanismi di riparazione del DNA. Questo processo di cancerogenesi indotto dall'infiammazione può richiedere diversi anni, ed è il risultato di un bilanciamento tra diversi processi: i) serie continua di mutazioni che si verificano in modo random nel genoma con successiva riparazione delle stesse da parte dei sistemi di riparazione del DNA. ii) Morte delle cellule mesoteliali o loro proliferazione. iii) riconoscimento delle cellule trasformate da parte del sistema immunitario o capacità di nascondersi ad esso.

5.3.2 Attivazione dell'inflammosoma da parte di NLRP3 e IL-1

Le fibre di amianto nei polmoni sono capaci di attivare direttamente il recettore della famiglia dei NOD, noto con il termine di NLRP3, un componente dell'inflammosoma nelle cellule del sistema immunitario innato, che una volta attivato produce e favorisce la secrezione nel microambiente circostante di IL-1 β e di IL-18 (13, 82). IL-1 è il primo membro di una famiglia complessa e strutturalmente correlata di citochine che agiscono come mediatori centrali dell'immunità innata e dell'infiammazione (83). La famiglia comprende diverse isoforme di ligandi (i più noti sono IL-1 α ,

IL- β e IL-33) e altri ligandi che fungono da recettori antagonisti come IL-1Ra. Anche la famiglia dei recettori è molto complessa ed è composta da un recettore con funzioni di attivatore del segnale (IL-1RI), dai recettori *decoy*, che non sono in grado di trasdurre alcun segnale (e.g. IL-1RII) e da recettori regolatori (e.g., IL-1R8).

Questa complessità strutturale e il rigido sistema di regolazione sono necessari per un fine bilanciamento tra amplificazione delle difese immunitarie e infiammazione incontrollata (83).

L'interleuchina IL-1 β attiva il suo segnale attraverso l'asse MyD88-IRAK-NF-kB e favorisce la secrezione di mediatori secondari dell'infiammazione tra cui TNF e IL-6, diverse citochine, fattori di crescita ed enzimi della cascata infiammatoria.

La chemochina IL-1 β è prodotta *in vitro* insieme ad altre citochine infiammatorie dalle cellule mesoteliali e dai macrofagi alveolari trattati con amianto o fibre simili (82, 84). In un modello di topo in cui sono state trapiantate delle cellule umane di MPM (modello *xenograft*), la secrezione di diverse citochine risultava bloccata dal trattamento con IL-1Ra (Anakinra) confermando così il ruolo primario di IL-1 nell'attivazione della cascata infiammatoria (82). Nell'ultima decade l'attivazione dell'inflammosoma e la secrezione dell'IL-1 sono stati considerati come i due componenti principali del processo di infiammazione che favorisce la crescita tumorale (85). Le risposte attivate da IL-1 amplificano il reclutamento delle cellule infiammatorie, promuovono la neoangiogenesi e guidano la soppressione dell'immunità antitumorale (85). Inoltre, l'attivazione cronica di NLRP3 e la produzione di IL-1 β /IL-18 inducono la transizione delle cellule mesoteliali a cellule fibroblastiche (MFT), evento considerato come la fase iniziale del processo di tumorigenesi dei MPM, con l'acquisizione di marcatori di origine mesenchimale (vimentina, N-caderina) e la perdita dei marcatori epiteliali (e.g. E-caderina) (86). Tra i fattori responsabili della MFT ci sono le citochine IL-6 e CXCL8, il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF), quest'ultimo attivato direttamente anche dall'amianto (86).

Va sottolineato che il trattamento con chemioterapici e la conseguente morte cellulare può attivare l'inflammosoma e aumentare i livelli di IL-1 β e di altri mediatori pro infiammatori.

Nei topi SCID trapiantati con cellule umane di MPM, l'inibizione del segnale di IL-1R (Anakinra) in combinazione con il cisplatino ha dimostrato un maggior potere antitumorale rispetto al trattamento con cisplatino da solo (87). Questo dato conferma che il segnale dell'IL-1 β gioca un ruolo importante nella progressione del MPM, ed è per questo motivo che in questi ultimi anni si è assistito ad un aumentato interesse in oncologia per sviluppare composti in grado di bloccare la funzione dell'IL-1. Dati preliminari in una ampia coorte di pazienti ad alto rischio di sviluppare un tumore al polmone hanno evidenziato che l'inibizione del pathway dell'IL-1 β con un anticorpo specifico, potrebbe ridurre in modo significativo l'incidenza di tumori al polmone e la relativa mortalità (88). Queste osservazioni costituiscono la base razionale per utilizzare terapie mirate contro i mediatori dell'infiammazione nel MPM e considerare strategie chemopreventive contro il segnale pro-infiammatorio dell'IL-1 β /IL1R in quei pazienti considerati ad alto rischio perché sono stati esposti in modo cronico all'amianto.

5.3.3 Altre citochine infiammatorie e chemochine

Come detto in precedenza, l'attivazione mediata da IL-1 del fattore di trascrizione NF-kB comporta la trascrizione di diversi geni coinvolti nel processo infiammatorio.

Nei tessuti di MPM, e in particolar modo nei versamenti pleurici, sono presenti diversi mediatori solubili dell'infiammazione come ad esempio il TNF, IL-6 e le chemochine CXCL8 e CCL2. In aggiunta sono espressi un numero di fattori di crescita per le cellule epiteliali, per i vasi e le cellule dello stroma tra cui: il fattore VEGF (acronimo dall'inglese *Vasculature Endotelial Growth Factor*), l'HGF (acronimo dall'inglese *Hepatocyte Growth Factor*), il TGF- β (acronimo dall'inglese *Transforming Growth Factor Beta*), il PDGF (acronimo dall'inglese *Platelet Derived*

Growth Factor), l'IGF (acronimo dall'inglese *Insulin Growth Factor*) e il FGF (acronimo dall'inglese *Fibroblast Growth Factor*) (90-93).

Il TNF è una citochina pro-infiammatoria in grado di attivare diversi processi cellulari. Attraverso la stimolazione del pathway di NF- κ B, aumenta la produzione di chemochine e di molecole di adesione, importanti per il reclutamento dei leucociti infiammatori. In aggiunta, bassi livelli di TNF stimolano l'angiogenesi e l'attivazione dei fibroblasti quiescenti nello stroma (16). Infatti, alle concentrazioni normalmente presenti nel microambiente, il TNF sostiene la progressione tumorale. Diversamente, in diversi tipi di tumori è stato riportato che alti livelli di TNF inducono in modo marcato la morte cellulare per necrosi (16).

IL-6 è una citochina pleiotropica che agisce sulle cellule immunitarie e anche sulle cellule epiteliali e del microambiente. Sebbene sia il principale mediatore della risposta della fase acuta è anche coinvolta nella fase cronica del processo infiammatorio. Nel microambiente tumorale il suo ruolo è principalmente correlato con l'attivazione di diversi pathway tra cui STAT3, Ras/MAPK/ERK/AP1/JNK, Cox, PI3K/AKT, Wnt e Notch3/Jagged1. Questi pathway, in particolar modo quello controllato da STAT3, stimolano la sopravvivenza delle cellule tumorali (94), e sono coinvolti nell'acquisizione della resistenza durante la terapia; diversamente l'attivazione di STAT3 nelle cellule del sistema immunitario (*e.g.*, mediato da IL-6 e IL-10) induce uno stato di immunosoppressione (95).

I versamenti pleurici dei pazienti con mesotelioma contengono elevati livelli di IL-6 (96-99). Il suo coinvolgimento in questa patologia è stato studiato come un possibile fattore di crescita autocrino e quale promotore dell'angiogenesi (96, 100); va sottolineato che l'inibizione del recettore per IL-6 è in grado di abrogare l'espressione di VEGF nelle cellule mesoteliali in cultura (101). IL-6 è anche coinvolta nell'acquisizione della chemioresistenza, sebbene il suo ruolo nel mesotelioma sia controverso (100). Diversamente da altri tumori solidi dove i livelli sierici di IL-6 correlato con una prognosi negativa (*e.g.* NSCLC, pancreas e adenocarcinoma del seno), nei MPM il suo valore prognostico è ancora poco chiaro, tuttavia i suoi livelli sembrano correlare con altri fattori prognostici negativi, come il livello di CRP e l'alto numero di piastrine (98, 102, 103).

IL-1, TNF, e IL-6 stimolano in modo marcato l'espressione di diversi geni che codificano per altre chemochine. Un importante fattore coinvolto nel reclutamento dei monociti nel tessuto tumorale è CCL2, nota anche come MCP-1 (acronimo dall'inglese *Monocyte Chemo-Attracting Protein 1*) (6, 17). Sia le cellule di MPM che i macrofagi sono in grado di produrre CCL2 e il suo rilascio è il principale meccanismo di reclutamento dei monociti dal torrente ematico (26). Alti livelli di CCL2 sono stati riscontrati nei versamenti pleurici di pazienti affetti da MPM rispetto a quelli misurati nei versamenti pleurici di pazienti con patologie benigne (104, 105).

IL-8, nota anche con il termine di CXCL8, è prodotta dai macrofagi, dalle cellule endoteliali e dalle cellule epiteliali in seguito ad una infezione o a una ferita tissutale e stimola la migrazione dei granulociti nelle zone interessate (106). In questo senso CXCL8 è anche coinvolta nella risoluzione del processo patologico (107). Nell'ambiente tumorale, questa chemochina è responsabile del reclutamento dei neutrofili e anche dei MDSCs, promuovendo la formazione di microambiente immuno-soppressivo. CXCL8 è anche un potente fattore angiogenico e in grado di indurre la transizione delle cellule da epiteliale a mesenchimale (EMT) (108, 109). In topi esposti all'amianto, CXCL8, IL-6 e IL-1 β sono aumentate e alimentate dallo stato infiammatorio che precede la formazione del tumore (110, 111). In un modello murino di xenograft, l'inibizione di CXCL8 diminuisce la crescita del tumore, confermando il ruolo importante di questa chemochina nella progressione tumorale (112, 113).

Il versamento pleurico di pazienti con mesotelioma contiene livelli elevati di CXCL8. In aggiunta al suo ruolo pro-angiogenico e chemo-attrattivo, studi *in vitro* su colture cellulari di cellule di mesotelioma hanno dimostrato un effetto proliferativo autocrino di CXCL8 sulle cellule tumorali (113-115).

Studi precedenti hanno dimostrato che cellule di mesotelioma trattate con chemioterapici possono sopravvivere allo stimolo apoptotico ed entrare in uno stato di senescenza caratterizzato da un fenotipo secretorio associato alla senescenza (SASP); CXCL8 e IL-6 sono tra le principali citochine secrete (116). Uno studio recente ha riportato che un inibitore di HSP90 (una molecola con funzioni *chaperon* e nota per la sua capacità di sensibilizzare le cellule tumorali ad alcuni chemioterapici) e' in grado di attenuare la secrezione delle chemochine e in particolar modo di quelle correlate a CXCL8, favorendo così la sopravvivenza delle cellule del mesotelioma (113).

5.3.4 Le cellule dello stroma e i fattori relegati alla matrice

Le cellule dello stroma sono i principali componenti dei tumori solidi e uno studio recente ha evidenziato la loro complessa interazione con le cellule tumorali e con i leucociti infiltranti localmente. Diversamente da quanto si osserva nei tessuti normali, i fibroblasti associati al tumore (acronimo dall'inglese *Cancer Associated Fibroblasts*, CAFs) mostrano un tipico fenotipo non quiescente e sono una importante sorgente di mediatori biologici, sia solubili che associati alla matrice, quali i fattori di crescita per le cellule endoteliali e quelli per le cellule tumorali. I CAFs e il network dei vasi sanguinei sono coinvolti in modo importante durante lo sviluppo tumorale e sostengono la proliferazione cellulare e la loro abilità di invadere i tessuti circostanti (117, 118).

Nel mesotelioma maligno, i CAFs acquisiscono un fenotipo attivato grazie alla espressione locale del FGF-2, PDGF-AA (acronimo dall'inglese *Platelet Derived Growth Factor AA*) e del TGF- β prodotti sia dalle cellule tumorali che da quelle stromali (119). In seguito, questi producono abbondanti componenti della matrice ed enzimi proteolitici che contribuiscono alla costruzione di una matrice extracellulare aberrante con continuo rimodellamento. I CAFs inoltre producono altri fattori di crescita come il VEGF, quindi stimolano il network dell'angiogenesi, lo sviluppo del tumore e la resistenza alla terapia (82, 119-125). In un modello murino è stato dimostrato che la loro inibizione riduce *in vitro* la crescita delle cellule di mesotelioma (122).

Come in molti altri tumori, le biopsie di MPM contengono molti vasi e la valutazione istologica dell'angiogenesi è un fattore prognostico negativo indipendente (126). C'è evidenza che in un modello di ratto con mesotelioma, se blocchiamo la funzionalità dei CAFs con un inibitore del segnale del pathway di "Hedgehog", si ha una diminuzione del volume tumorale e della velocità di crescita. Una successiva valutazione istologica ha permesso di chiarire che i geni bersaglio di questo pathway (e.g. fibronectina e VEGF) erano principalmente down regolati nel compartimento stromale (127, 128).

Il TGF- β è il principale regolatore delle cellule stromali. Il TGF- β è una citochina secreta prodotta dalle cellule tumorali con l'abilità di indurre la trasformazione oncogenica *in vitro* di cellule non neoplastiche (129). La famiglia del TGF- β comprende diversi membri coinvolti a diverso titolo in molteplici processi fisiologici, quali la regolazione dello sviluppo embrionale, e in condizioni patologiche come per i tumori (130). Il TGF- β è coinvolto nella progressione tumorale attraverso la regolazione della crescita cellulare, del differenziamento e della migrazione ed è stato inoltre dimostrato che è nella regolazione dell'apoptosi cellulare, dell'EMT e nel rimodellamento della matrice cellulare. Nelle cellule normali, come nei fibroblasti, il TGF- β è un potente attivatore della produzione di matrice. Diversamente, nelle cellule del sistema immunitario, il TGF- β ha un potente effetto soppressivo: inibisce la risposta delle cellule T mediata dai Th-1, espande i Treg e polarizza i macrofagi verso la forma protumorale (139, 131). Nei versamenti pleurici dei pazienti con mesotelioma, il TGF- β è presente ad alti livelli e svolge due funzioni complementari: la creazione di un ambiente soppressivo e parallelamente lo sviluppo di cellule tumorali attraverso l'acquisizione di un fenotipo EMT con la capacità di invadere i tessuti (26, 48, 131, 132).

Nelle cellule bersaglio, il sistema di trasduzione del segnale del TGF- β attraverso la cascata di SMAD, attiva il segnale di ERK e di AKT. In uno studio recente, usando un modello di xenograft di mesotelioma, gli autori hanno dimostrato che il trattamento con pirfenidone (un farmaco anti-

fibrotico) era in grado di bloccare l'up-regolazione di ERK e AKT indotta da TGF- β e di modificare il microambiente tumorale. Le principali modifiche erano una riduzione dell'espressione dei geni associati alla matrice, come i diversi tipi di collagene, le glicoproteine della matrice e gremlin 1 (un antagonista delle proteine morfogeniche dell'osso). Tutte queste molecole sono in grado di modificare le cellule tumorali verso un fenotipo con capacità migratorie ed invasive (133).

A causa di questi effetti pleiotropici, è sempre risultato molto difficile cercare di sviluppare dei farmaci bersaglio-specifici nei confronti del TGF- β . Nonostante queste difficoltà, alcuni tentativi sono stati fatti. Uno studio clinico è stato condotto su un numero esiguo di pazienti affetti da mesotelioma per valutare gli effetti di un anticorpo in grado di neutralizzare l'azione del TGF- β . Non è stata osservata alcuna risposta clinica ma in 5 pazienti su un totale di 13 pazienti trattati sono stati osservati effetti immunoregolatori ed una aumentata produzione di anticorpi contro i lisati delle cellule tumorali. Questi risultati preliminari suggeriscono come sia importante continuare la ricerca e lo sviluppo di composti diretti contro le citochine o i loro recettori per cercare di normalizzare le funzioni del microambiente tumorale (131).

La mesotelina e l'osteopontina sono due glicoproteine della matrice cellulare che sono over-esprese nel mesotelioma e in diversi studi sono state associate con la progressione tumorale. L'osteopontina è prodotta da diversi tipi cellulari, inclusi i macrofagi ed è frequentemente over-espressa nei tumori. È in grado di promuovere le caratteristiche oncogeniche come la proliferazione cellulare, la sopravvivenza, la migrazione e la neo-angiogenesi (135-137). I livelli sierici di osteopontina sono solitamente alti nei MPM, e questa proteina è stata proposta come un marcatore diagnostico o un marcatore di risposta alla terapia (138). Allo stesso modo, i livelli di mesotelina nel sangue sono stati misurati nei pazienti con MPM durante il decorso della chemioterapia. Un aumento del 10% di mesotelina sierica può predire la progressione della malattia con una sensibilità del 96% e una specificità del 74% (139).

5.4 Conclusioni

Il microambiente tumorale del MPM è caratterizzato dalla presenza di un abbondante infiltrato leucocitario, che potremmo definire come l'impronta digitale di un'origine infiammatoria di questo tumore. Le cellule della linea mieloide (macrofagi e MDSC) sono in genere le cellule più abbondanti ed esercitano forti effetti immunosoppressivi sulle cellule T adattative, quelle che invece sono coinvolte in una risposta immunitaria anti-tumorale. I macrofagi promuovono la progressione della malattia favorendo sia la sopravvivenza delle cellule tumorali e la loro proliferazione, sia la stimolazione della neo-angiogenesi. In questo scenario, diverse componenti della cascata infiammatoria (specie chimiche reattive, citochine e chemochine coordinate da IL-1) sono espresse nello stroma tumorale o si accumulano nel versamento pleurico.

Diverse citochine sono state analizzate anche nel plasma dei pazienti affetti da MPM con l'intento di definire dei biomarcatori per la diagnosi precoce o la risposta ai trattamenti. Questi studi, per il momento, non hanno prodotto dei saggi riproducibili e utili dal punto di vista clinico.

A causa delle alterazioni del sistema immunitario indotte dal tumore e della resistenza intrinseca delle cellule del mesotelioma alla terapia anti-proliferativa, è fondamentale riuscire a pianificare nuove strategie terapeutiche. In pazienti affetti da mesotelioma è attualmente in fase di valutazione l'immunoterapia basata sull'utilizzo di anticorpi contro gli inibitori dei *checkpoints*. Vista la sua natura infiammatoria, sarebbe ragionevole anche valutare nuove strategie terapeutiche che abbiano come bersaglio terapeutico dei precisi circuiti infiammatori, come ad esempio la deplezione o la riprogrammazione dei macrofagi che promuovono i tumori o l'inibizione di specifiche citochine, in particolar modo di IL-1 β che si trova al vertice della cascata infiammatoria. La recente disponibilità di diversi farmaci a bersaglio noto e il continuo aumento delle conoscenze cliniche sulla possibilità di migliorare le combinazioni terapeutiche, giustifica oggi la speranza che questo tumore possa in futuro essere trattato in modo migliore di quanto fatto fino ad ora.

Ringraziamenti: Cristina Belgiovine è intestataria di una borsa di studio della Fondazione Veronesi, Milano Italia.

Referenze

1. Liu G, Cheres P, Kamp DW. Molecular basis of asbestos-induced lung disease. *Annu Rev Pathol.* 2013;8:161–87.
2. Mossman BT, Churg A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998;157(5 Pt 1):1666–80.
3. Mossman BT, Lippmann M, Hesterberg TW, Kelsey KT, Barchowsky A, Bonner JC. Pulmonary endpoints (lung carcinomas and asbestosis) following inhalation exposure to asbestos. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2011;14(1–4):76–121.
4. Bograd AJ, Suzuki K, Vertes E, Colovos C, Morales EA, Sadelain M, et al. Immune responses and immunotherapeutic interventions in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60(11):1509–27.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011;144(5):646–74.
6. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):436–44.
7. Aggarwal BB, Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(4):351–69.
8. Thompson JK, Westbom CM, Shukla A. Malignant mesothelioma: development to therapy. *J Cell Biochem.* 2014;115(1):1–7.
9. Izzi V, Masuelli L, Tresoldi I, Foti C, Modesti A, Bei R. Immunity and malignant mesothelioma: from mesothelial cell damage to tumor development and immune response-based therapies. *Cancer Lett.* 2012;322(1):18–34.
10. Solbes E, Harper RW. Biological responses to asbestos inhalation and pathogenesis of asbestos-related benign and malignant disease. *J Investig Med.* 2018;66(4):721–7.
11. Yap TA, Aerts JG, Popat S, Fennell DA. Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat Rev Cancer.* 2017;17(8):475–88.
12. Minnema-Luiting J, Vroman H, Aerts J, Cornelissen R. Heterogeneity in immune cell content in malignant pleural mesothelioma. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4):1041.
13. Dostert C, Petrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* 2008;320(5876):674–7.
14. Sekido Y. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis.* 2013;34(7):1413–9.
15. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;14(7):399–416.
16. Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(3):409–16.
17. Conti I, Rollins BJ. CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(3):149–54.
18. Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(2):73–86.
19. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014;41(1):14–20.
20. Burt BM, Rodig SJ, Tilleman TR, Elbardissi AW, Bueno R, Sugarbaker DJ. Circulating and tumor-infiltrating myeloid cells predict survival in human pleural mesothelioma. *Cancer.* 2011;117(22):5234–44.
21. Cornelissen R, Lievens LA, Maat AP, Hendriks RW, Hoogsteden HC, Bogers AJ, et al. Ratio of intratumoral macrophage phenotypes is a prognostic factor in epithelioid malignant pleural mesothelioma. *PLoS One.* 2014;9(9):e106742.
22. Ujiie H, Kadota K, Nitadori JI, Aerts JG, Woo KM, Sima CS, et al. The tumoral and stromal immune microenvironment in malignant pleural mesothelioma: a comprehensive analysis reveals prognostic immune markers. *Oncimmunology.* 2015;4(6):e1009285.
23. Izzi V, Chiurciu V, D'Aquilio F, Palumbo C, Tresoldi I, Modesti A, et al. Differential effects of malignant mesothelioma cells on THP-1 monocytes and macrophages. *Int J Oncol.* 2009;34(2):543–50.
24. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002;23(11):549–55.
25. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell.* 2012;21(3):309–22.
26. Chene AL, d'Almeida S, Blondy T, Tabiasco J, Deshayes S, Fonteneau JF, et al. Pleural effusions from patients with mesothelioma induce recruitment of monocytes and their differentiation into M2 macrophages. *J Thorac Oncol.* 2016;11(10):1765–73.
27. Baratelli F, Lin Y, Zhu L, Yang SC, Heuze-Vourc'h N, Zeng G, et al. Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *J Immunol.* 2005;175(3):1483–90.

28. Marcq E, Siozopoulou V, De Waele J, van Audenaerde J, Zwaenepoel K, Santermans E, et al. Prognostic and predictive aspects of the tumor immune microenvironment and immune checkpoints in malignant pleural mesothelioma. *Oncoimmunology*. 2017;6(1):e1261241.
29. Chee SJ, Lopez M, Mellows T, Gankande S, Moutasim KA, Harris S, et al. Evaluating the effect of immune cells on the outcome of patients with mesothelioma. *Br J Cancer*. 2017;117(9):1341–8.
30. Awad MM, Jones RE, Liu H, Lizotte PH, Ivanova EV, Kulkarni M, et al. Cytotoxic T cells in PD-L1-positive malignant pleural mesotheliomas are counterbalanced by distinct immunosuppressive factors. *Cancer Immunol Res*. 2016;4(12):1038–48.
31. Veltman JD, Lambers ME, van Nimwegen M, Hendriks RW, Hoogsteden HC, Hegmans JP, et al. Zoledronic acid impairs myeloid differentiation to tumour-associated macrophages in mesothelioma. *Br J Cancer*. 2010;103(5):629–41.
32. Tanrikulu AC, Abakay A, Komek H, Abakay O. Prognostic value of the lymphocyte-to-monocyte ratio and other inflammatory markers in malignant pleural mesothelioma. *Environ Health Prev Med*. 2016;21(5):304–11.
33. Kao SC, Klebe S, Henderson DW, Reid G, Chatfield M, Armstrong NJ, et al. Low calretinin expression and high neutrophil-to-lymphocyte ratio are poor prognostic factors in patients with malignant mesothelioma undergoing extrapleural pneumonectomy. *J Thorac Oncol*. 2011;6(11):1923–9.
34. Mondanelli G, Bianchi R, Pallotta MT, Orabona C, Albini E, Iacono A, et al. A relay pathway between arginine and tryptophan metabolism confers immunosuppressive properties on dendritic cells. *Immunity*. 2017;46(2):233–44.
35. Sica A, Strauss L, Consonni FM, Travelli C, Genazzani A, Porta C. Metabolic regulation of suppressive myeloid cells in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2017;35:27–35.
36. Veltman JD, Lambers ME, van Nimwegen M, Hendriks RW, Hoogsteden HC, Aerts JG, et al. COX-2 inhibition improves immunotherapy and is associated with decreased numbers of myeloid-derived suppressor cells in mesothelioma. Celecoxib influences MDSC function. *BMC Cancer*. 2010;10:464.
37. Riganti C, Lingua MF, Salaroglio IC, Falcomata C, Righi L, Morena D, et al. Bromodomain inhibition exerts its therapeutic potential in malignant pleural mesothelioma by promoting immunogenic cell death and changing the tumor immune-environment. *Oncoimmunology*. 2018;7(3):e1398874.
38. Friedman KM, Prieto PA, Devillier LE, Gross CA, Yang JC, Wunderlich JR, et al. Tumor-specific CD4+ melanoma tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunother*. 2012;35(5):400–8.
39. Van Acker HH, Capsomidis A, Smits EL, Van Tendeloo VF. CD56 in the immune system: more than a marker for cytotoxicity? *Front Immunol*. 2017;8:892.
40. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565–70.
41. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960–4.
42. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med*. 2015;21(8):938–45.
43. Leigh RA, Webster I. Lymphocytic infiltration of pleural mesothelioma and its significance for survival. *S Afr Med J*. 1982;61(26):1007–9.
44. Anraku M, Cunningham KS, Yun Z, Tsao MS, Zhang L, Keshavjee S, et al. Impact of tumor-infiltrating T cells on survival in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;135(4):823–9.
45. Yamada N, Oizumi S, Kikuchi E, Shinagawa N, Konishi-Sakakibara J, Ishimine A, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection. *Cancer Immunol Immunother*. 2010;59(10):1543–9.
46. Marcq E, Waele J, Audenaerde JV, Lion E, Santermans E, Hens N, et al. Abundant expression of TIM-3, LAG-3, PD-1 and PD-L1 as immunotherapy checkpoint targets in effusions of mesothelioma patients. *Oncotarget*. 2017;8(52):89722–35.
47. Pasello G, Zago G, Lunardi F, Urso L, Kern I, Vlacic G, et al. Malignant pleural mesothelioma immune microenvironment and checkpoint expression: correlation with clinical-pathological features and intratumor heterogeneity over time. *Ann Oncol*. 2018;29(5):1258–65.
48. Lievens LA, Cornelissen R, Bezemer K, Kaijen-Lambers ME, Hegmans JP, Aerts JG. Pleural effusion of patients with malignant mesothelioma induces macrophage-mediated T cell suppression. *J Thorac Oncol*. 2016;11(10):1755–64.
49. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887–95.
50. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(49):17174–9.
51. Ribas A, Kirkwood JM, Flaherty KT. Anti-PD-1 antibody treatment for melanoma. *Lancet Oncol*. 2018;19(5):e219.
52. Allison JP. Checkpoints. *Cell*. 2015;162(6):1202–5.
53. Ceresoli GL, Mantovani A. Immune checkpoint inhibitors in malignant pleural mesothelioma. *Lancet Oncol*. 2017;18(5):559–61.

54. Patil NS, Righi L, Koeppen H, Zou W, Izzo S, Grosso F, et al. Molecular and histopathological characterization of the tumor immune microenvironment in advanced stage of malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2018;13(1):124–33.
55. Combaz-Lair C, Galateau-Salle F, McLeer-Florin A, Le Stang N, David-Boudet L, Duruisseaux M, et al. Immune biomarkers PD-1/PD-L1 and TLR3 in malignant pleural mesotheliomas. *Hum Pathol.* 2016;52:9–18.
56. Cedres S, Ponce-Aix S, Zugazagoitia J, Sansano I, Enguita A, Navarro-Mendivil A, et al. Analysis of expression of programmed cell death 1 ligand 1 (PDL1) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *PLoS One.* 2015;10(3):e0121071.
57. Inaguma S, Lasota J, Wang Z, Czapiewski P, Langfort R, Rys J, et al. Expression of ALCAM (CD166) and PD-L1 (CD274) independently predicts shorter survival in malignant pleural mesothelioma. *Hum Pathol.* 2018;71:1–7.
58. Mansfield AS, Roden AC, Peikert T, Sheinin YM, Harrington SM, Krco CJ, et al. B7-H1 expression in malignant pleural mesothelioma is associated with sarcomatoid histology and poor prognosis. *J Thorac Oncol.* 2014;9(7):1036–40.
59. Khanna S, Thomas A, Abate-Daga D, Zhang J, Morrow B, Steinberg SM, et al. Malignant mesothelioma effusions are infiltrated by CD3(+) T cells highly expressing PD-L1 and the PD-L1(+) tumor cells within these effusions are susceptible to ADCC by the anti-PD-L1 antibody avelumab. *J Thorac Oncol.* 2016;11(11):1993–2005.
60. Cedres S, Ponce-Aix S, Pardo-Aranda N, Navarro-Mendivil A, Martinez-Marti A, Zugazagoitia J, et al. Analysis of expression of PTEN/PI3K pathway and programmed cell death ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *Lung Cancer.* 2016;96:1–6.
61. Lizotte PH, Jones RE, Keogh L, Ivanova E, Liu H, Awad MM, et al. Fine needle aspirate flow cytometric phenotyping characterizes immunosuppressive nature of the mesothelioma microenvironment. *Sci Rep.* 2016;6:31745.
62. Lee HS, Jang HJ, Choi JM, Zhang J, de Rosen VL, Wheeler TM, et al. Comprehensive immunoproteogenomic analyses of malignant pleural mesothelioma. *JCI insight.* 2018;3(7):98575.
63. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(4):298–306.
64. Di Caro G, Bergomas F, Grizzi F, Doni A, Bianchi P, Malesci A, et al. Occurrence of tertiary lymphoid tissue is associated with T-cell infiltration and predicts better prognosis in early-stage colorectal cancers. *Clin Cancer Res.* 2014;20(8):2147–58.
65. Castino GF, Cortese N, Capretti G, Serio S, Di Caro G, Mineri R, et al. Spatial distribution of B cells predicts prognosis in human pancreatic adenocarcinoma. *Oncoimmunology.* 2016;5(4):e1085147.
66. Hegmans JP, Hemmes A, Hammad H, Boon L, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Mesothelioma environment comprises cytokines and T-regulatory cells that suppress immune responses. *Eur Respir J.* 2006;27(6):1086–95.
67. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(3):203–13.
68. Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Matsuzaki H, Lee S, Maeda M, Kishimoto T, et al. Functional alteration of natural killer cells and cytotoxic T lymphocytes upon asbestos exposure and in malignant mesothelioma patients. *Biomed Res Int.* 2015;2015:238431.
69. Vacca P, Martini S, Garelli V, Passalacqua G, Moretta L, Mingari MC. NK cells from malignant pleural effusions are not anergic but produce cytokines and display strong antitumor activity on short-term IL-2 activation. *Eur J Immunol.* 2013;43(2):550–61.
70. Manning CB, Vallyathan V, Mossman BT. Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development. *Int Immunopharmacol.* 2002;2(2–3):191–200.
71. Matsuzaki H, Maeda M, Lee S, Nishimura Y, Kumagai-Takei N, Hayashi H, et al. Asbestos-induced cellular and molecular alteration of immunocompetent cells and their relationship with chronic inflammation and carcinogenesis. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:492608.
72. Shukla A, Gulumian M, Hei TK, Kamp D, Rahman Q, Mossman BT. Multiple roles of oxidants in the pathogenesis of asbestos-induced diseases. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(9):1117–29.
73. Iovine NM, Pursnani S, Voldman A, Wasserman G, Blaser MJ, Weinrauch Y. Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* 2008;76(3):986–93.
74. Benedetti S, Nuvoli B, Catalani S, Galati R. Reactive oxygen species a double-edged sword for mesothelioma. *Oncotarget.* 2015;6(19):16848–65.
75. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis.* 2009;30(7):1073–81.
76. Marczyński B, Czuppon AB, Marek W, Reichel G, Baur X. Increased incidence of DNA double-strand breaks and anti-ds DNA antibodies in blood of workers occupationally exposed to asbestos. *Hum Exp Toxicol.* 1994;13(1):3–9.
77. Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, Elmishad AG, Chen Y, Liu Z, et al. TNF-alpha inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF-kappaB-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(27):10397–402.
78. Kamp DW, Graceffa P, Pryor WA, Weitzman SA. The role of free radicals in asbestos-induced diseases. *Free Radic Biol Med.* 1992;12(4):293–315.

79. Maples KR, Johnson NF. Fiber-induced hydroxyl radical formation: correlation with mesothelioma induction in rats and humans. *Carcinogenesis*. 1992;13(11):2035–9.
80. Hardy JA, Aust AE. The effect of iron binding on the ability of crocidolite asbestos to catalyze DNA single-strand breaks. *Carcinogenesis*. 1995;16(2):319–25.
81. Chew SH, Toyokuni S. Malignant mesothelioma as an oxidative stress-induced cancer: an update. *Free Radic Biol Med*. 2015;86:166–78.
82. Hillegass JM, Miller JM, MacPherson MB, Westbom CM, Sayan M, Thompson JK, et al. Asbestos and erionite prime and activate the NLRP3 inflammasome that stimulates autocrine cytokine release in human mesothelial cells. *Part Fibre Toxicol*. 2013;10:39.
83. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*. 2013;39(6):1003–18.
84. Murphy FA, Poland CA, Duffin R, Donaldson K. Length-dependent pleural inflammation and parietal pleural responses after deposition of carbon nanotubes in the pulmonary airspaces of mice. *Nanotoxicology*. 2013;7(6):1157–67.
85. Mantovani A, Barajon I, Garlanda C. IL-1 and IL-1 regulatory pathways in cancer progression and therapy. *Immunol Rev*. 2018;281(1):57–61.
86. Thompson JK, MacPherson MB, Beuschel SL, Shukla A. Asbestos-induced mesothelial to fibroblastic transition is modulated by the inflammasome. *Am J Pathol*. 2017;187(3):665–78.
87. Westbom C, Thompson JK, Leggett A, MacPherson M, Beuschel S, Pass H, et al. Inflammasome modulation by chemotherapeutics in malignant mesothelioma. *PLoS One*. 2015;10(12):e0145404.
88. Ridker PM, MacFadyen JG, Thuren T, Everett BM, Libby P, Glynn RJ. Effect of interleukin-1beta inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*. 2017;390(10105):1833–42.
89. Kadariya Y, Menges CW, Talarchek J, Cai KQ, Klein-Szanto AJ, Pietrofesa RA, et al. Inflammation-related IL1beta/IL1R signaling promotes the development of asbestos-induced malignant mesothelioma. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2016;9(5):406–14.
90. Judge S, Thomas P, Govindarajan V, Sharma P, Loggie B. Malignant peritoneal mesothelioma: characterization of the inflammatory response in the tumor microenvironment. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(5):1496–500.
91. Gavett SH, Parkinson CU, Willson GA, Wood CE, Jarabek AM, Roberts KC, et al. Persistent effects of Libby amphibole and amosite asbestos following subchronic inhalation in rats. *Part Fibre Toxicol*. 2016;13:17.
92. Fukagawa NK, Li M, Sabo-Attwood T, Timblin CR, Butnor KJ, Gagne J, et al. Inhaled asbestos exacerbates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice via CD4+ T cells. *Environ Health Perspect*. 2008;116(9):1218–25.
93. Dragon J, Thompson J, MacPherson M, Shukla A. Differential susceptibility of human pleural and peritoneal mesothelial cells to asbestos exposure. *J Cell Biochem*. 2015;116(8):1540–52.
94. Guo Y, Xu F, Lu T, Duan Z, Zhang Z. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treat Rev*. 2012;38(7):904–10.
95. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(11):798–809.
96. Bielefeldt-Ohmann H, Marzo AL, Himbeck RP, Jarnicki AG, Robinson BW, Fitzpatrick DR. Interleukin-6 involvement in mesothelioma pathobiology: inhibition by interferon alpha immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 1995;40(4):241–50.
97. Monti G, Jaurand MC, Monnet I, Chretien P, Saint-Etienne L, Zeng L, et al. Intrapleural production of interleukin 6 during mesothelioma and its modulation by gamma-interferon treatment. *Cancer Res*. 1994;54(16):4419–23.
98. Nakano T, Chahinian AP, Shinjo M, Tonomura A, Miyake M, Togawa N, et al. Interleukin 6 and its relationship to clinical parameters in patients with malignant pleural mesothelioma. *Br J Cancer*. 1998;77(6):907–12.
99. Schmitter D, Lauber B, Fagg B, Stahel RA. Hematopoietic growth factors secreted by seven human pleural mesothelioma cell lines: interleukin-6 production as a common feature. *Int J Cancer*. 1992;51(2):296–301.
100. Adachi Y, Aoki C, Yoshio-Hoshino N, Takayama K, Curiel DT, Nishimoto N. Interleukin-6 induces both cell growth and VEGF production in malignant mesotheliomas. *Int J Cancer*. 2006;119(6):1303–11.
101. Adachi Y, Yoshio-Hoshino N, Aoki C, Nishimoto N. VEGF targeting in mesotheliomas using an interleukin-6 signal inhibitor based on adenovirus gene delivery. *Anticancer Res*. 2010;30(6):1947–52.
102. Kao SC-H, Harvie R, Paturi F, Taylor R, Davey R, Abraham R, et al. The predictive role of serum VEGF in an advanced malignant mesothelioma patient cohort treated with thalidomide alone or combined with cisplatin/gemcitabine. *Lung Cancer*. 2012;75(2):248–54.
103. Abdul Rahim SN, Ho GY, Coward JJ. The role of interleukin-6 in malignant mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res*. 2015;4(1):55–66.
104. Gueugnon F, Leclercq S, Blanquart C, Sagan C, Cellier L, Padiou M, et al. Identification of novel markers for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Pathol*. 2011;178(3):1033–42.
105. Thomas R, Cheah HM, Creaney J, Turlach BA, Lee YC. Longitudinal measurement of pleural fluid biochemistry and cytokines in malignant pleural effusions. *Chest*. 2016;149(6):1494–500.
106. Mantovani A, Savino B, Locati M, Zampataro L, Allavena P, Bonocchi R. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2010;21(1):27–39.

107. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532–5.
108. Ostrand-Rosenberg S. Immune surveillance: a balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev*. 2008;18(1):11–8.
109. Fridlender ZG, Sun J, Mishalian I, Singhal S, Cheng G, Kapoor V, et al. Transcriptomic analysis comparing tumor-associated neutrophils with granulocytic myeloid-derived suppressor cells and normal neutrophils. *PLoS One*. 2012;7(2):e31524.
110. Haegens A, Barrett TF, Gell J, Shukla A, Macpherson M, Vacek P, et al. Airway epithelial NF-kappaB activation modulates asbestos-induced inflammation and mucin production in vivo. *J Immunol*. 2007;178(3):1800–8.
111. Hillegass JM, Shukla A, Lathrop SA, MacPherson MB, Beuschel SL, Butnor KJ, et al. Inflammation precedes the development of human malignant mesotheliomas in a SCID mouse xenograft model. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1203:7–14.
112. Galffy G, Mohammed KA, Nasreen N, Ward MJ, Antony VB. Inhibition of interleukin-8 reduces human malignant pleural mesothelioma propagation in nude mouse model. *Oncol Res*. 1999;11(4):187–94.
113. di Martino S, Amoreo CA, Nuvoli B, Galati R, Strano S, Facciolo F, et al. HSP90 inhibition alters the chemotherapy-driven rearrangement of the oncogenic secretome. *Oncogene*. 2018;37(10):1369–85.
114. Antony VB, Hott JW, Godbey SW, Holm K. Angiogenesis in mesotheliomas: role of mesothelial cell derived IL-8. *Chest*. 1996;109(3, Supplement):21S–2S.
115. Galffy G, Mohammed KA, Dowling PA, Nasreen N, Ward MJ, Antony VB. Interleukin 8: an autocrine growth factor for malignant mesothelioma. *Cancer Res*. 1999;59(2):367–71.
116. Canino C, Mori F, Cambria A, Diamantini A, Germoni S, Alessandrini G, et al. SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells. *Oncogene*. 2012;31(26):3148–63.
117. Wiseman BS, Werb Z. Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*. 2002;296(5570):1046–9.
118. Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(9):582–98.
119. Li Q, Wang W, Yamada T, Matsumoto K, Sakai K, Bando Y, et al. Pleural mesothelioma instigates tumor-associated fibroblasts to promote progression via a malignant cytokine network. *Am J Pathol*. 2011;179(3):1483–93.
120. Lo A, Wang LS, Scholler J, Monslow J, Avery D, Newick K, et al. Tumor-promoting desmoplasia is disrupted by depleting FAP-expressing stromal cells. *Cancer Res*. 2015;75(14):2800–10.
121. Comar M, Zanotta N, Zanconati F, Cortale M, Bonotti A, Cristaudo A, et al. Chemokines involved in the early inflammatory response and in pro-tumoral activity in asbestos-exposed workers from an Italian coastal area with territorial clusters of pleural malignant mesothelioma. *Lung Cancer*. 2016;94:61–7.
122. Rizwan M, Ajay K, SuTao Z, Guangbin X, Pierluigi S, Lynne SD, et al. Malignant mesothelioma growth inhibition by agents that target the VEGF and VEGF-C autocrine loops. *Int J Cancer*. 2003;104(5):603–10.
123. Strizzi L, Catalano A, Vianale G, Orecchia S, Casalini A, Tassi G, et al. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor in human malignant mesothelioma. *J Pathol*. 2001;193(4):468–75.
124. Van TT, Hanibuchi M, Goto H, Kuramoto T, Yukishige S, Kakiuchi S, et al. SU6668, a multiple tyrosine kinase inhibitor, inhibits progression of 84 human malignant pleural mesothelioma in an orthotopic model. *Respirology*. 2012;17(6):984–90.
125. Safi A, Sadmi M, Martinet N, Menard O, Vaillant P, Gallati H, et al. Presence of elevated levels of platelet-derived growth factor (PDGF) in lung adenocarcinoma pleural effusions. *Chest*. 1992;102(1):204–7.
126. Edwards JG, Cox G, Andi A, Jones JL, Walker RA, Waller DA, et al. Angiogenesis is an independent prognostic factor in malignant mesothelioma. *Br J Cancer*. 2001;85(6):863–8.
127. Wang LC, Lo A, Scholler J, Sun J, Majumdar RS, Kapoor V, et al. Targeting fibroblast activation protein in tumor stroma with chimeric antigen receptor T cells can inhibit tumor growth and augment host immunity without severe toxicity. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(2):154–66.
128. Meerang M, Berard K, Felley-Bosco E, Lauk O, Vrugt B, Boss A, et al. Antagonizing the hedgehog pathway with vismodegib impairs malignant pleural mesothelioma growth in vivo by affecting stroma. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(5):1095–105.
129. Moses HL, Roberts AB, Derynck R. The discovery and early days of TGF-beta: a historical perspective. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2016;8(7):a021865.
130. Akhurst RJ, Hata A. Targeting the TGFbeta signaling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11(10):790–811.
131. Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(11):788–99.
132. Nishimura Y, Maeda M, Kumagai-Takei N, Lee S, Matsuzaki H, Wada Y, et al. Altered functions of alveolar macrophages and NK cells involved in asbestos-related diseases. *Environ Health Prev Med*. 2013;18(3):198–204.
133. Li C, Rezov V, Joensuu E, Vartiainen V, Ronty M, Yin M, et al. Pirfenidone decreases mesothelioma cell proliferation and migration via inhibition of ERK and AKT and regulates mesothelioma tumor microenvironment in vivo. *Sci Rep*. 2018;8(1):10070.

134. Stevenson JP, Kindler HL, Papasavvas E, Sun J, Jacobs-Small M, Hull J, et al. Immunological effects of the TGFbeta-blocking antibody GC1008 in malignant pleural mesothelioma patients. *Oncoimmunology*. 2013;2(8):e26218.
135. Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Van Eman MR, Fisher LW. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7(12):4060–6.
136. Shevde LA, Samant RS. Role of osteopontin in the pathophysiology of cancer. *Matrix Biol*. 2014;37:131–41.
137. Robinson BW, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk AW, de Klerk N, et al. Soluble mesothelin-related protein--a blood test for mesothelioma. *Lung Cancer*. 2005;49(Suppl 1):S109–11.
138. Pass HI, Lott D, Lonardo F, Harbut M, Liu Z, Tang N, et al. Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. *N Engl J Med*. 2005;353(15):1564–73.
139. Arnold DT, De Fonseca D, Hamilton FW, Rahman NM, Maskell NA. Prognostication and monitoring of mesothelioma using biomarkers: a systematic review. *Br J Cancer*. 2017;116(6):731–41.

Capitolo 6

MODELLI PRECLINICI DI MESOTELIOMA

Ilaria Fuso Nerini e Roberta Frapolli

6.1 Introduzione

Il mesotelioma maligno (MM) è un tumore molto aggressivo la cui patogenesi è legata all'esposizione all'asbesto. La combinazione di cisplatino e pemetrexed è la terapia di prima linea, ma in molti casi si ottengono risposte brevi e sono disponibili solo poche opzioni per il trattamento di seconda linea. Di conseguenza il MM è caratterizzato da una prognosi infausta, con una sopravvivenza mediana attorno ai 12-16 mesi. Le aumentate conoscenze sui meccanismi molecolari che conducono allo sviluppo del MM hanno stimolato il disegno di diversi studi clinici rivolti a colpire specifici bersagli molecolari, ma l'impatto sulla sopravvivenza a lungo termine dei pazienti è stato trascurabile. Solo l'aggiunta del bevacizumab al regime di prima linea ha condotto ad un minimo ma significativo aumento della sopravvivenza di 2-3 mesi (1).

I benefici dell'immunoterapia sono stati deludenti e sebbene gli inibitori dei checkpoints immunologici vengano considerati un'opzione per la terapia di seconda linea, la loro efficacia non è ancora stata dimostrata (2). Vi è quindi un bisogno pressante di nuovi trattamenti per il MM.

Gli studi clinici, nei pazienti affetti da MM, presentano alcune difficoltà per le seguenti ragioni:

1. Il MM è un tumore raro quindi, negli studi, possono essere randomizzati pochi pazienti.
2. Per campionare le lesioni neoplastiche sono necessarie procedure invasive, riducendo la possibilità di raccogliere biopsie durante l'evoluzione del tumore e/o la risposta alle terapie.
3. La modalità di crescita del MM, insieme alla presenza di fibrosi, inspessimento pleurico ed effusione pleurica, rende complicata la valutazione della risposta clinica a causa della difficile quantificazione del carico tumorale.

Sono quindi necessari studi preclinici per approfondire le nostre conoscenze di questa malattia. Nonostante le inevitabili limitazioni intrinseche, i modelli sperimentali possono riprodurre le principali caratteristiche del MM e darci la possibilità di colmare alcune lacune sulla patogenesi, sulle lesioni molecolari e sulla complessità del microambiente di questa malattia. Inoltre, possono essere utili per identificare biomarcatori prognostici/predittivi e per valutare nuove strategie terapeutiche.

In questo capitolo presentiamo una panoramica dei principali modelli preclinici di MM in vitro e in vivo, con particolare attenzione ai loro vantaggi e difetti. Per ciascun modello forniremo la nostra visione critica delle potenziali applicazioni e dei limiti nell'estrapolazione alla clinica, in quanto la scelta del miglior modello per ciascun esperimento è cruciale per ottenere risultati realistici. Approfondimenti su questo argomento possono essere trovati nelle revisioni di Singh (3) e Robinson (4).

6.2 Modelli di Mesotelioma Maligno in vitro

Ad aprile 2019 il Cellosaurus elencava 473 linee cellulari di MM (<http://web.expasy.org/cgi-bin/cellosaurus/search>) di cui 433 di origine umana, 31 murina, 8 di ratto e 1 di trota iridea. Molte altre linee cellulari sono state probabilmente generate e mantenute esclusivamente nei laboratori che le hanno sviluppate.

6.2.1.1 Colture cellulari primarie umane

Le colture primarie derivano da cellule provenienti direttamente da biopsie chirurgiche o da effusioni pleuriche. La procedura per ottenere le colture primarie prevede generalmente alcuni

passaggi: (1) frammentazione del tessuto in piccoli pezzi di 1-3 mm, (2) incubazione facoltativa con collagenasi o dispasi, (3) filtrazione attraverso un setaccio cellulare e (4) aggiunta della sospensione cellulare ottenuta al terreno di coltura con l'aggiunta di integratori speciali (e.g. idrocortisone, fattore di crescita epidermico, eparina, insulina, transferrina, selenio e betamercaptoetanolo) oltre al siero fetale bovino.

Il mantenimento di subculture è possibile solo per un numero limitato di passaggi (generalmente per espandere il numero di cellule ed eliminare i fibroblasti contaminanti), per un totale di circa 15 raddoppi della popolazione corrispondente, approssimativamente, ad una sopravvivenza della coltura di 1 mese. Altri metodi di preparazione prevedono la separazione delle cellule con una morfologia simil-epiteliale dalla massa tumorale attraverso un raschiamento meccanico seguito da una selezione sfruttando la diversa capacità di adesione (5).

L'immortalizzazione spontanea delle culture primarie è un evento molto più frequente nel MM rispetto ad altri istotipi tumorali. Le linee cellulari stabili hanno un potenziale di crescita pressoché illimitato e rappresentano uno dei modelli di prima scelta per la ricerca preclinica. Esse infatti sono facili da manipolare, hanno una resa elevata e sono utili per studiare i meccanismi di progressione e aggressività tumorale, e la risposta ai farmaci.

Le linee cellulari devono essere caratterizzate e monitorate nel tempo per confermarne la capacità di riprodurre il sottotipo tumorale d'origine. La caratterizzazione comprende generalmente l'analisi del profilo di immunoreattività tipico del MM (e.g. mesotelina, calretinina, 5T4, podoplanina, citocheratine e HBME1), del cariotipo, dei polimorfismi delle brevi sequenze ripetute in tandem (Short Tandem Repeats, STR) e dei singoli nucleotidi. Ulteriori caratterizzazioni includono la tipizzazione del sistema degli antigeni leucocitari umani, la microscopia elettronica e il sequenziamento dell'intero esoma.

Sono stati fatti molti sforzi per sviluppare grandi collezioni di linee cellulari stabili di MM e grazie alla disponibilità di materiale biotico, spesso sono stati associati con l'ottenimento di biobanche (raccolte di tessuto tumorale e sangue di pazienti con MM, legate a dettagliati database clinici). La UK Mesobank è il risultato di uno sforzo nazionale condotto nel Regno Unito, che ha portato alla raccolta di 26 culture primarie di MM (<http://www.mesobank.com>) (6). Altre 159 colture primarie sono state ottenute da campioni di MM umano da Oehl et al. (7).

6.2.1.2 Linee cellulari umane ottenute tramite trasformazione in vitro

La sfida principale nell'ottenere nuovi modelli di MM in vitro è la selezione del materiale biologico di partenza più adatto. Sebbene questo sia un problema anche per molti altri istotipi tumorali, nel caso del MM è ancora più complesso in quanto la cellula da cui origina è ancora incerta. La maggior parte degli studi assume che il MM origini dalla cellula mesoteliale pleurica, mentre altri ricercatori credono che altre tipologie cellulari siano responsabili dello sviluppo del MM (e.g. cellule progenitrici mesoteliali).

La mancanza di un accordo generale sulla definizione di trasformazione cellulare complica ulteriormente l'interpretazione dei risultati.

La trasformazione delle cellule in vitro può essere stimolata tramite l'esposizione all'asbesto. Tuttavia, l'efficienza della trasformazione è bassa in quanto le cellule mesoteliali umane sono molto sensibili all'asbesto e la loro esposizione alla fibra causa morte cellulare. A differenza dell'asbesto, l'erionite è poco citotossica e una lunga esposizione delle cellule ne causa frequentemente la trasformazione. Alcuni lavori riportano che, per innescare la trasformazione in vitro, sono necessarie le citochine infiammatorie quali IL-1 β e TNF- α . La co-coltura delle cellule mesoteliali con i macrofagi le protegge dalla morte indotta da asbesto e innesca la formazione di foci 3D.

Altri modelli in vitro sono stati sviluppati inducendo l'espressione di oncogeni specifici in cellule mesoteliali umane, infatti le tecnologie correnti di ingegneria genetica consentono di introdurre facilmente un numero illimitato di mutazioni. La scelta delle mutazioni adatte a innescare la trasformazione delle cellule rimane comunque una sfida a causa delle nostre scarse conoscenze dell'esatto processo di patogenesi del MM.

- Le cellule MeT-5A sono state ottenute transfettando cellule mesoteliali, provenienti da fluidi pleurici di soggetti non affetti da tumore, con un plasmide contenente l'antigene T del simian virus 40 (SV40) (8). Questo antigene inibisce direttamente gli oncosoppressori p53 e Rb. Il gene virale è inoltre in grado di accelerare il ciclo cellulare delle cellule mesoteliali ma non è sufficiente a trasformarle. Di conseguenza le cellule MeT-5A possono duplicarsi per 60-70 volte prima della senescenza con una sopravvivenza in coltura di circa 5-6 mesi, sono sensibili all'effetto citotossico delle fibre di asbesto e non sono tumorigeniche nei topi.
- Alcuni modelli di oncogenesi del MM comportano l'induzione di ulteriori mutazioni nelle cellule MeT-5A sostenendo l'ipotesi che per produrre un fenotipo maligno sono necessarie mutazioni multiple. Le cellule EJ-ras sono state generate introducendo nelle cellule MeT-5A un'isoforma costitutivamente attivata dell'oncogene p21 ras e possono formare tumori in topi nudi. Le cellule MeT-5A diventano tumorigeniche anche in seguito alla transfezione con il fattore di crescita PDGFA, il cui segnale autocrino ha un ruolo importante nella malignità del MM. Un fenotipo tumorigenico può essere indotto nelle cellule MeT-5A anche attraverso una proteina chimerica in grado di distruggere il complesso DNA metiltransferasi DNMT1/PCNA/ubiquitin-like, probabilmente in seguito a una generale ipometilazione del DNA (3).
- Le cellule LP9 sono cellule mesoteliali peritoneali normali ampiamente caratterizzate (9) che sono state utilizzate come materiale di partenza per creare nuovi modelli di MM attraverso l'introduzione o l'overespressione di oncogeni (e.g. *TERT1*, il dominio catalitico della telomerasi). Alcune linee mesoteliali omentali sono state stabilizzate attraverso un'infezione retrovirale con i geni E6/E7 del papilloma virus umano 16 e *TERT* (5).

6.2.1.3 Linee cellulari murine

Come le linee cellulari umane, anche quelle murine possono essere ottenute isolando le cellule tumorali da MM spontanei o generate tramite trasformazione in vitro di cellule mesoteliali murine (10). Queste linee cellulari presentano le caratteristiche fenotipiche e funzionali del MM e sono state utilizzate in studi in vitro o trapiantate in topi immunocompetenti del genotipo d'origine per studi in vivo. Le linee cellulari AB1, AB12, AB22, 40, 40L, AE17 e AK7 sono state ottenute da MM insorti in seguito al trattamento intraperitoneale dei topi con asbesto (11-13).

La serie di cellule TGM (e.g. TGM299h, TGM304i, TGM270i, TGM299h) sono state originate da topi transgenici che esprimono l'antigene T del virus SV40 (14). Le linee cellulari iMESO sono derivate da topi normali o con mutazione di NF2 immortalizzate con SV40, che mostrano una crescita indipendente dall'ancoraggio, ma non sono tumorigeniche in vivo. Le cellule RN5 originano da topi Nf2+/- ripetutamente esposti alla crocidolite, crescono persistentemente in vitro e sono altamente tumorigeniche in vivo (15).

Il profilo mutazionale di 15 linee cellulari murine derivanti da diversi ceppi murini è stato caratterizzato da Sheddon et al. mediante sequenziamento dell'intero esoma. Dall'analisi delle mutazioni somatiche e delle variazioni del numero di copie geniche è risultato che i MM murini hanno un tasso di mutazioni simile ai MM umani (16).

6.2.2 Colture cellulari in 3D

Le colture cellulari in 3D sono un'evoluzione dei modelli preclinici in vitro che originano dallo sforzo di sviluppare sistemi più accurati per riprodurre le caratteristiche del MM in vivo. Gli sferoidi sono utilizzati per riprodurre giunzioni tra le cellule epiteliali e interazioni tra le cellule tumorali e la matrice extracellulare in un contesto più realistico. Inoltre, dall'esterno all'interno dello sferoide si generano spontaneamente gradienti di concentrazione dei nutrienti e di proliferazione cellulare. Spesso si sviluppano aree centrali di ipossia e necrosi, mimando piccoli tumori privi di vascolarizzazione. Anche la cinetica di diffusione dei farmaci può essere in parte riprodotta con gli sferoidi.

Sono stati sviluppati diversi modelli 3D:

- Gli *sferoidi* si ottengono seminando la sospensione cellulare su una struttura 3D composta da matrici artificiali (e.g. poli HEMA). Si possono formare da linee cellulari immortalizzate o da colture primarie. Una collezione di sferoidi è stata ottenuta da Mazzocchi et al. da cellule derivate da pazienti. Essi mostrano un'elevata eterogeneità cellulare e una risposta variabile alla chemioterapia, in linea con la clinica del tumore d'origine (17).
- Gli *sferoidi da frammento tumorale* (Tumor Fragment spheroids TFS) sono modelli ex vivo di tumore, ottenuti facendo crescere in strutture 3D piccoli frammenti del tessuto tumorale originale. Le cellule tumorali possono formare sferoidi anche in assenza di una matrice artificiale, ma sfruttando l'abilità della cellula tumorale stessa di produrre e organizzare una matrice extracellulare complessa e di creare interazioni cellula-cellula. Le cellule nel TFS mantengono l'eterogeneità genetica ed epigenetica del tumore d'origine. In alcuni casi, i TFS contengono tessuto vitale per settimane o mesi, mentre le cellule disaggregate dallo stesso tumore non riescono a proliferare (18-19). L'analisi del profilo di espressione di culture 2D e 3D ottenute dalla stessa linea cellulare ha consentito di identificare geni (prevalentemente legati all'effetto Warburg) che sono specifici per la struttura biologica in 3D del tumore.
- La tecnologia "organo su chip" consente di integrare la bioingegneria con la micro-fluidica. Oltre alla struttura in 3D e alle interazioni cellula-cellula, queste piattaforme possono combinare parametri complessi, quali la circolazione. Diversi tessuti possono essere fissati sulla stessa piattaforma, consentendo di studiare l'interazione tra le cellule tumorali e diversi tessuti dell'ospite (17-21).

6.2.3 Applicazioni per i modelli in vitro di mesotelioma maligno.

I modelli in vitro sono veloci, riproducibili, economici e possono facilmente essere manipolati geneticamente. Di conseguenza possono essere utilizzati per numerose applicazioni sia nella ricerca di base che traslazionale come ad esempio lo studio del ruolo di geni o pathways specifici nella patogenesi o nell'aggressività del MM. Una proteina mutata con un ruolo chiave nello sviluppo del MM può quindi essere studiata come possibile bersaglio per nuove terapie farmacologiche. Le colture cellulari possono anche essere utilizzate per selezionare nuovi farmaci o combinazioni o per studiarne a fondo il meccanismo d'azione. Un'altra applicazione dei modelli di MM in vitro è l'identificazione di nuovi biomarcatori prognostici o predittivi. In questo caso però la validazione della molecola che conferisce la resistenza/sensibilità ai farmaci può essere effettuata solo in campioni clinici, correlando i suoi livelli di espressione con l'esito clinico. Gli studi in vitro consentono di valutare la risposta delle cellule tumorali a trattamenti farmacologici multipli, cosa non fattibile in clinica. Potenzialmente, potrebbero essere sviluppati modelli co-clinici in vitro (colture cellulari primarie 2D o 3D) per ciascun paziente, per aiutare a predire la risposta individuale ai trattamenti. Inoltre, linee cellulari ottenute dallo stesso paziente a diversi stadi

durante la progressione della malattia, potrebbero essere utili per studiare i meccanismi della resistenza ai farmaci.

Tabella 6.1 Riassunto dei principali vantaggi e svantaggi dei modelli preclinici di MM in vitro e loro principali applicazioni nella ricerca preclinica.

		VANTAGGI	SVANTAGGI	PRINCIPALI APPLICAZIONI
COLTURE CELLULARI 2D	Linee cellulari primarie	<ul style="list-style-type: none"> • Costo-efficacia • Facile elaborazione dei risultati • Stesso genotipo del tessuto parentale, non “dedifferenziate” • Controllo assoluto delle condizioni ambientali 	<ul style="list-style-type: none"> • Sopravvivenza in coltura relativamente breve • Molto suscettibili alle contaminazioni • Bassa riproducibilità, considerevoli differenze nella popolazione e tra le diverse preparazioni • Distribuzione omogenea di nutrienti, scorie e farmaci • Mancanza di una struttura 3D, ridotte interazioni cellula-cellula; substrato di crescita artificiale. 	<p>Studio del ruolo di diversi geni nella progressione del MM</p> <p>Valutare nuove opzioni terapeutiche contro il MM</p> <p>Studiare il meccanismo d’azione di specifici farmaci contro il MM</p> <p>Identificazione e/o validazione di nuovi biomarcatori prognostici/predittivi</p>
	Linee cellulari indotte tramite trasformazione <i>in vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Costo efficacia • Facili da mantenere • Facile elaborazione dei risultati • Possibilità di studi high throughput • Controllo assoluto delle condizioni ambientali • Consentono una facile manipolazione genetica 	<ul style="list-style-type: none"> • Le cellule in coltura si modificano nel tempo (deriva genetica e fenotipica) • Mancanza dell’eterogeneità e della complessità del tumore d’origine; modelli biologicamente meno rilevanti • Mancanza di una struttura 3D, ridotte interazioni cellula-cellula; substrato di crescita artificiale • I meccanismi complessi della biologia del tumore (e.g. angiogenesi, metastasi, pressione interstiziale, interazioni con le componenti mesoteliali e con l’infiltrato immunitario) non possono essere riprodotte • Distribuzione omogenea di nutrienti, scorie e farmaci • Le co-culture non sono in grado di riprodurre un microambiente 	
COLTURE CELLULARI 3D	Sferoidi da line cellulari, sferoidi da frammenti tumorali, organo su chip	<ul style="list-style-type: none"> • Riproducono più accuratamente lo scenario <i>in vivo</i>, la polarizzazione del differenziamento e il comportamento cellulare • Il profilo di espressione genica è più simile a quello dei tumori <i>in vivo</i> • Aumentate interazioni cellula-cellula e cellula - matrice extracellulare • La co-cultura di diverse popolazioni cellulari riproduce meglio il microambiente • Distribuzione eterogenea di nutrienti, scorie e farmaci • Più predittivi della risposta ai farmaci delle colture 2D 	<ul style="list-style-type: none"> • Economicamente più dispendiosi • Sistemi di coltura complessi • Elaborazione dei risultati più complessa 	<p>Analisi della funzionalità genica nella progressione tumorale</p> <p>Studio delle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice extracellulare</p> <p>Studio dell’efficacia terapeutica dei farmaci antitumorale e loro combinazioni</p> <p>Identificazione e/o validazione di nuovi biomarcatori prognostici/predittivi</p>

Vantaggi e svantaggi dei diversi modelli sono riassunti in tabella 6.1. Gli studi in vitro riducono il bisogno di utilizzare esperimenti negli animali, in conformità con i principi delle 3R descritti da Russel and Burch nel 1959 (22). Pur non essendo una vera alternativa, essi possono essere considerati come un approccio complementare ai test in vivo. Uno dei maggiori problemi è che molte delle linee immortalizzate sono state generate diversi anni fa e non rappresentano più il tumore d'origine. Infatti, le cellule mantenute in vitro sono sottoposte ad uno stress selettivo dovuto alla necessità di crescere senza il microambiente tumorale. Di conseguenza, perdono l'eterogeneità tipica del tumore umano e possono subire una deriva genetica diversa rispetto al tumore primario. Questo è un ostacolo importante per gli studi in vitro e insieme alla mancanza delle interazioni tra tumore e stroma ne limita la capacità predittiva dei risultati clinici.

6.3 Modelli di mesotelioma maligno in vivo

6.3.1 Modelli indotti da asbesto

I primi studi epidemiologici che hanno suggerito una relazione tra il rischio di MM e l'esposizione ad asbesto, risalgono agli anni '60 (23-24). Da allora, diversi studi preclinici sono stati effettuati per chiarire la patogenesi di questa neoplasia. Varie specie animali sono state esposte alle fibre di asbesto tramite inalazione (25-27) o iniezioni intrapleurica, intratracheale o intraperitoneale (28-32). L'inalazione è la via più rappresentativa dell'esposizione umana, che avviene principalmente tramite la respirazione delle fibre, ma le procedure sperimentali sono costose e potenzialmente pericolose per i ricercatori e per l'ambiente. Inoltre, l'efficienza di induzione del MM tramite inalazione dell'asbesto è inferiore rispetto alle altre vie di somministrazione (rispettivamente 5% vs 25-98%). D'altra parte, le somministrazioni intrapleurica, intratracheale e intraperitoneale introducono l'asbesto attraverso vie non naturali, esponendo le cellule mesoteliali a concentrazioni di fibre più alte rispetto a quelle raggiunte dall'esposizione umana. Nonostante questi svantaggi, la via intraperitoneale, consentendo una somministrazione semplice, è stata ampiamente utilizzata per studiare la potenziale carcinogenesi di diverse fibre di asbesto. Inoltre, il MM peritoneale, che rappresenta il 10% dei casi di MM, condivide la stessa patogenesi e la scarsa sensibilità ai farmaci con il più comune MM pleurico. Studi nei ratti, indicano una associazione diretta tra la lunghezza delle fibre e la loro tumorigenicità (11, 33-35). A seconda della dose e del tipo di fibra, il 56-97.5% dei ratti esposti sviluppa MM, riproducendo tutte le morfologie osservate nell'uomo (i.e. tubulare, papillare, solido e a cellule fusate) (35,36).

Studi effettuati nei topi dopo iniezione intraperitoneale di asbesto, confermano la relazione tra la lunghezza delle fibre e l'effetto cancerogeno. In questa specie, l'incidenza di MM dopo esposizione ad asbesto è tra il 25% e il 45%, con un periodo di latenza di circa 7 mesi (37,38). Davis et al. hanno descritto la formazione di una densa ascite emorragica e in alcuni casi di masse solide nel peritoneo di topi BALB/c e CBA. Le caratterizzazioni citologiche e ultrastrutturali delle effusioni sierose hanno permesso di identificare tutti e tre i sottotipi istologici di MM (epitelioide, bifasico e sarcomatoide), con una frequenza più alta dell'istotipo epitelioide. Le cellule maligne sono state coltivate in vitro e stabilizzate come linee cellulari, che mantengono la tumorigenicità quando re-inoculate in topi singenici (38).

I modelli indotti da asbesto riproducono bene la patologia umana in quanto si sviluppano in seguito all'esposizione allo stesso agente cancerogeno, hanno un simile processo di sviluppo, la stessa

localizzazione anatomica e morfologia. Tuttavia la bassa penetranza e i lunghi tempi necessari per lo sviluppo del tumore rendono questi modelli di difficile utilizzo per gli studi farmacologici.

6.3.2 Modelli di xenotrapianto

I modelli di xenotrapianto vengono ottenuti iniettando cellule di MM umano in topi immunodeficienti quali topi nudi, SCID o NOD/SCID, per evitare un rigetto del tessuto estraneo. Le cellule possono essere inoculate sottocute o in sede ortotopica, nella cavità pleurica o peritoneale, producendo MM in una percentuale di animali maggiore rispetto ai modelli indotti da asbesto. I tumori ottenuti mantengono la maggior parte delle caratteristiche molecolari e istologiche della malattia umana.

L'ottenimento di xenotrapianti di MM è stato descritto per la prima volta da Chahinian et al. (39), che hanno trapiantato topi nudi BALB/c in sede sottocutanea o intraperitoneale, con campioni tumorali freschi di tre pazienti con MM. Il tasso di successo è stato del 65% per l'inoculo sottocute, mentre non si è osservata crescita tumorale in nessuno degli animali iniettati intraperitoneo. L'analisi istologica dei tumori cresciuti nel topo ha mostrato caratteristiche simili a quelle del tumore originale.

La prima linea cellulare umana è stata stabilizzata da un'effusione pleurica nel 1991 (40), dando il via all'ottenimento di diversi modelli di xenotrapianto. Tuttavia, la sede sottocutanea non riproduce adeguatamente le cavità sierose, quindi sono stati ottenuti modelli più adeguati inoculando le cellule nel peritoneo (41-43). In seguito, è stata descritta la possibilità di effettuare impianti ortotopici di frammenti tumorali derivati da pazienti attraverso una toracotomia (44,45). I tumori ottenuti riproducevano bene il comportamento clinico del MM nei pazienti, con un'estesa diffusione alla cavità pleura ipsilaterale e controlaterale e ai linfonodi mediastinici. Tuttavia l'impianto chirurgico del tumore poteva causare infiammazione, attivazione di processi di riparo dei tessuti e fibrosi, e conseguentemente interferire con il trapianto a causa della produzione di citochine e fattori di crescita. Per evitare questi problemi le cellule di MM sono state inoculate in ratti (46) e topi (47-48) nudi mediante meno invasive iniezioni transtoraciche. Entrambi i modelli mantenevano le caratteristiche patologiche e cliniche del MM.

Complessivamente gli xenotrapianti sono dei buoni strumenti per lo screening farmacologico preclinico, ma devono essere selezionati tenendo ben in mente i seguenti aspetti:

- I passaggi a lungo termine delle linee cellulari riducono l'eterogeneità e conducono ad una deriva genetica causata dall'instabilità genomica, riducendo la capacità di questi modelli preclinici di riprodurre accuratamente il MM clinico. Gli xenotrapianti derivati direttamente da pazienti, nei quali frammenti di tumore umano vengono trapiantati direttamente nei topi immunodeficienti, risolvono questo problema (49).
- La mancanza di un sistema immunitario completamente funzionante può condurre ad un microambiente alterato. Le cellule immunitarie infiltranti il tumore producono citochine, chemochine, proteasi e altre molecole bioattive (specie reattive dell'ossigeno, istamina, ossido nitrico) che possono influenzare il rimodellamento tissutale e la formazione di nuovi vasi, alterando la crescita tumorale, la metastatizzazione e la risposta alla chemioterapia (50). Questo è il principale svantaggio dei modelli di xenotrapianto, soprattutto considerando la crescente importanza dell'immunoterapia in campo oncologico.

6.3.3 Modelli singenici

I modelli singenici sono ottenuti iniettando sottocute o in sede ortotopica, linee cellulari murine in topi con lo stesso corredo genetico (stesso ceppo di topi inbred). Nel 1992 è stata descritta per la

prima volta la stabilizzazione di linee cellulari murine, provenienti dall'ascite di topi BALB/c (i.e. linee AB1, AB2, AB12, AB13 e AB22) e CBA (i.e. linee AC14, AC16, AC28, AC29, AC31, AC32 e AC34). Come nei pazienti, venivano osservati tutti e tre gli istotipi (epitelioide, bifasico e sarcomatoide), con una prevalenza della forma epitelioide (38). Quando iniettate nei topi queste linee cellulari erano tumorigeniche, consentendo di ottenere modelli molto riproducibili in topi immunocompetenti (38). Altri modelli (40, 40L, AE17 e AK7) sono stati descritti in topi C57BL/6 (12,51,52).

Un'ampia caratterizzazione dei modelli AB, AC e AE in vitro e in vivo, supporta l'uso di questi modelli per gli studi farmacologici preclinici (13,16).

Questi modelli preclinici riproducono la malattia umana in presenza di un sistema immunitario proficiente, offrendo strumenti utili per colpire non solo la cellula neoplastica ma anche il complesso microambiente. Usando modelli singenici di MM peritoneale, Miselis et al. hanno dimostrato il contributo dei macrofagi associati al tumore (Tumor Associated Macrophages, TAMs) alla crescita del tumore, alla sua invasività e capacità metastatica (53). Sono anche stati proposti meccanismi dinamici che supportano la progressione tumorale attraverso il progressivo accumulo di cellule immunitarie e stromali dell'ospite e l'espressione di mediatori infiammatori (54,55).

6.3.4 Modelli geneticamente modificati

Meno del 10% della popolazione esposta ad asbesto sviluppa MM, suggerendo come per la sua patogenesi siano necessari altri fattori aggiuntivi. Da un punto di vista genetico questo tumore è caratterizzato da frequenti mutazioni somatiche, principalmente nei loci *NF2*, *CDKN2a/ARF* e *BAP-1* che sono riconosciuti come i principali geni associati alla tumorigenesi del MM (56). Topi transgenici sono stati sviluppati, come modelli per lo studio del MM, introducendo alterazioni nel genoma murino.

Mutazioni dell'oncosoppressore p53 non sono frequenti nei MM, tuttavia topi p53 deficienti hanno una maggior incidenza e una progressione più rapida rispetto ai topi wild-type (57,58).

Altomare et al. hanno descritto un modello murino ottenuto esponendo a trattamenti ripetuti con asbesto topi eterozigoti *Nf2*^(+/-). Hanno osservato una maggior suscettibilità allo sviluppo di MM, con un'incidenza dell'85% nei topi *Nf2*^(+/-) e del 59% nei topi *Nf2*^(+/+) e con una sopravvivenza mediana rispettivamente di 44 e 56 settimane. I tumori ottenuti riproducevano le principali caratteristiche molecolari del MM umano, tra cui l'attivazione di Akt, la delezione in omozigosi degli oncosoppressori p16(Ink4A), p14 (ARF)/p19 (Arf) e p15 (Ink4B) e la perdita della proteina Merlin, codificata da *Nf2* (59).

Topi geneticamente modificati *Ink4a*^(+/-), *Arf*^(+/-) e *Ink4a;Arf*^(+/-) sono stati utilizzati per esaminare l'impatto di queste mutazioni sullo sviluppo di MM in seguito all'esposizione ad asbesto. I risultati ottenuti dimostrano che per la patogenesi del MM può essere necessaria l'inattivazione di *Arf* ma non di *Ink4a*. Nei topi eterozigoti *Ink4a;Arf*^(+/-) dopo esposizione ad asbesto si osserva una inattivazione biallelica dei due oncosoppressori, insieme ad una tumorigenesi più rapida, in accordo con i dati ottenuti in un modello murino condizionale di MM, in cui la perdita di *Ink4a* e *Arf* mediata da adeno-Cre è in grado di causare MM anche in assenza di esposizione ad asbesto (60).

Nel 2011 la mutazione somatica del gene *BAP1* è stata riportata per la prima volta nel MM (61). Nello stesso anno, una mutazione germinale di *BAP1* è stata scoperta in due famiglie statunitensi con un'elevata incidenza di MM nonostante la modesta esposizione ad asbesto (62). In seguito, mutazioni germinali di *BAP1* sono state osservate anche in una famiglia europea, con quattro casi di MM ma senza una nota esposizione all'asbesto (63) portando ad ipotizzare che la mutazione di

BAP1 potesse condurre allo sviluppo del MM anche senza esposizione al cancerogeno. Sono quindi stati generati tre diversi topi eterozigoti per Bap1 (un modello Bap1-null e due modelli knock-in portanti mutazioni analoghe a quelle riportate nelle due famiglie americane). Complessivamente, dopo iniezioni intraperitoneali di asbesto, questi animali mostravano una maggior suscettibilità allo sviluppo di MM con un'incidenza doppia e una sopravvivenza mediana più breve rispetto ai corrispondenti topi wild-type. In assenza di esposizione all'asbesto, circa due terzi degli animali Bap1 sviluppavano tumori spontanei, ma solo in due casi MM, confermando il ruolo fondamentale dell'interazione tra geni e ambiente per la patogenesi del MM (64).

Questi modelli geneticamente modificati hanno aggiunto nuove conoscenze sulla patogenesi, lo sviluppo e la biologia molecolare del MM ma non sono adatti a studi farmacologici a causa dell'elevata incidenza di tumori spontanei e all'incompleta penetranza del MM che non si sviluppa in tutti gli animali. Per superare questo problema è stato generato il topo MexTag, che esprime l'antigene T del virus SV40 nelle cellule mesoteliali. Dopo esposizione ad asbesto questi animali sviluppano tutti il MM con una bassa incidenza di altri tumori e sono quindi utilizzabili per studiare nuovi approcci terapeutici o chemio-preventivi (65).

6.3.5 In vivo imaging dei modelli ortotopici

I tumori sottocutanei possono essere facilmente monitorati utilizzando un calibro che consente un'immediata stima della crescita tumorale e conseguentemente della risposta al trattamento. Questo non è possibile per i modelli ortotopici, dove il carico tumorale può essere valutato solo all'autopsia.

Negli ultimi anni sono state sviluppate tecniche di imaging adatte a piccoli animali, quali la tomografia computerizzata, la tomografia a emissione di positroni (PET), la risonanza magnetica (MRI) e l'imaging ottico che hanno reso possibile misurare la crescita tumorale in modelli ortotopici, superando uno dei principali svantaggi di questi modelli, ossia l'impossibilità di misurare direttamente la crescita tumorale.

Il primo tentativo di seguire la crescita tumorale, dopo un inoculo intratoracico di cellule di MM nel ratto, ha utilizzato radiografie toraciche per confermare la presenza della malattia e rilevare anomalie polmonari e pleuriche. È stato applicato un punteggio e correlato allo stato clinico degli animali (46). Più recentemente, per visualizzare la crescita tumorale in modelli preclinici di MM è stata utilizzata la PET (66,67) ma, sfortunatamente, nonostante la sua potenziale traslabilità dal piccolo animale al paziente, questa tecnica necessita una strumentazione molto costosa e un ciclotrone per la produzione dei radionuclidi, limitando la sua applicazione a strutture associate a centri clinici. L'imaging ottico può visualizzare la crescita tumorale rilevando segnali di fluorescenza o bioluminescenza derivanti dalle cellule tumorali, opportunamente ingegnerizzate per esprimere la luciferasi o proteine fluorescenti. Sebbene questo approccio non sia traslabile alla clinica, l'imaging ottico è più adatto per i piccoli laboratori essendo economicamente più vantaggioso e consentendo analisi rapide e sensibili. Sono stati ottenuti diversi modelli di MM che possono essere visualizzati attraverso la bioluminescenza (68,69) o la fluorescenza (70).

Un approccio interessante è stato descritto da Meerand et al. combinando la bioluminescenza con la MRI, con quest'ultima tecnica in grado di fornire una quantificazione affidabile del carico tumorale insieme ad informazioni anatomiche (71).

6.3.6 Applicazioni per i modelli in vivo di mesotelioma maligno

Il MM ha un microambiente complesso, con complicate interazioni tra le cellule tumorali, stromali e immunitarie. Le citochine e i fattori di crescita influenzano reciprocamente il comportamento delle diverse popolazioni cellulari, ottenendo di conseguenza un tumore molto aggressivo e poco sensibile alla chemioterapia. Vázquez et al. hanno osservato una discrepanza tra la sensibilità in vivo e in vitro di modelli umani di MM, supportando il ruolo importante del microambiente (72). Di conseguenza i modelli animali sono necessari per studiare i meccanismi di patogenesi del MM, il contributo delle mutazioni e dell'infiammazione alla progressione tumorale e nuove strategie terapeutiche o chemio-preventive. I modelli animali sono inoltre utilizzati per confermare possibili biomarcatori e bersagli molecolari identificati in vitro, prima della loro validazione in clinica. I modelli animali qui descritti con i loro vantaggi, svantaggi e principali applicazioni sono riassunti in tabella 6.2.

Tabella 6.2 Riassunto dei principali vantaggi e svantaggi dei modelli animali di MM e loro principali applicazioni nella ricerca preclinica

		VANTAGGI	SVANTAGGI	PRINCIPALI APPLICAZIONI	
MODELLI TRAPIANTABILI	Sito d'inoculo			Studi farmacologici: valutazioni di efficacia, farmacocinetica e farmacodinamica Identificazione di biomarcatori predittivi (modelli di xenotrapianto) Sviluppo di nuove immunoterapie (modelli singenici)	
	Sottocutaneo	<ul style="list-style-type: none"> Semplicità della procedura di trapianto Facilità di monitoraggio della crescita tumorale 	<ul style="list-style-type: none"> Microambiente diverso Generalmente non si ha formazione di metastasi La risposta ai farmaci può essere diversa dai modelli ortotopici 		
	Ortotopico	<ul style="list-style-type: none"> Il sito anatomico consente una crescita tumorale e una disseminazione più simili al paziente Il microambiente è più simile alla clinica Possibile formazione di effusione pleurica o ascite 	<ul style="list-style-type: none"> Le procedure per il trapianto intrapleurico sono più complesse e rischiose Impossibile misurare direttamente la crescita tumorale Sono necessarie tecniche di imaging <i>in vivo</i> per seguire la crescita tumorale 		
	Background genetico degli animali				
	Xenotrapianti da linee cellulari (Cell derived xenografts, CDX)	<ul style="list-style-type: none"> Le cellule umane mantengono la maggior parte delle caratteristiche del tumore umano Crescita tumorale riproducibile 	<ul style="list-style-type: none"> Le linee cellulari immortalizzate possono perdere l'eterogeneità tipica dei tumori <i>in vivo</i> Il mantenimento in coltura a lungo termine può causare una deriva genetica, limitando la predittività clinica L'utilizzo di un ospite immunodeficiente non consente di riprodurre completamente il complesso microambiente tumorale 		
	Xenotrapianti derivati da paziente (Patient-derived xenografts, PDX)	<ul style="list-style-type: none"> Mantengono le principali caratteristiche istologiche del tumore umano, anche per quanto riguarda la componente stromale L'eterogeneità del tumore d'origine è almeno in parte conservata Minor deriva genetica 	<ul style="list-style-type: none"> L'ottenimento di una biobanca di PDX è dispendiosa sia in termini di costi che di tempo Progressiva sostituzione della componente stromale da principalmente umana a principalmente murina L'ospite è immunocompromesso 		
Singenici	<ul style="list-style-type: none"> Crescita tumorale rapida e riproducibile L'ospite è immunocompetente 	<ul style="list-style-type: none"> Utilizzo di linee cellulari immortalizzate <i>in vitro</i> La risposta alla terapia può essere diversa da quella dei mesoteliomi umani 			
MODELLI INDOTTI DA ASBESTO	In animali wild-type	<ul style="list-style-type: none"> Uso dello stesso cancerogeno dell'uomo I tumori riproducono la stessa morfologia, modalità di crescita e comportamento clinico dei tumori umani 	<ul style="list-style-type: none"> Latenza molto lunga e bassa incidenza Necessità di tecniche di imaging <i>in vivo</i> per monitorare la crescita tumorale Possibile sviluppo di altre tipologie tumorali in base al sito di esposizione all'asbesto 	Testare la carcinogenicità delle fibre di asbesto o simili all'asbesto Capire i meccanismi patogenetici del mesotelioma Identificare biomarcatori precoci di mesotelioma Studiare il contributo genetico allo sviluppo del mesotelioma Studi di chemioprevenzione Studi farmacologici (modello MexTag)	
	In animali geneticamente modificati	<ul style="list-style-type: none"> Uso dello stesso cancerogeno dell'uomo I tumori riproducono la stessa morfologia, modalità di crescita e comportamento clinico dei tumori umani Alta incidenza (fino al 100% nei topi MexTag) e tempi di latenza più brevi Riproducono alcune delle lesioni genetiche più comuni osservate nel mesotelioma umano 	<ul style="list-style-type: none"> Necessità di tecniche di imaging <i>in vivo</i> per monitorare la crescita tumorale Possono svilupparsi tumori spontanei (dipendenti dal modello) La risposta alla terapia può essere diversa da quella dei mesoteliomi umani 		

6.4 Conclusioni

Sono disponibili diversi modelli preclinici di MM in vitro e in vivo, ciascuno con i suoi punti di forza e limiti. L'inabilità intrinseca dei modelli di riprodurre adeguatamente l'eterogeneità tumorale e/o il microambiente tumorale, insieme alla nostra inadeguata conoscenza delle alterazioni geniche e molecolari del MM, giustificano il divario tra i buoni risultati ottenuti in alcuni modelli preclinici e gli esiti insoddisfacenti degli studi clinici.

Mentre continuano gli sforzi per ottenere modelli preclinici ottimali, è necessaria una completa caratterizzazione dei pazienti affetti da MM e dei modelli in vitro e in vivo, al fine di permettere una correlazione con la risposta ai farmaci. Sono attualmente disponibili nuove tecnologie che possono aiutare a chiarire le alterazioni molecolari dietro questa malattia e il complesso legame tra le cellule neoplastiche e le componenti dell'ospite, che sembra essere fondamentale per il comportamento clinico del MM. Inoltre, sono necessari più studi per chiarire i meccanismi di resistenza ai trattamenti in vivo, che può essere dovuta anche a ragioni farmacocinetiche, quali una distribuzione insufficiente o eterogenea dei farmaci nel tessuto tumorale (73).

Attualmente, data l'assenza del modello "perfetto", molta attenzione deve essere posta alla scelta del giusto modello da utilizzare in base all'ipotesi da verificare. In generale, i dati sperimentali dovrebbero essere riprodotti in diversi modelli in modo da compensare i loro inevitabili limiti, verificando così la robustezza e la rilevanza clinica dei risultati ottenuti.

Ringraziamenti

Il nostro lavoro preclinico sul MM è supportato da Fondazione Buzzi Unicem. Ringraziamo Maurizio D'Incalci per i suggerimenti e la rilettura critica del manoscritto.

Referenze

1. Zalcman G, Mazieres J, Margery J, Greillier L, Audigier-Valette C, Moro-Sibilot D, et al. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2016;387:1405–14.
2. McCambridge AJ, Napolitano A, Mansfield AS, Fennell DA, Sekido Y, Nowak AK, et al. Progress in the management of malignant pleural mesothelioma in 2017. *J Thorac Oncol*. 2018;13:606–23.
3. Singh A, Pruett N, Hoang CD. In vitro experimental models of mesothelioma revisited. *Transl Lung Cancer Res*. 2017;6:248–58.
4. Robinson C, Solin JN, Lee YG, Lake RA, Lesterhuis WJ. Mouse models of mesothelioma: strengths, limitations and clinical translation. *Lung Cancer Manag*. 2014;3:397–410.
5. Kakiuchi T, Takahara T, Kasugai Y, Arita K, Yoshida N, Karube K, et al. Modeling mesothelioma utilizing human mesothelial cells reveals involvement of phospholipase-C beta 4 in YAP-active mesothelioma cell proliferation. *Carcinogenesis*. 2016;37:1098–109.
6. Rintoul RC, Rassel DM, Gittins J, Marciniak SJ. Mesobank UK: an international mesothelioma bioresource. *Thorax*. 2016;71:380–2.
7. Oehl K, Kresoja-Rakic J, Opitz I, Vrugt B, Weder W, Stahel R, et al. Live-cell mesothelioma biobank to explore mechanisms of tumor progression. *Front Oncol*. 2018;8:40.
8. Ke Y, Reddel RR, Gerwin BI, Reddel HK, Somers AN, McMenamin MG, et al. Establishment of a human in vitro mesothelial cell model system for investigating mechanisms of asbestos-induced mesothelioma. *Am J Pathol*. 1989;134:979–91.
9. Connell ND, Rheinwald JG. Regulation of the cytoskeleton in mesothelial cells: reversible loss of keratin and increase in vimentin during rapid growth in culture. *Cell*. 1983;34:245–53.
10. Sherwood AL, Mutsaers SE, Peeva VK, Robinson C, DeSilva CJ, Swanson NR, et al. Spontaneously immortalized mouse mesothelial cells display characteristics of malignant transformation. *Cell Prolif*. 2008;41:894–908.
11. Davis JM, Bolton RE, Miller BG, Niven K. Mesothelioma dose response following intraperitoneal injection of mineral fibres. *Int J Exp Pathol*. 1991;72:263–74.

12. Kellerman LC, Valeyrie L, Fernandez N, Opolon P, Sabourin J-C, Maubec E, et al. Regression of AK7 malignant mesothelioma established in immunocompetent mice following intratumoral gene transfer of interferon gamma. *Cancer Gene Ther.* 2003;10:481–90.
13. Mezzapelle R, Rrapaj E, Gatti E, Ceriotti C, Marchis FD, Preti A, et al. Human malignant mesothelioma is recapitulated in immunocompetent BALB/c mice injected with murine AB cells. *Sci Rep.* 2016;6:22850.
14. Robinson C, van Bruggen I, Segal A, Dunham M, Sherwood A, Koentgen F, et al. A novel SV40 Tag transgenic model of asbestos-induced mesothelioma: malignant transformation is dose dependent. *Cancer Res.* 2006;66:10786–94.
15. Blum W, Pecze L, Felley-Bosco E, Worthmüller-Rodriguez J, Wu L, Vrugt B, et al. Establishment of immortalized murine mesothelial cells and a novel mesothelioma cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2015;51:714–21.
16. Sneddon S, Patch A-M, Dick IM, Kazakoff S, Pearson JV, Waddell N, et al. Whole exome sequencing of an asbestos-induced wild-type murine model of malignant mesothelioma. *BMC Cancer.* 2017;17:396.
17. Mazzocchi AR, Rajan SAP, Votanopoulos KI, Hall AR, Skardal A. In vitro patient-derived 3D mesothelioma tumor organoids facilitate patient-centric therapeutic screening. *Sci Rep.* 2018;8:2886.
18. Kim K-U, Wilson SM, Abayasiriwardana KS, Collins R, Fjellbirkeland L, Xu Z, et al. A novel in vitro model of human mesothelioma for studying tumor biology and apoptotic resistance. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33:541–8.
19. Wilson SM, Barbone D, Yang T-M, Jablons DM, Bueno R, Sugarbaker DJ, et al. mTOR mediates survival signals in malignant mesothelioma grown as tumor fragment spheroids. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008;39:576–83.
20. Kim H, Phung Y, Ho M. Changes in global gene expression associated with 3D structure of tumors: an ex vivo matrix-free mesothelioma spheroid model. *PLoS One.* 2012;7:e39556.
21. Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From three-dimensional cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 2011;21:745–54.
22. Russell WMS, Burch RL. *The principles of humane experimental technique.* London: Methuen; 1959.
23. Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med.* 1960;17:260–71.
24. Gilson JC. Health hazards of asbestos. Recent studies on its biological effects. *Trans Soc Occup Med.* 1966;16:62–74.
25. Wagner JC, Berry G, Skidmore JW, Timbrell V. The effects of the inhalation of asbestos in rats. *Br J Cancer.* 1974;29:252–69.
26. Gross P, de Treville RTP, Tolker EB, Kaschak M, Babyak MA. Experimental asbestosis. The development of lung cancer in rats with pulmonary deposits of chrysotile asbestos dust. *Arch Environ Health.* 1967;15:343–55.
27. Gross P, de Treville RTP. Experimental asbestosis. *Arch Environ Health Int J.* 1967;15:638–49.
28. Wagner JC, Berry G. Mesotheliomas in rats following inoculation with asbestos. *Br J Cancer.* 1969;23:567–81.
29. Whitaker D, Shilkin KB, Walters MN. Cytologic and tissue culture characteristics of asbestos-induced mesothelioma in rats. *Acta Cytol.* 1984;28:185–9.
30. Lee Shin M, Firminger HI. Acute and chronic effects of intraperitoneal injection of two types of asbestos in rats with a study of the histopathogenesis and ultrastructure of resulting mesotheliomas. *Am J Pathol.* 1973;70:291–314.
31. Craighead JE, Akley NJ, Gould LB, Libbus BL. Characteristics of tumors and tumor cells cultured from experimental asbestos-induced mesotheliomas in rats. *Am J Pathol.* 1987;129:448–62.
32. Mohr U, Pott F, Vonnahme FJ. Morphological aspects of mesotheliomas after intratracheal instillations of fibrous dusts in Syrian golden hamsters. *Exp Pathol.* 1984;26:179–83.
33. Wagner JC, Griffiths DM, Hill RJ. The effect of fibre size on the in vivo activity of UICC crocidolite. *Br J Cancer.* 1984;49:453–8.
34. Davis JM, Addison J, Bolton RE, Donaldson K, Jones AD, Smith T. The pathogenicity of long versus short fibre samples of amosite asbestos administered to rats by inhalation and intraperitoneal injection. *Br J Exp Pathol.* 1986;67:415–30.
35. Miller BG, Searl A, Davis JM, Donaldson K, Cullen RT, Bolton RE, et al. Influence of fibre length, dissolution and biopersistence on the production of mesothelioma in the rat peritoneal cavity. *Ann Occup Hyg.* 1999;43:155–66.
36. Minardi F, Maltoni C. Results of recent experimental research on the carcinogenicity of natural and modified asbestos. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;534:754–61.
37. Suzuki Y, Kohyama N. Malignant mesothelioma induced by asbestos and zeolite in the mouse peritoneal cavity. *Environ Res.* 1984;35:277–92.
38. Davis MR, Manning LS, Whitaker D, Garlepp MJ, Robinson BW. Establishment of a murine model of malignant mesothelioma. *Int J Cancer.* 1992;52:881–6.
39. Chahinian AP, Beranek JT, Suzuki Y, Bekesi JG, Wisniewski L, Selikoff IJ, et al. Transplantation of human malignant mesothelioma into nude mice. *Cancer Res.* 1980;40:181–5.

40. Manning LS, Whitaker D, Murch AR, Garlepp MJ, Davis MR, Musk AW, et al. Establishment and characterization of five human malignant mesothelioma cell lines derived from pleural effusions. *Int J Cancer*. 1991;47:285–90.
41. Griffin TW, Stoel M, Collins J, Fernandes J, Maher VE. Combined antitumor therapy with the chemotherapeutic drug doxorubicin and an anti-transferrin receptor immunotoxin: in vitro and in vivo studies. *J Immunother*. 1992;11:12–8.
42. Cook JW, Serman DH, Singhal S, Smythe WR, Kaiser LR. Suramin inhibits the growth of malignant mesothelioma in vitro, and in vivo, in murine flank and intraperitoneal models. *Lung Cancer*. 2003;42:263–74.
43. Littlejohn JE, Cao X, Miller SD, Ozvaran MK, Jupiter D, Zhang L, et al. Bcl-xL antisense oligonucleotide and cisplatin combination therapy extends survival in SCID mice with established mesothelioma xenografts. *Int J Cancer*. 2008;123:202–8.
44. Colt HG, Astoul P, Wang X, Yi ES, Boutin C, Hoffman RM. Clinical course of human epithelial-type malignant pleural mesothelioma replicated in an orthotopic-transplant nude mouse model. *Anticancer Res*. 1996;16:633–9.
45. Astoul P, Wang X, Colt H, Boutin C, Hoffman R. A patient-like human malignant pleural mesothelioma nude-mouse model. *Oncol Rep*. 1996;3:483–7.
46. Pimpec-Barthes FL, Bernard I, Alsamad IA, Renier A, Kheuang L, Fleury-Feith J, et al. Pleuro-pulmonary tumours detected by clinical and chest X-ray analyses in rats transplanted with mesothelioma cells. *Br J Cancer*. 1999;81:1344–50.
47. Martarelli D, Catalano A, Procopio A, Orecchia S, Libener R, Santoni G. Characterization of human malignant mesothelioma cell lines orthotopically implanted in the pleural cavity of immunodeficient mice for their ability to grow and form metastasis. *BMC Cancer*. 2006;6:130.
48. Van TT, Hanibuchi M, Goto H, Kuramoto T, Yukishige S, Kakiuchi S, et al. SU6668, a multiple tyrosine kinase inhibitor, inhibits progression of human malignant pleural mesothelioma in an orthotopic model. *Respirology*. 2012;17:984–90.
49. Wu L, Allo G, John T, Li M, Tagawa T, Opitz I, et al. Patient-derived xenograft establishment from human malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2017;23:1060–7.
50. Hanahan D, Coussens LM. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*. 2012;21:309–22.
51. Goodglick LA, Vaslet CA, Messier NJ, Kane AB. Growth factor responses and protooncogene expression of murine mesothelial cell lines derived from asbestos-induced mesotheliomas. *Toxicol Pathol*. 1997;25:565–73.
52. Jackaman C, Bundell CS, Kinnear BF, Smith AM, Filion P, van, et al. IL-2 intratumoral immunotherapy enhances CD8⁺ T cells that mediate destruction of tumor cells and tumor-associated vasculature: a novel mechanism for IL-2. *J Immunol*. 2003;171:5051–63.
53. Miselis NR, Wu ZJ, Van Rooijen N, Kane AB. Targeting tumor-associated macrophages in an orthotopic murine model of diffuse malignant mesothelioma. *Mol Cancer Ther*. 2008;7:788–99.
54. Miselis NR, Lau BW, Wu Z, Kane AB. Kinetics of host cell recruitment during dissemination of diffuse malignant peritoneal mesothelioma. *Cancer Microenviron*. 2010;4:39–50.
55. Mishalian I, Bayuh R, Levy L, Zolotarov L, Michaeli J, Fridlender ZG. Tumor-associated neutrophils (TAN) develop pro-tumorigenic properties during tumor progression. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62:1745–56.
56. Sekido Y. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis*. 2013;34:1413–9.
57. Marsella JM, Liu BL, Vaslet CA, Kane AB. Susceptibility of p53-deficient mice to induction of mesothelioma by crocidolite asbestos fibers. *Environ Health Perspect*. 1997;105:1069–72.
58. Vaslet CA, Messier NJ, Kane AB. Accelerated progression of asbestos-induced mesotheliomas in heterozygous p53^{+/-} mice. *Toxicol Sci*. 2002;68:331–8.
59. Altomare DA, Vaslet CA, Skele KL, Rienzo AD, Devarajan K, Jhanwar SC, et al. A mouse model recapitulating molecular features of human mesothelioma. *Cancer Res*. 2005;65:8090–5.
60. Jongsma J, van Montfort E, Vooijs M, Zevenhoven J, Krimpenfort P, van der Valk M, et al. A conditional mouse model for malignant mesothelioma. *Cancer Cell*. 2008;13:261–71.
61. Bott M, Brevet M, Taylor BS, Shimizu S, Ito T, Wang L, et al. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet*. 2011;43:668–72.
62. Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet*. 2011;43:1022–5.
63. Wiesner T, Fried I, Ulz P, Stacher E, Popper H, Murali R, et al. Toward an improved definition of the tumor spectrum associated with BAP1 germline mutations. *J Clin Oncol*. 2012;30:e337–40.
64. Cheung M, Testa JR. BAP1, a tumor suppressor gene driving malignant mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res*. 2017;6:270–8.
65. Robinson C, Walsh A, Larma I, O'Halloran S, Nowak AK, Lake RA. MexTA mice exposed to asbestos develop cancer that faithfully replicates key features of the pathogenesis of human mesothelioma. *Eur J Cancer*. 2011;47:151–61.

66. Tsuji AB, Sogawa C, Sugyo A, Sudo H, Toyohara J, Koizumi M, et al. Comparison of conventional and novel PET tracers for imaging mesothelioma in nude mice with subcutaneous and intrapleural xenografts. *Nucl Med Biol.* 2009;36:379–88.
67. Saito Y, Furukawa T, Arano Y, Fujibayashi Y, Saga T. Comparison of semiquantitative fluorescence imaging and PET tracer uptake in mesothelioma models as a monitoring system for growth and therapeutic effects. *Nucl Med Biol.* 2008;35:851–60.
68. Yanagihara K, Tsumuraya M, Takigahira M, Mihara K, Kubo T, Ohuchi K, et al. An orthotopic implantation mouse model of human malignant pleural mesothelioma for in vivo photon counting analysis and evaluation of the effect of S-1 therapy. *Int J Cancer.* 2010;126:2835–46.
69. Feng M, Zhang J, Anver M, Hassan R, Ho M. In vivo imaging of human malignant mesothelioma grown orthotopically in the peritoneal cavity of nude mice. *J Cancer.* 2011;2:123–31.
70. Yamaoka N, Kawasaki Y, Xu Y, Yamamoto H, Terada N, Okamura H, et al. Establishment of in vivo fluorescence imaging in mouse models of malignant mesothelioma. *Int J Oncol.* 2010;37:273–9.
71. Meerang M, Boss A, Kenkel D, Broggin-Tenzer A, Bérard K, Lauk O, et al. Evaluation of imaging techniques for the assessment of tumour progression in an orthotopic rat model of malignant pleural mesothelioma. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2015;47:e34–41.
72. Vázquez R, Licandro SA, Astorgues-Xerri L, Lettera E, Panini N, Romano M, et al. Promising in vivo efficacy of the BET bromodomain inhibitor OTX015/MK-8628 in malignant pleural mesothelioma xenografts. *Int J Cancer.* 2017;140:197–207.
73. Giordano S, Zucchetti M, Decio A, Cesca M, Fuso Nerini I, Maiezza M, et al. Heterogeneity of paclitaxel distribution in different tumor models assessed by MALDI mass spectrometry imaging. *Sci Rep.* 2016;6:39284.

Capitolo 15

RUOLO DELLA CHEMIOTERAPIA NEL TRATTAMENTO DEL MESOTELIOMA PLEURICO MALIGNO

Letizia Gianoncelli, Maria Bonomi e Giovanni Luca Ceresoli

15.1 Introduzione

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è una malattia rara, che origina solitamente dalle superfici mesoteliali della cavità pleurica, nella maggior parte dei casi in seguito all'esposizione occupazionale o ambientale all'asbesto.

La sua incidenza ha già raggiunto i livelli massimi negli Stati Uniti, mentre è ancora in aumento in Europa, dove il picco d'incidenza è atteso per il 2020 (1, 2). A causa della sua modalità di crescita, il MPM è spesso diagnosticato ad uno stadio avanzato e solo una minoranza dei pazienti è idonea alla chirurgia radicale. I trattamenti sistemici rimangono quindi standard terapeutico per la maggior parte dei pazienti (3).

Nelle ultime decadi estese ricerche sono state condotte nella terapia del mesotelioma, con particolare attenzione ai farmaci antiangiogenici e all'immunoterapia. Molti farmaci a bersaglio molecolare sono stati valutati in una serie di piccoli studi di fase II e pochi studi di fase III che sono risultati inefficaci come si evidenzia dalla sopravvivenza globale mediana (median overall survival, mOS) compresa tra i 12 e i 18 mesi dalla diagnosi. In particolare, nonostante i risultati parzialmente positivi dello studio recente MAPS (4), l'impiego del bevacizumab, in combinazione alla chemioterapia standard per il trattamento del MPM avanzato, in molti paesi non è stato approvato. Di conseguenza la chemioterapia citotossica rimane l'unica opzione terapeutica universalmente accettata con un dimostrato beneficio sulla sopravvivenza. In seguito ai risultati di due grandi studi randomizzati di fase III, la combinazione di cisplatino con antimetaboliti (pemetrexed o raltitrexed) è stata approvata come terapia standard per i pazienti affetti da MPM non resecabile (5, 6). Diversi studi di fase II (7, 8) e un grande programma di accesso allargato in pazienti non idonei a ricevere cisplatino (9), hanno mostrato che l'associazione di carboplatino e pemetrexed ha un'efficacia comparabile a quella di cisplatino e pemetrexed, con una somministrazione più semplice e una minor tossicità percepita.

Sfortunatamente, in quasi tutti i pazienti, dopo la chemioterapia iniziale la malattia progredisce, ma non sono disponibili trattamenti standard di seconda linea (10). Di conseguenza la miglior opzione per il trattamento di seconda o successive linee è l'arruolamento in studi sperimentali, se disponibili (11). In alternativa può essere proposto un trattamento con vinorelbina o gemcitabina, anche se la loro attività è limitata (12). Nel sottogruppo di pazienti che raggiungono benefici prolungati in seguito al trattamento con pemetrexed e platino, un'opzione terapeutica ragionevole può essere un nuovo trattamento a base di pemetrexed (13).

15.2 Chemioterapia perioperatoria

Il ruolo della chemioterapia perioperatoria nel trattamento del MPM è controverso, considerando che ad oggi nessuno studio prospettico randomizzato di fase III ha ancora determinato se la chirurgia stessa, da sola o in combinazione con la radioterapia, conduca ad un aumento della sopravvivenza (14). In teoria, come dimostrato in altri tumori, la chemioterapia pre- e post- operatoria potrebbe ridurre il

rischio di recidive locali e, a distanza, anche nel MPM. In questo contesto clinico non ci sono studi che confrontano la terapia neo-adiuvante con quella adiuvante. La maggior parte degli studi pubblicati riguardanti la chemioterapia perioperatoria sono piccoli e di singole Istituzioni. Di conseguenza i pazienti arruolati sono molto eterogenei per quanto riguarda stadio, istologia, regimi terapeutici e tecniche chirurgiche. Il trattamento neo-adiuvante ha il potenziale di ridurre lo stadio del tumore e rendere la resezione chirurgica più fattibile (15,16). Inoltre, il trattamento di induzione ha il vantaggio di una somministrazione precoce dei farmaci, di una miglior compliance e di un'identificazione in tempo reale dei tumori sensibili e resistenti (17). Questo fatto è particolarmente rilevante perché dà la possibilità di selezionare per la resezione solo i pazienti che non progrediscono durante la terapia, evitando procedure chirurgiche non necessarie ai pazienti la cui malattia è in rapida progressione (18). Infine, la disponibilità di campioni chirurgici di grandi dimensioni al momento dell'intervento dà la possibilità di studiare l'effetto biologico della terapia. D'altra parte, i principali svantaggi della chemioterapia di induzione sono un rischio chirurgico potenzialmente più alto di mortalità e morbidità e un ritardo della chirurgia (19,20).

Diversi studi non randomizzati hanno valutato un trattamento tri-modale costituito da chemioterapia di induzione seguita da chirurgia e radioterapia, con una mOS tra i 12,8 e i 33,5 mesi e una sopravvivenza libera da malattia mediana (median disease free survival, mDFS) tra 8,6 e 21,6 mesi (21,22). Studi preliminari hanno identificato la combinazione di platino e gemcitabina come regime di trattamento attivo nel MPM (23) e questo ha condotto a diversi studi prospettici usando questo regime come terapia neo-adiuvante seguita da chirurgia e radioterapia (24-27). In seguito ai risultati incoraggianti ottenuti in prima linea nello studio di fase III con pemetrexed e cisplatino rispetto al solo cisplatino (5), questa combinazione è diventata il regime di induzione preferito in studi prospettici multi-modali (18,28-30). In particolare, uno studio multicentrico di fase II con terapia neoadiuvante a base di cisplatino e pemetrexed seguita da extra-pleuro pneumonectomia (EPP) e radioterapia adiuvante è stato effettuato da Krug et al. (18). La mOS riportata nella popolazione globale era di 6,8 mesi (95% CI, 13,6-23,2 mesi) e 29,1 mesi nei pazienti che hanno completato tutta la terapia. Il tasso di risposta radiologica (RR) è stato del 32,5% (95% CI, 22,2-44,1 mesi) ed era associato ad un aumento della mOS per i pazienti con malattia stabile rispetto a quelli in progressione [rispettivamente 26 contro 13,9 mesi (p=0,05)].

Nonostante promettenti risultati di uno studio di fase II a braccio singolo, l'efficacia dell'approccio tri-modale non è stata confermata in studi randomizzati. Lo studio Mesothelioma and Radical Surgery (MARS) ha randomizzato 50 pazienti al trattamento con EPP seguita da chemioterapia a base di platino e radioterapia post-operatoria rispetto alla sola chemioterapia (31). Non si sono osservati benefici dall'EPP né in termini di sopravvivenza né di qualità della vita; al contrario, i pazienti nel gruppo senza EPP avevano un esito migliore (HR=2,75 dopo correzione per le variabili prognostiche). Inoltre, lo studio randomizzato di fase II SAKK 17/04 che ha investigato il ruolo della radioterapia emitoracica ad alte dosi dopo chemioterapia neoadiuvante e EPP, non ha riportato differenze né nella mOS né nella sopravvivenza libera da recidiva (relapse free survival, RFS) loco-regionale tra i due gruppi con una RFS loco regionale mediana dalla chirurgia di 9,4 mesi nel gruppo con la radioterapia e di 7,6 mesi nel gruppo senza radioterapia (32).

In conclusione, come sottolineato in una revisione sistematica Cochrane recentemente pubblicata (33), data la mancanza di una provata efficacia del trattamento multimodale, questi interventi dovrebbero al

momento essere limitati, e l'uso della chemioterapia perioperatoria al di fuori di studi clinici dovrebbe essere raccomandata solo per pazienti selezionati, trattati in centri con competenze adeguate.

15.3 Chemioterapia di prima linea

Diversi studi hanno dimostrato che, in pazienti con MPM, la terapia di prima linea migliora la sopravvivenza e la qualità della vita; di conseguenza suggeriscono di valutare tutti i pazienti per la chemioterapia (34,35). Sulla base di studi randomizzati di fase III, la combinazione di cisplatino con pemetrexed o raltitrexed rappresenta il trattamento di prima linea standard (Tabella 15.1).

Il carboplatino è un'alternativa accettabile al cisplatino che può essere tollerata meglio, soprattutto dalla popolazione anziana. Diversi studi clinici di fase II e III stanno investigando l'aggiunta di nuovi farmaci alla terapia a base di pemetrexed e cisplatino, ma ad oggi nessuno di essi ha dimostrato un miglioramento rispetto all'efficacia della chemioterapia standard.

Tabella 15.1 Studi di prima linea, randomizzati, di fase III con chemioterapia in pazienti affetti da MPM

Autore (ref.)	Trattamento	No. di pz	RR (%)	mPFS (m)	mOS (m)
Vogelzang et al. (5)	Cisplatino/pemetrexed	226	41.3	5.7	12.1
	vs. Cisplatino	222	16.7	3.9	9.3
van Meerbeeck et al. (6)	Cisplatino/raltitrexed	126	23.6	5.5	11.4
	vs. Cisplatino	124	13.6	4.0	8.8

Pz pazienti, *RR* tasso di risposta (response rate), *m* mesi, *mPFS* sopravvivenza libera da progressione mediana (median progression free survival), *mOS* sopravvivenza globale mediana (median overall survival)

15.3.1 Pemetrexed e cisplatino

Nonostante le approfondite ricerche nella terapia del mesotelioma, nella pratica clinica la chemioterapia citotossica è rimasta inalterata dal 2003, quando la combinazione di cisplatino e pemetrexed è diventata la terapia di prima linea standard in tutto il mondo (5).

Il ruolo della combinazione di cisplatino e pemetrexed è stato inizialmente valutato in uno studio di fase I, nel quale 11 pazienti con MPM avevano ricevuto pemetrexed e cisplatino a dosi crescenti. I risultati dello studio mostravano che la combinazione era sicura e attiva con risposte parziali in 5 pazienti (45%) (36).

Su queste basi è stato disegnato lo studio di fase III EMPHACIS, per determinare se il trattamento in prima linea con pemetrexed-cisplatino era associato ad una aumentata sopravvivenza dei pazienti rispetto al solo cisplatino. Da aprile 1999 a marzo 2001, sono stati arruolati nello studio 456 pazienti. Efficacia e tossicità erano valutabili in 448 pazienti di cui 226 riceventi pemetrexed e cisplatino e 222 riceventi il solo cisplatino. La mOS dei pazienti trattati con pemetrexed-cisplatino era più lunga di quella dei pazienti che ricevevano il solo cisplatino: 12,1 mesi rispetto a 9,3 mesi con un HR 0,77. Come per la sopravvivenza, il tempo mediano alla progressione della malattia (median time to progression, mTTP) era più lungo nei pazienti che ricevevano la combinazione (5,7 mesi rispetto a 3,9 mesi; $p=0,001$). Tutte le risposte erano risposte parziali (PRs): 41,3% per i pazienti trattati con la combinazione e 16,7% per il gruppo trattato con il solo cisplatino. Questo studio ha valutato anche

l'effetto dell'integrazione vitaminica con vitamina B12 e acido folico sui due regimi terapeutici. I pazienti trattati con pemetrexed/cisplatino e vitamine avevano un miglioramento di tutti i parametri di efficacia, rispetto a quelli ricevuti la combinazione ma senza vitamine. L'integrazione rendeva i pazienti in grado di ricevere più cicli di trattamento, dando una possibile spiegazione delle differenze nell'esito clinico dei pazienti.

Per quanto riguarda la qualità della vita, è stato fornito ai pazienti dello studio EMPHACIS il questionario precedentemente validato della Lung Cancer Symptom Scale per il mesotelioma (LCSS-Meso) (37,38), con un tasso di completamento del 90%. Dopo 6 cicli, il punteggio dei sintomi era complessivamente a favore del braccio di combinazione ($p=0,004$). Entro la dodicesima settimana (4 cicli), nel braccio pemetrexed/cisplatino si notava un miglioramento statisticamente significativo del dolore, della tosse e della dispnea. Inoltre, venivano riportati miglioramenti della qualità della vita ($p=0,025$) e dello stato di affaticamento ($p=0,027$).

Per quanto riguarda la tossicità, le più comuni tossicità ematologiche nel braccio pemetrexed/cisplatino erano la neutropenia di grado 3-4 (27,9%) e la leucopenia di grado 3-4 (17,7%). Nausea, vomito e fatica erano le tossicità non ematologiche più comunemente riportate in entrambi i gruppi di trattamento, con un 88% di eventi di grado 3.

15.3.2 Raltitrexed-cisplatino

Dopo promettenti studi di fase II che hanno esplorato l'attività di un altro antimetabolita, raltitrexed, come agente singolo o in combinazione con derivati del platino, l'Organizzazione Europea per la Ricerca e il Trattamento del Cancro (EORTC) e il National Cancer Institute del Canada (NCI Canada) hanno promosso uno studio randomizzato di fase III (6). Sono stati randomizzati un totale di 250 pazienti per ricevere cisplatino 80 mg/m² e raltitrexed 3 mg/m² o cisplatino da solo. Entrambi i regimi venivano somministrati ogni 3 settimane. In 213 pazienti con malattia misurabile, la combinazione di cisplatino e raltitrexed ha raggiunto una RR del 24% rispetto all'11% nel braccio controllo. Sono state riportate una mOS di 11,4 e 8,8 mesi e un tasso di sopravvivenza a un anno del 46% e 40% rispettivamente nel braccio sperimentale e in quello controllo. Queste differenze erano al limite della significatività statistica probabilmente perché lo studio era sottopotenziato. Un'analisi sulla qualità della vita condotta separatamente ha evidenziato che la dispnea era significativamente migliorata nei pazienti che avevano ricevuto la combinazione (39).

Ad oggi non esistono dati univoci per preferire pemetrexed o raltitrexed in combinazione con cisplatino. L'efficacia relativa di raltitrexed e cisplatino e pemetrexed e cisplatino è stata stimata da Woods et al. (40) in un confronto indiretto aggiustato. È stato usato un modello di costo-efficacia per determinare i costi complessivi per la durata della vita dei pazienti e gli esiti sulla salute associati ai due regimi. Le due combinazioni non mostravano differenze statisticamente significative per quanto riguarda la RR globale, la PFS o la OS. L'analisi di costo-efficacia di raltitrexed e cisplatino ha mostrato risultati migliori con una qualità della vita aggiustata per la sopravvivenza e una sopravvivenza marginalmente migliori a costi totali inferiori. In un altro lavoro recentemente pubblicato (41) sono state confrontate l'efficacia e sicurezza delle due combinazioni usando un modello di meta-analisi di rete di studi clinici randomizzati. Ancora una volta, in un confronto indiretto, non sono emerse differenze significative. Comunque, sebbene sulla base di queste evidenze,

in pazienti con MPM avanzato, la combinazione di raltitrexed e cisplatino dovrebbe essere considerata un'alternativa al regime a base di pemetrexed, in molti paesi non è approvata per questa indicazione.

15.3.3 Pemetrexed-carboplatino

Considerando il profilo di tossicità del cisplatino e il gran numero di pazienti che non possono ricevere questo farmaco in un contesto palliativo, nella pratica clinica il carboplatino è spesso utilizzato per ridurre il rischio di tossicità.

In uno studio di fase II non randomizzato (7), 102 pazienti con MPM sono stati trattati con pemetrexed 500 mg/m² e carboplatino AUC5 ogni 21 giorni per una mediana di 6 cicli. Tutti i pazienti ricevevano un'integrazione con vitamina B12 e folati. Due pazienti hanno avuto una risposta completa (complete response, CR) e 17 una PR per una RR totale di 18,6% (95% CI 11,6-27,5%). Nel 47% dei pazienti (95% CI 37,1-57,2%) è stata registrata una stabilizzazione della malattia (stable disease, SD). La mOS era di 12,7 mesi, con una mTTP di 6,5 mesi. Complessivamente, il 19,6% dei pazienti ha sviluppato neutropenia di grado 3-4 e l'11,7% un'anemia di grado 3-4. Il trattamento è stato generalmente ben tollerato; nei 96 pazienti ricevuti oltre 2 cicli di pemetrexed e carboplatino l'intensità di dose relativa è stata del 97% per pemetrexed e del 98% per carboplatino.

Un altro studio di fase II ha incluso 76 pazienti con MPM avanzato e malattia misurabile trattati con la stessa combinazione. E' stata raggiunta una RR del 25% (21% di PR e 4% di CR) con un TTP mediano di 8 mesi e una mOS di 14 mesi. Tossicità ematologica di grado 3 è stata osservata in 3 pazienti (47,3%); di grado 4 in 5 pazienti (6,5%) (8).

Inoltre, un ampio programma di accesso allargato ha raccolto dati da 1.704 pazienti con MPM non precedentemente pretrattati dei quali 843 hanno ricevuto pemetrexed e cisplatino e 861 pemetrexed e carboplatino AUC5 (9). Le analisi hanno dimostrato una RR simile per carboplatino e pemetrexed rispetto a cisplatino e pemetrexed (21,7% vs. 26,3%), così come un simile mTTP (6,9 vs. 7 mesi) e tasso di sopravvivenza a 1 anno (64% vs. 63,1%).

Considerata l'alta incidenza di diagnosi di MPM in pazienti anziani (≥ 70 anni), un'analisi retrospettiva è stata effettuata riunendo dati di singoli pazienti dei due studi di fase II precedentemente descritti (7,8), allo scopo di confrontare efficacia, tossicità e sopravvivenza dei pazienti anziani trattati con carboplatino e pemetrexed rispetto ai pazienti più giovani. Sono stati inclusi un totale di 178 pazienti con un performance status dell'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG PS) ≤ 2 . L'età mediana era di 65 anni (intervallo 38-79), con 48 pazienti ≥ 70 anni (27%). La tossicità ematologica di grado 3-4 era peggiore nei pazienti con età ≥ 70 anni rispetto ai < 70 , con neutropenia osservata rispettivamente nel 25,0% e nel 13,8% dei casi ($p=0,11$), anemia nel 20,8% e nel 6,9% ($p=0,01$) e trombocitopenia nel 14,6% e nel 8,5% ($p=0,26$). La tossicità non ematologica era leggera e simile nei due gruppi. Nessuna differenza significativa è stata osservata in termini di DCR globale (60,4 vs. 66,9%, $p=0,47$), TTP (7,2 vs. 7,5 mesi, $p=0,42$) e OS (10,7 vs. 13,9 mesi, $p=0,12$) (42).

Sulla base di questi risultati, anche se non supportati direttamente da un confronto randomizzato, la combinazione del carboplatino con pemetrexed può essere considerata un'alternativa valida quando la tossicità del cisplatino può rappresentare una preoccupazione, come in pazienti anziani o in pazienti con comorbidità (34, 35).

15.3.4 Altre combinazioni

Sulla base dei risultati di uno studio preclinico in modelli di mesotelioma murino che hanno mostrato un effetto antitumorale additivo della gemcitabina somministrata con cisplatino (43), questa combinazione è stata valutata in diversi studi di fase II. Nel primo studio di fase II monocentrico effettuato da Byrne et al., 10 dei 21 pazienti arruolati (47%) hanno mostrato una risposta parziale. 9 dei 10 pazienti avevano un mesotelioma epitelioide e un paziente aveva un istotipo bifasico. La mPFS stimata è stata di 25 settimane e la mOS di 41 settimane (10 mesi) (23). In seguito, uno studio multicentrico di fase II ha arruolato 53 pazienti con MPM di cui 52 valutabili. Diciassette pazienti (33%) hanno raggiunto una PR e 31 (60%) una SD. La mTTP è stata di 6,4 mesi, con una mOS di 11,2 mesi. Le principali tossicità erano ematologiche, limitando l'intensità di dose relativa media di gemcitabina al 75% (44). In entrambi gli studi i pazienti sono stati trattati con 100 mg/m² e.v. di cisplatino e con 1.000 mg/m² e.v. di gemcitabina ai giorni 1, 8 e 15 di un ciclo di 28 giorni, per un massimo di 6 cicli.

Usando questa combinazione, in altri studi sono stati rilevati tassi di risposta inferiori. In uno studio effettuato nei Paesi Bassi, il cisplatino è stato somministrato alla dose di 80 mg/m² insieme a gemcitabina 1.250 mg/m² ogni 21 giorni (45). Sono state osservate quattro PRs in 25 pazienti (16%). La TTP mediana era di 6 mesi con una mOS di 9,6 mesi. In uno studio dell'ECOG nel quale il cisplatino è stato somministrato alla dose di 75 mg/m² insieme a gemcitabina 1.250 mg/m² ai giorni 1 e 8, sono state osservate PRs in 9 pazienti (26%), con un mTTP di 8 mesi e una mOS di 13 mesi. Uno studio di fase II in aperto del Southwest Oncology Group (SWOG) ha arruolato 50 pazienti, non precedentemente pretrattati, per ricevere gemcitabina 1.000 mg/m² e cisplatino 30 mg/m² ai giorni 1, 8 e 15 di un ciclo di 28 giorni fino alla progressione della malattia o 2 cicli oltre la risposta completa. La RR è stata del 12% e SD sono state osservate nel 50% dei pazienti. La OS mediana è stata di 10 mesi (95% CI 7-15 mesi), con una mPFS di 6 mesi. 16 pazienti hanno mostrato tossicità di grado 4, principalmente ematologica (46). Utkan et al. hanno studiato uno schema di somministrazione modificato con dosi di cisplatino frazionate in combinazione con gemcitabina: 26 pazienti con MPM epitelioide o mesotelioma peritoneale hanno ricevuto cisplatino 35 mg/m² e gemcitabina 800 mg/m² ai giorni 1 e 8 di un ciclo di 3 settimane fino ad un massimo di 6 cicli (47). Sono state osservate PRs in 6 pazienti (23,1%) e SD in 13 (50%). La TTP mediana e l'OS sono state rispettivamente di 4 e 19,5 mesi. La tossicità è stata leggera. Complessivamente dosi frazionate di cisplatino e gemcitabina sembrano essere un regime attivo e ben tollerato. Uno studio di fase II multicentrico su 50 pazienti ha valutato l'utilizzo del carboplatino invece del cisplatino in associazione con gemcitabina. Sono state riportate PRs nel 26% dei pazienti. La OS mediana era di 66 settimane con una mPFS di 40 settimane (48).

La combinazione di cisplatino con altri agenti chemioterapici quali antracicline, mitomicina, metotrexato e vinblastina è stata testata in pazienti con mesotelioma (49-53). Tuttavia non è stato osservato nessun possibile vantaggio di questi regimi terapeutici, sia in termini di attività che di tossicità, in confronto alla combinazione di cisplatino con pemetrexed, raltitrexed o gemcitabina.

15.4 Chemioterapia di seconda linea

La maggior parte dei pazienti con MPM sfortunatamente progredisce durante o dopo la prima linea di trattamento. L'utilizzo di una seconda linea di trattamento è in aumento nella pratica clinica perché spesso i pazienti hanno ancora un buon PS al momento della progressione. Di conseguenza sono stati condotti diversi studi clinici per valutare regimi diversi come terapie di salvataggio, ma nessuno di essi

ha dato risultati definitivi per guidare la scelta della terapia di seconda linea nell'MPM. Il ruolo di un trattamento sistemico in pazienti in progressione dopo la prima linea di trattamento deve quindi ancora essere dimostrato e il regime di trattamento ottimale non è ancora stato determinato. (11).

15.4.1 Risomministrazione di Pemetrexed

Il ruolo di pemetrexed in seconda linea è stato valutato in uno studio di fase III dove sono stati randomizzati 243 pazienti con MPM non precedentemente pretrattati con pemetrexed. I pazienti, dopo la prima linea di trattamento, sono stati randomizzati per ricevere 500 mg/m² aggiunti alla miglior terapia di supporto (best supportive care, BSC) ogni 21 giorni o la sola BSC (54). Nel braccio con pemetrexed è stato osservato un aumento statisticamente significativo della PFS mediana, del TTP e del tempo al fallimento del trattamento (time to treatment failure, TTF). Non è stata rilevata nessuna differenza statisticamente significativa in termini di mOS (8,4 vs. 9,7 mesi rispettivamente per pemetrexed e BSC, HR 0,95), probabilmente perché un'elevata percentuale dei pazienti nel braccio BSC ha ricevuto chemioterapia dopo l'interruzione del trattamento (51,7% vs. 28,5% nel braccio con pemetrexed) e la terapia dopo l'interruzione veniva iniziata prima nel braccio BSC (4,3 vs. 15,7 mesi nel braccio pemetrexed).

Per pazienti selezionati che avevano ottenuto un TTF prolungato dopo terapia di prima linea con un regime a base di platino e pemetrexed, un'analisi retrospettiva suggerisce un possibile ruolo per il ritrattamento con pemetrexed (Tabella 15.2). Razak et al. hanno riportato una serie di 4 pazienti che presentavano una PFS straordinariamente prolungata dopo la prima linea di chemioterapia a base di pemetrexed e carboplatino. Con un trattamento di seconda linea a base di pemetrexed in combinazione con carboplatino uno di questi pazienti raggiungeva una nuova PR e tre avevano una SD prolungata (55). In un'analisi retrospettiva su 17 pazienti trattati in un unico centro nel 65% dei casi è stato osservato un beneficio clinico. Tutti i pazienti erano stati pretrattati con platino/pemetrexed; prima che fosse disponibile il pemetrexed, 5 pazienti avevano ricevuto anche una chemioterapia con platino e gemcitabina. Il ritrattamento consisteva principalmente in carboplatino e pemetrexed o pemetrexed da solo (56). I risultati di uno studio retrospettivo condotto da Baerz et al., effettuato in 7 centri italiani, ha riportato i risultati del ritrattamento con pemetrexed in 30 pazienti (57). In 28 casi l'istotipo del mesotelioma era epitelioide e in 2 bifasico. Tutti i pazienti avevano ricevuto una chemioterapia di prima linea con pemetrexed e composti del platino (in 21 casi cisplatino e in 9 carboplatino), ottenendo PR in 15 casi e SD nei rimanenti 15. La durata delle risposte è stata di almeno 6 mesi. In 9 pazienti la chemioterapia di seconda linea era costituita dal solo pemetrexed; i rimanenti 21 ricevevano la combinazione con il platino (5 con cisplatino, 16 con carboplatino). Cinque pazienti (16,7%) hanno ottenuto una PR, 15 (50%) una SD e 10 progredivano al ritrattamento. Un simile mTTP è stato osservato con il solo pemetrexed (4 mesi) e con la combinazione col platino (5,7 mesi). La mOS era di 13,6 mesi. In uno studio osservazionale effettuato da Ceresoli et al. è stato valutato l'effetto del ritrattamento con pemetrexed in pazienti con MPM che sono andati in progressione dopo almeno tre mesi dalla fine della terapia di prima linea. Quest'ultima era costituita in 27 casi da pemetrexed e carboplatino e in 4 da pemetrexed e cisplatino (13). Diciotto pazienti ricevevano pemetrexed come seconda linea di trattamento mentre i rimanenti venivano trattati in linee successive dopo terapia con vinorelbina o gemcitabina. Il ritrattamento era a base di pemetrexed in 15 casi e di pemetrexed e platino in sedici casi. Un paziente ha ottenuto una risposta completa e 5 una PR. Il tasso di risposta è stato del

19% nei pazienti trattati con il solo pemetrexed e del 48% nei pazienti riceventi la combinazione con platino. Le PFS e OS mediane erano rispettivamente di 3,8 e 10,5 mesi ed erano significativamente più lunghe in quei pazienti che avevano ottenuto un controllo della malattia di oltre 12 mesi in seguito alla prima linea di trattamento.

Tabella 15.2 Ritratamento con chemioterapia a base di pemetrexed nel MPM

Autore (ref.)	Tipo di studio	Regime di ritratamento	No. of pz	RR	DCR (%)	mTTP/PFS	mOS
Razak et al. (55)	Retrospettivo	Pem/plat	4	25%	100	NR	NR
Serke and Bauer (56)	Retrospettivo	Pem/plat	17	NR	65	NR	NR
Bearz et al. (57)	Retrospettivo	Pem	9	17%	67	5.1 m	13.6 m
		Pem/plat	21				
Ceresoli et al. (13)	Osservazionale	Pem	15	19%	48	3.8 m	10.5 m
		Pem/plat	16				
Zucali et al. (58)	Retrospettivo	Pem	11	NR	71	6.2 m	10.6 m
		Pem/plat	31				

Pz pazienti, *RR* tasso di risposta (response rate), *DCR* tasso di controllo della malattia (disease control rate), *m* mesi, *mTTP* tempo mediano alla progressione (median time to progression), *mPFS* sopravvivenza libera da progressione mediana (median progression free survival), *mOS* sopravvivenza globale mediana (median overall survival), *Pem/plat* pemetrexed e un regime contenente platino, *Pem* pemetrexed agente singolo

Infine, i risultati di un'indagine retrospettiva sulla chemioterapia di seconda linea in 181 pazienti con MPM sono stati riportati da Zucali et al. (58). Tra i pazienti trattati con una prima linea a base di pemetrexed, 42 ricevevano un ritratamento con pemetrexed. Questi pazienti avevano un miglior controllo della malattia rispetto a quelli che venivano ritrattati con altri agenti chemioterapici (rispettivamente 70,7 % e 52%). Il ritratamento era costituito dal solo pemetrexed in 11 pazienti e dalla combinazione con composti del platino in 31 pazienti. La PFS mediana (6,4 versus 24 mesi, $p=0,003$) e la mOS (13,4 versus 4,2 mesi, $p<0,001$) erano significativamente più lunghe nei pazienti ritrattati con la combinazione rispetto al solo pemetrexed. Comunque, la natura retrospettiva di questo studio non ci consente di trarre nessuna conclusione finale in quanto i pazienti che avevano ricevuto la combinazione erano più giovani, con un miglior performance status e avevano ottenuto migliori risposte nella terapia di prima linea.

Sebbene, in pazienti selezionati, il ritratamento con una chemioterapia a base di pemetrexed può essere una strategia valutabile, i clinici devono essere consapevoli dell'alta incidenza di reazioni di ipersensibilità al carboplatino in questo contesto. In un piccolo studio con 18 pazienti ritrattati con pemetrexed e carboplatino, dopo una mediana di 9 cicli (range 8-13) e di 18,5 mesi (range 13-45) dalla prima somministrazione di carboplatino, 6 pazienti (33%) hanno sviluppato reazioni di ipersensibilità al carboplatino (59). Tutte le reazioni avverse sono state classificate di grado II e facilmente controllabili con la somministrazione di steroidi e antistaminici; nei cicli seguenti la somministrazione del carboplatino è stata sospesa. In caso di ritratamento dopo una prima linea a base di pemetrexed e carboplatino, dovrebbe essere considerato l'utilizzo del solo pemetrexed. In alternativa in pazienti ritrattati con la stessa combinazione, dovrebbero essere implementate la premedicazione e le strategie di desensibilizzazione.

15.4.2 Vinorelbina

Sfortunatamente, molti pazienti in progressione dopo pemetrexed e cisplatino non sono candidati per ricevere un ritrattamento con pemetrexed e possono essere esclusi dagli studi clinici, di seconda o successive linee, a causa dell'età avanzata o di comorbidità. In questo contesto, vinorelbina (come agente singolo o in combinazione con gemcitabina) può rappresentare una opzione terapeutica, come riportato in diverse linee guida e documenti di consenso (tabella 15.3).

Tabella 15.3 Chemioterapia a base di vinorelbina come seconda linea di trattamento o successive in pazienti affetti da MPM

Autore (ref.)	Disegno dello studio	Regime terapeutico	No. di pz	Linea di trattamento	RR (%)	DCR	mTTP/ PFS	mOS (m)
Stebbing et al. (60)	Prospettico, Fase II	VNR e.v.	63	Seconda linea	16	84%	NR	9.6
Zucali et al. (61)	Retrospettivo	VNR e.v.	59	58% seconda linea 42% terza linea	13	49%	2.3 m	6.2
Zauderer et al. (12)	Retrospettivo	VNR e.v.	45	53% seconda linea 46% terza linea	0	25%	2.5 m	5
Sørensen et al. (62)	Retrospettivo	VNR or	15	Seconda linea	7	NR	2.3 m	2.5
Zucali et al. (63)	Prospettivo/ osservazionale	GEM/VNR e.v.	30	Seconda linea	10	43%	2.8 m	10.9
Toyokawa et al. (64)	Retrospettivo	GEM/VNR e.v.	17	82% seconda linea 18% terza linea	18	82%	6.0 m	11.2

Pz pazienti, RR tasso di risposta (response rate), DCR tasso di controllo della malattia (disease control rate), m mesi, mTTP tempo mediano alla progressione (median time to progression), mPFS sopravvivenza libera da progressione mediana (median progression free survival), mOS sopravvivenza globale mediana (median overall survival), VNR vinorelbina, GEM gemcitabina, e.v. endovena, or orale

Due differenti indagini retrospettive condotte nella popolazione dello studio di fase III con pemetrexed e cisplatino (65) e in un contesto di "real life" (58), hanno riportato, nel 9,5-10,5% dei pazienti trattati, l'uso della vinorelbina come terapia di seconda linea. In uno studio prospettico monocentrico (60) e in diverse analisi retrospettive (12, 61, 62), la monoterapia con vinorelbina ha mostrato una moderata attività con una RR compresa tra 0 e 18% e un profilo di tossicità accettabile. Nel loro studio prospettico, Stebbing et al. hanno valutato, in 63 pazienti andati in progressione durante o dopo una precedente linea di chemioterapia, anche a base di pemetrexed e cisplatino, l'efficacia e la sicurezza di una somministrazione di vinorelbina settimanale (30 mg/m² per un ciclo di 6 settimane). La maggior parte dei pazienti aveva un ECOG PS di 0-1 e l'età mediana era di 59 anni. In 10 pazienti (16%) è stata riportata una PR e in 43 (68%) una SD, con 9,6 mesi (95% CI 7,3-11,8) di mOS. L'intervallo mediano tra la fine della prima linea di chemioterapia e l'inizio della seconda linea a base di vinorelbina era di 6 mesi. Nel 55% dei pazienti è stata osservata neutropenia di grado 3-4; nel 17% anemia di grado 3-4. Nell'11 e nell'8% della popolazione in studio si sono verificate rispettivamente costipazione e neuropatia periferica.

Zucali et al. hanno valutato retrospettivamente l'attività e la tossicità di vinorelbina in 59 pazienti consecutivi pretrattati con pemetrexed con un'istologia prevalentemente epitelioide e un'età mediana di 69 anni (intervallo 45-80) (61). È stata somministrata vinorelbina in seconda (57,6%) o in successive linee (42,4%) alla dose standard di 25 mg/m² e.v. ai giorni 1 e 8 ogni 21 giorni per un massimo di 6 cicli. I pazienti inclusi in questa analisi avevano generalmente risposto bene alla prima linea di trattamento con una PFS più lunga di 6 mesi nel 56% dei casi e solo 10 pazienti (16,9%) sono andati in progressione durante la prima linea. Con vinorelbina è stata raggiunta una PR in 9 pazienti (15%) e una SD in 20 (34%), con un tasso di controllo globale del 49%. La PFS e OS mediane sono state rispettivamente di 2,3 e 6,2 mesi. Da sottolineare l'assenza di differenze in termini di tasso di controllo della malattia, PFS e OS, dovute a sesso, istologia, età, linea della terapia con vinorelbina e risposta al trattamento di prima linea. La tossicità ematologica era generalmente lieve con stanchezza di grado 2 in 17 pazienti (28,8%) e costipazione in 7 (11,8%). Analogamente un'analisi retrospettiva è stata condotta da Zauderer et al. su 45 pazienti con MPM pretrattati che ricevevano vinorelbina 25 mg/m² e.v. ai giorni 1 e 8 di un ciclo di 3 settimane in seconda (53,3%) o successiva linea (46,7%) (12). L'80% dei pazienti era stato precedentemente trattato con una combinazione di pemetrexed e composti del platino, il 47% era stato sottoposto a chirurgia e il 31% a radioterapia. L'età mediana era di 66 anni (intervallo 41-85) e l'istologia era nel 67% dei casi epitelioide, nel 18% sarcomatoide e nel 16% bifasica. Le risposte sono state valutate dai radiologi in cieco in base ai criteri RECIST modificati. Non è stata riportata nessuna risposta parziale o completa; in 20 pazienti (43%) è stata ottenuta una SD. La PFS e la OS mediane erano rispettivamente di 1,7 e 5,4 mesi. Coerentemente con altri studi riportati, questo regime terapeutico aveva un profilo di tossicità accettabile. La neutropenia di grado 3-4 è stata riportata nel 16% dei pazienti, con febbre neutropenica in tre casi (7%). In tre pazienti la terapia con vinorelbina è stata sospesa a causa della tossicità.

E' disponibile una formulazione orale di vinorelbina, che può essere più conveniente in un contesto palliativo, soprattutto per pazienti pretrattati e anziani. L'utilizzo di vinorelbina orale per il trattamento di seconda linea in pazienti con MPM è stato valutato in un piccolo studio prospettico da Sørensen et al. (62). Il farmaco è stato somministrato in 15 pazienti con caratteristiche associate ad una prognosi sfavorevole (istologia non epitelioide nel 47% dei pazienti ed ECOG PS 2 nel 33%) e un'età mediana di 69 anni (intervallo 42-73), alla dose di 80 mg/m² al giorno 1 e 8 ogni tre settimane. Un paziente ha ottenuto una PR (7%), la mPFS era di 2,3 mesi e la mOS di 4,5 mesi. Sono state osservate leucopenia di grado 4 e trombocitopenia rispettivamente nel 20% e nel 7% dei pazienti, con 3 casi di neutropenia febbrile. È stata riportata una morte tossica. Per confermare la sicurezza e valutare la tossicità di uno schema di somministrazione metronomico per la vinorelbina orale è stato disegnato uno studio di fase Ia/Ib in una coorte di pazienti con MPM pretrattati, ma ad oggi i risultati non sono ancora stati riportati (66).

15.4.3 Gemcitabina

Nei primi studi clinici, la monoterapia a base di gemcitabina ha mostrato una modesta attività in pazienti con MPM non pretrattati, con RR tra il 7 e il 31% (67-68). Sulla base di questi risultati, alcuni studi hanno valutato l'efficacia di un regime terapeutico di seconda linea a base di gemcitabina. In un'indagine retrospettiva multicentrica, questo farmaco è risultato essere il più utilizzato in seconda linea in pazienti italiani con MPM pretrattati con pemetrexed (10,5%) (58).

Uno studio retrospettivo francese sempre in pazienti pretrattati con pemetrexed, ha riportato una mOS di 12,2 mesi con una terapia di seconda linea a base di gemcitabina da sola o in combinazione con oxaliplatino o pemetrexed (69). Nella stessa popolazione, Xhantopoulos et al. hanno riportato una mOS di 24,3 mesi con la combinazione di gemcitabina e oxaliplatino (70). In uno studio monocentrico di fase II è stata inoltre valutata l'efficacia di gemcitabina e docetaxel in seconda linea, con una mOS di 16,2 mesi (71). In uno studio di Pasello et al., sono stati arruolati pazienti precedentemente trattati con cisplatino e pemetrexed o carboplatino e pemetrexed e per la maggior parte sottoposti a chirurgia, nell'ambito di un trattamento multimodale. Il trattamento chemioterapico, a base di gemcitabina in combinazione con il derivato del platino alternativo rispetto alla prima linea, è stato somministrato per 3-6 cicli. La risposta è stata valutata in 15 pazienti di cui 10 (67%) hanno mostrato una SD. La sintomatologia è migliorata in 8 casi (53%). Nella popolazione intent-to treat la mOS era di 28 settimane e la mTTF di 15 settimane. Trombocitopenia di grado 3-4 è stata osservata nel 53% dei pazienti, anemia di grado 3 nel 20% e neutropenia di grado 3 nel 40%. I principali eventi avversi non ematologici sono stati nausea di grado 3 (14%) e astenia (21%) (72). Infine, Mutlu et al. hanno riportato i risultati di uno studio retrospettivo che ha valutato l'efficacia di una seconda linea a base di gemcitabina in 73 pazienti in progressione dopo la prima linea a base di pemetrexed (73). La OS mediana dei pazienti trattati con un regime a base di pemetrexed in prima linea e con gemcitabina in seconda linea era di 20,8 mesi (17,5- 24,1).

Conseguentemente, sulla base di questi risultati e del buon profilo di tossicità, e nonostante la mancanza di solidi dati di letteratura, gemcitabina in monoterapia può essere considerata una seconda linea alternativa in pazienti con MPM in progressione dopo platino e pemetrexed.

15.4.4 Vinorelbina in combinazione con gemcitabina

Considerati i risultati ottenuti con vinorelbina in prima e seconda linea, gli effetti modesti ma non trascurabili di gemcitabina in pazienti già pretrattati e il buon profilo di tossicità di entrambi i farmaci, è stata valutata la combinazione di gemcitabina con vinorelbina. In uno studio prospettico sono stati arruolati 30 pazienti consecutivi, pretrattati con un regime chemioterapico contenente pemetrexed, da solo o in combinazione con un derivato del platino (63). Gemcitabina alla dose di 1.000 mg/m² e vinorelbina alla dose di 25 mg/m² sono state somministrate endovena ai giorni 1 e 8 di un ciclo di 21 giorni, per un massimo di sei cicli, o fino alla progressione, o ad una non accettabile tossicità. L'età mediana dei pazienti era di 66 anni (intervallo 46-85). La maggior parte dei pazienti aveva un EOCG PS di 1 (83%) ed un istotipo epitelioide (70%). Tre pazienti (10%) hanno ottenuto una PR e 10 pazienti (33%) una SD. Complessivamente il tasso di controllo della malattia è stato del 43%. Il mTTP era di 2,8 mesi (intervallo 0,6-12,1 mesi) e la OS era di 10,9 mesi (intervallo 0,8-25,3 mesi). La tossicità ematologica è stata accettabile, con una neutropenia di grado 3-4 osservata nell'11% dei pazienti e trombocitopenia nel 4%; non è stato osservato nessun caso di neutropenia febbrile. La tossicità non ematologica è stata generalmente lieve. La progressione della malattia durante il trattamento di prima linea o ad un breve intervallo dal completamento della prima linea erano correlati con un TTP e una OS più brevi dopo il trattamento in studio. Toyokava et al. hanno valutato retrospettivamente 17 pazienti giapponesi consecutivi, pretrattati con almeno un regime chemioterapico a base di platino e pemetrexed e in trattamento in seconda o successive linee con gemcitabina alla dose di 1.000 mg/m² e vinorelbina alla dose di 25 mg/m² somministrate e.v. ai giorni 1 e 8, ogni 3 settimane (64). Le PR e il tasso di

controllo della malattia sono stati rispettivamente del 18% e del 82%, la PFS mediana è stata di 6 mesi, mentre la mOS è stata di 11,2 mesi. Neutropenia e anemia di grado 3-4 sono state osservate rispettivamente nel 41% e nel 29% dei pazienti e un paziente ha sviluppato una neutropenia febbrile. La tossicità non ematologica di grado 3 e 4 ha compreso costipazione e flebite nel 6% dei casi.

Sulla base di questi risultati e con tutte le limitazioni derivanti dal basso numero di pazienti trattati con questo regime terapeutico, la combinazione di gemcitabina e vinorelbina non sembra offrire potenziali vantaggi terapeutici rispetto alla somministrazione dei due farmaci singolarmente, con lo svantaggio di una maggior tossicità principalmente ematologica.

15.5 Conclusioni

La chemioterapia citotossica rappresenta l'unica opzione terapeutica che ha dimostrato un beneficio sulla sopravvivenza dei pazienti affetti da MPM. In seguito ai risultati di due grandi studi di fase III la combinazione del cisplatino con antimetaboliti (pemetrexed o raltitrexed) è diventata lo standard terapeutico per il MPM non resecabile chirurgicamente. Per i pazienti anziani o per quelli non idonei a ricevere questa combinazione, sono stati valutati schemi di trattamento con il carboplatino, con simili risultati. Nonostante i numerosi sforzi nell'ultimo decennio, non è stato identificato un regime terapeutico standard per i pazienti in progressione dopo un regime terapeutico a base di platino. In assenza di studi clinici disponibili, può essere valutata una monoterapia a base di vinorelbina o gemcitabina. In alternativa, i pazienti che hanno ottenuto benefici prolungati dal trattamento di prima linea a base di pemetrexed e platino, sono candidabili ad un ulteriore trattamento con pemetrexed.

Referenze

1. Bianchi C, Bianchi T. Malignant mesothelioma: global incidence and relationship with asbestos. *Ind Health*. 2007;45:379–87.
2. Robinson BM. Malignant pleural mesothelioma: an epidemiological perspective. *Ann Cardiothorac Surg*. 2012;1:491–6.
3. Tsao AS, Wistuba I, Roth JA, Kindler HL. Malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2009;27:2081–90.
4. Zalcman G, Mazieres J, Margery J, et al. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the mesothelioma avastin cisplatin pemetrexed study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2016;387:1405–14.
5. Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, et al. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2003;21:2636–44.
6. Van Meerbeeck JP, Gaafar R, Manegold C, et al. Randomized phase III study of cisplatin with or without raltitrexed in patients with malignant pleural mesothelioma: an intergroup study of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Group and the National Cancer Institute of Canada. *J Clin Oncol*. 2005;23:6881–9.
7. Ceresoli GL, Zucali PA, Favaretto AG, et al. Phase II study of pemetrexed plus carboplatin in malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2006;24:1443–8.
8. Castagneto B, Botta M, Aitini E, et al. Phase II study of pemetrexed in combination with carboplatin in patients with malignant pleural mesothelioma (MPM). *Ann Oncol*. 2008;19:370–3.
9. Santoro A, O'Brien ME, Stahel RA, et al. Pemetrexed plus cisplatin or pemetrexed plus carboplatin for chemonaïve patients with malignant pleural mesothelioma: results of the international expanded access program. *J Thorac Oncol*. 2008;3:756–63.
10. Ceresoli GL. Second line treatment in malignant pleural mesothelioma: translating the evidence into clinical practice. *Lung Cancer Manag*. 2014;3:263–71.
11. Buikhuisen WA, Hiddinga BI, Baas P, van Meerbeeck JP. Second-line therapy in malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer*. 2015;89:223–31.
12. Zauderer MG, Kass SL, Woo K, et al. Vinorelbine and gemcitabine as second or third-line therapy for malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer*. 2014;84:271–4.

13. Ceresoli GL, Zucali PA, De Vincenzo F, et al. Retreatment with pemetrexed-based chemotherapy in patients with malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer*. 2011;72:73–7.
14. Bueno R, Opitz I, IASLC Mesothelioma Taskforce. Surgery in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol*. 2018;13:1638–54.
15. Weder W, Opitz I. Multimodality therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann Cardiothorac Surg*. 2012;1:502–7.
16. Cao C, Tian D, Manganas C, et al. Systematic review of trimodality therapy for patients with malignant pleural mesothelioma. *Ann Cardiothorac Surg*. 2012;1:428–37.
17. Bech C, Sorensen JB. Chemotherapy induced pathologic complete response in malignant pleural mesothelioma: a review and case report. *J Thorac Oncol*. 2010;5:735–40.
18. Krug LM, Pass HI, Rusch VW, et al. Multicenter phase II trial of neoadjuvant pemetrexed plus cisplatin followed by extrapleural pneumonectomy and radiation for malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2009;27:3007–13.
19. Opitz I, Weder W. Induction therapy for mesothelioma. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2015;27:240–9.
20. Stamatis G. Risks of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy. *Thorac Surg Clin*. 2008;18:71–80.
21. Pasello G, Ceresoli GL, Favaretto A. An overview of neoadjuvant chemotherapy in the multimodality treatment of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Treat Rev*. 2013;39:10–7.
22. Marulli G, Faccioli E, Bellini A, et al. Induction chemotherapy vs post-operative adjuvant therapy for malignant pleural mesothelioma. *Expert Rev Respir Med*. 2017;11:649–60.
23. Byrne MJ, Davidson JA, Musk AW, et al. Cisplatin and gemcitabine treatment for malignant mesothelioma: a phase II study. *J Clin Oncol*. 1999;17:25–30.
24. Weder W, Kestenholz P, Taverna C, et al. Neoadjuvant chemotherapy followed by extrapleural pneumonectomy in malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2004;22:3451–7.
25. Flores RM, Krug LM, Rosenzweig KE, et al. Induction chemotherapy, extrapleural pneumonectomy, and postoperative high-dose radiotherapy for locally advanced malignant pleural mesothelioma: a phase II trial. *J Thorac Oncol*. 2006;1:289–95.
26. Rea F, Marulli G, Bortolotti L, et al. Induction chemotherapy, extrapleural pneumonectomy (EPP) and adjuvant hemi-thoracic radiation in malignant pleural mesothelioma (MPM): feasibility and results. *Lung Cancer*. 2007;57:89–95.
27. Weder W, Stahel RA, Bernhard J, et al. Multi-center trial of neo-adjuvant chemotherapy followed by extrapleural pneumonectomy in malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol*. 2007;18:1196–202.
28. Van Schil PE, Baas P, Gaafar R, et al. Trimodality therapy for malignant pleural mesothelioma: results from an EORTC phase II multicenter trial. *Eur Respir J*. 2010;36:1362–9.
29. Trousse DS, Avaro JP, D'Journo XB, et al. Is malignant pleural mesothelioma a surgical disease? A review of 83 consecutive extra-pleural pneumonectomies. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2009;36:759–63.
30. Hasegawa S, Okada M, Tanaka F, et al. Trimodality strategy for treating malignant pleural mesothelioma: results of a feasibility study of induction pemetrexed plus cisplatin followed by extrapleural pneumonectomy and postoperative hemithoracic radiation (Japan Mesothelioma Interest Group 0601 Trial). *Int J Clin Oncol*. 2016;21:523–30.
31. Treasure T, Lang-Lazdunski L, Waller D, et al. Extra-pleural pneumonectomy versus no extra-pleural pneumonectomy for patients with malignant pleural mesothelioma: clinical outcomes of the Mesothelioma and Radical Surgery (MARS) randomised feasibility study. *Lancet Oncol*. 2011;12:763–72.
32. Stahel RA, Riesterer O, Xyrafas A, et al. Neoadjuvant chemotherapy and extrapleural pneumonectomy of malignant pleural mesothelioma with or without emithoracic radiotherapy (SAKK 17/04): a randomised, international, multicentre phase II trial. *Lancet Oncol*. 2015;16:1651–8.
33. Abdel-Rahman O, Elsayed Z, Mohamed H, Eltobgy M. Radical multimodality therapy for malignant pleural mesothelioma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;1:CD012605.
34. Baas P, Fennell D, Kerr KM, et al. Malignant pleural mesothelioma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015;26:31–9.
35. Kindler HL, Ismaila N, Armato SG III, et al. Treatment of malignant pleural mesothelioma: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline. *J Clin Oncol*. 2018;36:1343–73.
36. Thödtmann R, Depenbrock H, Dumez H, et al. Clinical and pharmacokinetic phase I study of multitargeted antifolate (LY231514) in combination with cisplatin. *J Clin Oncol*. 1999;17:3009–16.
37. Hollen PJ, Gralla RJ, Liepa AM, et al. Adapting the lung cancer symptom scale (LCSS) to mesothelioma: using the LCSS-Meso conceptual model for validation. *Cancer*. 2004;101:587–95.
38. Gelhorn HL, Skalicky AM, Balantac Z, et al. Content validity and electronic PRO (ePRO) usability of the lung cancer symptom scale-mesothelioma (LCSS-Meso) in mesothelioma patients. *Support Care Cancer*. 2018;26:2229–38.
39. Bottomley A, Gaafar R, Manegold C, et al. Short-term treatment-related symptoms and quality of life: results from an international randomized phase III study of cisplatin with or without raltitrexed in patients with malignant pleural

- mesothelioma: an EORTC Lung-Cancer Group and National Cancer Institute, Canada, Intergroup Study. *J Clin Oncol.* 2006;24:1435–42.
40. Woods B, Paracha N, Scott DA, Thatcher N. Raltitrexed plus cisplatin is cost-effective compared with pemetrexed plus cisplatin in patients with malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer.* 2012;75:261–7.
 41. Tassinari D, Cherubini C, Tamburini E, et al. Antimetabolites in the treatment of advanced pleural mesothelioma: a network meta-analysis of randomized clinical trials. *J Chemother.* 2017;29:365–71.
 42. Ceresoli GL, Castagneto B, Zucali PA, et al. Pemetrexed plus carboplatin in elderly patients with malignant pleural mesothelioma: combined analysis of two phase II trials. *Br J Cancer.* 2008;99:51–6.
 43. Davidson JA, Robinson BWS. Gemcitabine activity on murine and human malignant mesothelioma cell lines show additive activity in combination with cisplatin. *Aust NZ J Med.* 1997;27:213.
 44. Nowak AK, Byrne MJ, Williamson R, et al. A multicenter phase II study of cisplatin and gemcitabine for malignant mesothelioma. *Br J Cancer.* 2002;87:491–6.
 45. Van Haarst JMW, Baas P, Manegold C, et al. Multicentre phase II study of gemcitabine and cisplatin in malignant pleural mesothelioma. *Br J Cancer.* 2002;86:342–5.
 46. Kalmadi SR, Rankin C, Kraut MJ, et al. Gemcitabine and cisplatin in unresectable malignant mesothelioma of the pleura: a phase II study of the Southwest Oncology Group (SWOG 9810). *Lung Cancer.* 2008;60:259–63.
 47. Utkan G, Büyükcelik A, Yalçın B, et al. Divided dose of cisplatin combined with gemcitabine in malignant mesothelioma. *Lung Cancer.* 2006;53:367–74.
 48. Favaretto AG, Aversa SM, Paccagnella A, et al. Gemcitabine combined with carboplatin in patients with malignant pleural mesothelioma. A multicentric phase II study. *Cancer.* 2003;97:2791–7.
 49. Berghmans T, Lafitte JJ, Paesmans M, et al. A phase II study evaluating the cisplatin and epirubicin combination in patients with unresectable malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer.* 2005;50:75–82.
 50. Chahinian AP, Antman K, Goutsou M, et al. Randomized phase II trial of cisplatin with mitomycin or doxorubicin for malignant mesothelioma by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol.* 1993;11:1559–65.
 51. Ardizzoni A, Rosso R, Salvati F, et al. Activity of doxorubicin and cisplatin combination chemotherapy in patients with diffuse malignant pleural mesothelioma. An Italian Lung Cancer Task Force (FONICAP) Phase II study. *Cancer.* 1991;67:2984–7.
 52. Hunt KJ, Longton G, Williams MA, et al. Treatment of malignant mesothelioma with methotrexate and vinblastine, with or without platinum chemotherapy. *Chest.* 1996;109:1239–42.
 53. Middleton GW, Smith IE, O'Brien ME, et al. Good symptom relief with palliative MVP (mitomycin-C, vinblastine and cisplatin) chemotherapy in malignant mesothelioma. *Ann Oncol.* 1998;9:269–73.
 54. Jassem J, Ramlau R, Santoro A, et al. Phase III trial of pemetrexed plus best supportive care compared with best supportive care in previously treated patients with advanced malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol.* 2008;26:1698–704.
 55. Razak AR, Chatten KJ, Hughes AN. Retreatment with pemetrexed-based chemotherapy in malignant pleural mesothelioma (MPM): a second line treatment option. *Lung Cancer.* 2008;60:294–7.
 56. Serke M, Bauer T. Pemetrexed in second-line therapy in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol.* 2007;25(18 Suppl):18198.
 57. Bearz A, Talamini R, Rossoni G, et al. Re-challenge with pemetrexed in advanced mesothelioma: a multiinstitutional experience. *BMC Res Notes.* 2012;5:482.
 58. Zucali PA, Simonelli M, Michetti G, et al. Second-line chemotherapy in malignant pleural mesothelioma: results of a retrospective multicenter survey. *Lung Cancer.* 2012;75:360–7.
 59. Stinco S, Ripa C, La Spina CM, et al. High incidence of hyper-sensitivity reactions in patients with malignant pleural mesothelioma re-treated with carboplatin/pemetrexed. *Proceedings of IMIG Conference; 2012.*
 60. Stebbing J, Powles T, McPherson K, et al. The efficacy and safety of weekly vinorelbine in relapsed malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer.* 2009;63:94–7.
 61. Zucali PA, Perrino M, Lorenzi E, et al. Vinorelbine in pemetrexed-pretreated patients with malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer.* 2014;84:265–70.
 62. Sørensen JB, Urbanska E, Langer SW, Aamdal E. Second-line oral vinorelbine following first-line platinum and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma. *Eur J Clin Med Oncol.* 2012;4:6–13.
 63. Zucali PA, Ceresoli GL, Garassino I, et al. Gemcitabine and vinorelbine in pemetrexed-pretreated patients with malignant pleural mesothelioma. *Cancer.* 2008;112:1555–61.
 64. Toyokawa G, Takenoyama M, Hirai F, et al. Gemcitabine and vinorelbine as second-line or beyond treatment in patients with malignant pleural mesothelioma pretreated with platinum plus pemetrexed chemotherapy. *Int J Clin Oncol.* 2014;19:601–6.
 65. Manegold C, Symanowski J, Gatzemeier U, et al. Second-line (post-study) chemotherapy received by patients treated in the phase III trial of pemetrexed plus cisplatin versus cisplatin alone in malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol.* 2005;16:923–7.

66. Barlesi F, Imbs DC, Tomasini P, et al. Mathematical modeling for Phase I cancer trials: a study of metronomic vinorelbine for advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) and mesothelioma patients. *Oncotarget*. 2017;8:47161–6.
67. Van Meerbeeck BP, Debruyne C, et al. A phase II study of gemcitabine in patients with malignant pleural mesothelioma. *Cancer*. 1999;85:2577–82.
68. Kindler HL, Millard F, Herndon JE II. Gemcitabine for malignant mesothelioma: a phase II trial by the Cancer and Leukemia Group B. *Lung Cancer*. 2001;31:311–7.
69. Margery J, Riviere F, Planchard D, et al. Second-line therapy in patients with malignant pleural mesothelioma. A French retrospective study (2005–2006). *Rev Pneumol Clin*. 2010;66:255–9.
70. Xanthopoulos A, Bauer TT, Blum TG, et al. Gemcitabine combined with oxaliplatin in pretreated patients with malignant pleural mesothelioma: an observational study. *J Occup Med Toxicol*. 2008;18:34.
71. Tourkantonis I, Makrilia N, Ralli M, et al. Phase II study of gemcitabine plus docetaxel as second-line treatment in malignant pleural mesothelioma: a single institution study. *Am J Clin Oncol*. 2011;34:38–42.
72. Pasello G, Nicotra S, Marulli G, et al. Platinum-based doublet chemotherapy in pre-treated malignant pleural mesothelioma (MPM) patients: a mono-institutional experience. *Lung Cancer*. 2011;73:351–5.
73. Mutlu H, Gündüz S, Karaca H, et al. Second-line gemcitabine-based chemotherapy regimens improve overall 3-year survival rate in patients with malignant pleural mesothelioma: a retrospective survey. *Med Oncol*. 2014;31:74.

Capitolo 20

IMMUNOTERAPIA: LA PROMESSA PER IL FUTURO TRATTAMENTO DEI MESOTELIOMI?

S. Brosseau, V. Gounant e G. Zalcman

20.1 Introduzione

La comprensione delle interazioni tra cellule tumorali, fibroblasti associati al tumore (cancer associated fibroblast CAF) e cellule immunitarie (cellule T, monociti-macrofagi, pre-dendritiche e dendritiche) nel microambiente mesotelioma pleurico maligno (MPM) è importante per lo sviluppo di nuove terapie per i pazienti affetti da MPM (figura 20.1) (1). A causa dell'infiammazione cronica dovuta al deposito di fibre di asbesto, nello spazio pleurico e nelle profondità polmonari, il sistema immunitario è sospettato giocare un ruolo importante nella patogenesi del MPM sebbene non ancora del tutto compreso. E' stata osservata una correlazione tra gli esiti clinici migliori e una maggiore infiltrazione tumorale di linfociti T citotossici CD8+ (2). Per contro, come vedremo in seguito in questo capitolo, un'elevata espressione della proteina PD-L1 (programmed cell death ligand 1), inibendo la funzionalità dei linfociti T attraverso il legame con la proteina PD1 (programmed cell death 1) sulla superficie delle cellule T, è stata associata ad una prognosi peggiore nei pazienti con MPM. Tra le diverse immunoterapie valutate finora per ripristinare una risposta immunitaria contro il tumore, gli inibitori dei check-point immunologici (ICI) hanno ricevuto le maggiori attenzioni in seguito all'efficacia clinica osservata soprattutto nel melanoma e nel tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) (3). Un altro check-point inibitorio è la proteina CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein), che viene espressa sulla superficie cellulare di cellule T naïve e interagisce con la proteina B7 espressa sulle cellule che presentano l'antigene (antigen presenting cell, APC) quali le cellule dendritiche. Questa interazione compromette l'attivazione delle cellule T da parte delle APC in una fase precoce della risposta immunitaria quella cosiddetta del "priming", che avviene presumibilmente nei linfonodi vicini al sito tumorale. Si ritiene invece che il pathway di PD1/PDL1 abbia un ruolo all'interno del microambiente tumorale stesso durante la fase effettrice della risposta immunitaria contro il tumore (figura 20.2) (3). In effetti questa dicotomia è probabilmente semplicistica in quanto sia la proteina CTLA-4 che la proteina PD-L1 sono espresse sia dalle cellule tumorali che da quelle immunitarie. Comunque, contrariamente agli studi storici effettuati utilizzando interleukina 2 o vaccini iniettati per via sistemica o localmente intra pleura, e che qui non affronteremo, diversi studi con ICI rivolti al pathway di PD-1/PD-L1 hanno generato risultati promettenti che saranno il principale argomento di questo capitolo.

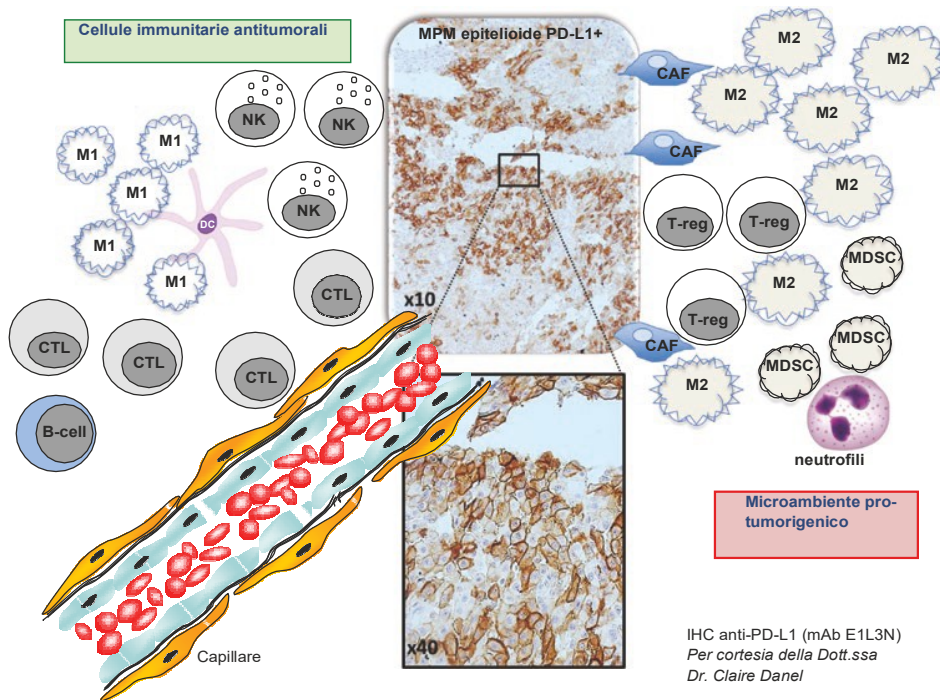


Fig. 20.1. Rappresentazione schematica del microambiente del MPM. Verde: Cellule immunitarie antitumorali (*NK* cellule natural killer (CD16+, KIR+ e granzyme+), *DC* cellule dendritiche mature (IL12+, CD1c+, CD141+ e CD86+), *M1* macrofagi di tipo 1 (IL12+ e CD86+), *CTL* linfociti T citotossici (CD8+, CD28+ e granzyme+), *B-cell* linfociti B). Rosso: Cellule pro-tumorigeniche (*M2* Macrofagi di tipo 2 (IL10+, TGFb+, CD163+ e CD23+), *CAF* fibroblasti associate al tumore, *T-reg* cellule T regolatorie (FoxP3+, CD8+ e CD4+), *MDSC* cellule soppressorie di derivazione mieloide (CD11b+, CD33+, CD14+ e CXRC2+), Neutrofilii). *PD-L1* Ligando del recettore di morte cellulare programmata 1-1.

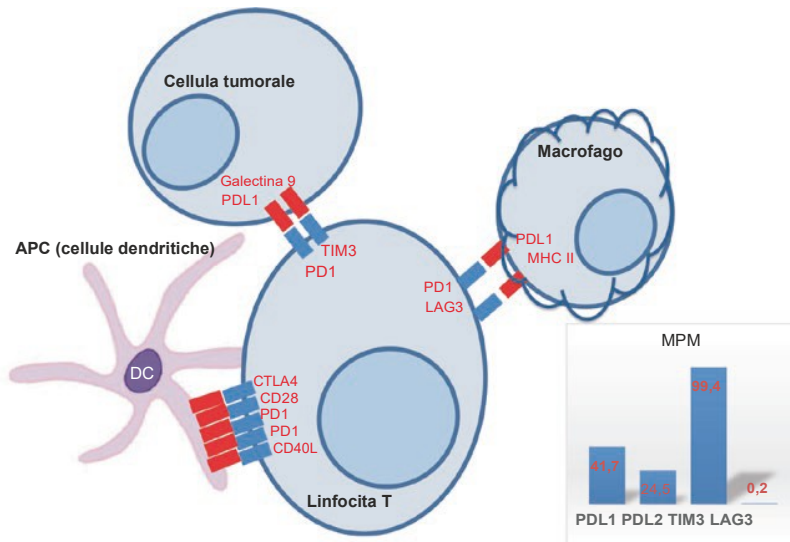


Figura 20.2. Co-espressione di checkpoints inibitori nelle cellule del microambiente del MPM.

20.2 Contesto biologico

Yamada et al. hanno mostrato che l'infiltrato linfocitico è correlato con un miglior esito clinico e può giocare un ruolo chiave nella risposta immunitaria contro il MPM (2). Tuttavia, la risposta immunitaria dell'ospite contro la cellula tumorale è strettamente e negativamente regolata dal complesso formato da PD-1 (Programmed Death 1) e dal suo ligando principale PD-L1. L'opinione corrente è che le cellule tumorali esprimenti PD-L1 siano in grado di inibire l'attivazione di cellule T CD4⁺ e CD8⁺ o condurle all'apoptosi, eliminando quindi il meccanismo antitumorale del sistema immunitario (cellule T citotossiche).

L'efficacia clinica degli ICI che ha condotto alla loro registrazione, è stata correlata con un alto carico mutazionale del tumore, come nei pazienti affetti da melanoma o da NSCLC. Il mesotelioma è stato sempre descritto come un tumore in cui il numero di mutazioni per megabase è basso (4), e quindi non avrebbe dovuto mostrare una buona sensibilità agli ICI rivolti contro PD-1/PD-L1. Probabilmente si tratta di una interpretazione troppo semplicistica, in quanto più che il carico mutazionale per sé, è probabilmente il tipo di geni mutati che ne guida l'effetto. Di certo, nel tumore del colon retto, mutazioni o l'espressione di geni responsabili dell'instabilità di microsatellite, sono chiaramente associati con la risposta agli ICI, probabilmente generando un contenuto di neo-antigeni nel tumore elevato. Nello stesso modo, il gene maggiormente coinvolto nel guidare l'effetto del carico mutazionale nel NSCLC è p53 (5), verosimilmente sia per la sua immunogenicità intrinseca quando mutato che per il suo ruolo sulla stabilità e riparazione del DNA essendo le alterazioni di p53 associate con una maggiore instabilità genetica. Quali geni possano guidare la potenziale efficacia degli ICI nel mesotelioma non è ancora noto, siccome la frequenza di mutazione di p53 è molto più bassa rispetto ad altri tumori. p16 e BAP-1 potrebbero guidare quest'effetto essendo entrambi coinvolti nella regolazione dell'arresto del ciclo cellulare e nella riparazione del DNA o nel rimodellamento della cromatina. Alterazioni nei geni del pathway di Hippo (RASSF1A e NF2, ma anche MST/Hippo o LATS2) (4), regolando lo stato di attivazione del co-attivatore trascrizionale YAP (Yes-Associated Protein) potrebbero anche influenzare la risposta immunitaria contro il tumore. YAP, infatti, controlla la trascrizione di molti geni dell'immunità quali la citochina CXCL5, capace di attrarre le cellule soppressive di origine mieloide (MDSC) che esprimono CXCR2 (6), mentre il cross-talk tra il pathway di Hippo/YAP e i pathways di TGF- β o JAK-STAT coinvolti nella regolazione della risposta immunitaria, sono stati ampiamente descritti (7). Nonostante ciò, sulla base del suo patrimonio genetico, non era inizialmente previsto che il MPM fosse particolarmente responsivo agli ICI. Comunque la ricca componente infiammatoria di questo tumore, specialmente nel sottotipo sarcomatoide e bifasico, ha portato alla visione comune di un tumore "caldo", con un'infiltrazione dello stroma tumorale di monociti-macrofagi, linfociti T e anche neutrofili (figura 20.1). Due studi retrospettivi mostrano che, nei pazienti affetti da MPM, l'espressione di PD-L1 da parte del tumore è correlata con un esito peggiore (8,9).

Mansfield et al. hanno riportato, su una casistica di 106 pazienti, una positività a PD-L1 del 40% utilizzando l'anticorpo anti-PD-L1 clone 5H1-A3 e considerando sia la colorazione delle membrane che quella citoplasmatica, con un limite del 5% (9). Quando la loro analisi è stata limitata esclusivamente al segnale sulle membrane, che sembra essere più specifico e rilevante, solo il 24% dei campioni sono stati classificati come positivi. Su 77 campioni di una serie retrospettiva di 119 campioni, Cedrés et al. hanno trovato un 20% di positività utilizzando l'anticorpo monoclonale E1L3N delle Cell Signaling technology TM, con un limite, comunemente accettato, dell'1% (8). Anche in questo caso, in una serie composta per la grande maggioranza da MPM epitelioide, è stata considerata sia la colorazione proveniente dalle membrane che dal citoplasma.

Più recentemente, un gruppo australiano (1), ha utilizzato i microarrays su tessuto e il clone E1L3N su 311 campioni (dei quali il 30% di istotipo non-epitelioide), la serie più numerosa di pazienti con MPM

analizzata in letteratura ad oggi. Mentre, indipendentemente dall'intensità del segnale, l'espressione di PD-L1 sulle membrane nel 5% o più delle cellule tumorali è stata osservata nel 42% dei pazienti, solo il 9,6% aveva un'elevata positività per PD-L1, con un'intensità del segnale da alta a moderata in almeno il 50% delle cellule tumorali, che correlava con l'istologia non-epitelioide (un numero doppio di tumori con elevata espressione di PD-L1 rispetto ai tumori epitelioidi).

In questa numerosa serie di pazienti, l'espressione di PD-L1 è stata correlata con una sopravvivenza (overall survival, OS) significativamente peggiore (5,3 mesi di sopravvivenza mediana in pazienti altamente positivi e positivi alla colorazione di PD-L1 e 11,33 mesi nei pazienti negativi, HR= 2,37). Questa prognosi più infausta è stata mantenuta anche quando entrambe le categorie istologiche (epitelioide e non epitelioide) venivano analizzate separatamente in un'analisi multivariata. Per contro, l'infiltrato di cellule CD4 positive, CD8 positive o FOXP3 positive (Treg) (vedi figura 20.1), valutato mediante un metodo semi-automatico di analisi quantitativa dell'immagine, espresso come numero di cellule T per 100.000 cellule tumorali e quindi dicotomizzato dalla mediana, non correlava con la sopravvivenza, nonostante alti livelli di ciascuno di questi tre tipi di cellule T fosse significativamente associato con un'alta espressione di PD-L1. Il ruolo dell'infiltrato di monociti-macrofagi e cellule dendritiche non è stato studiato, ma nel microambiente tumorale sono stati trovati sia macrofagi anti-tumorali di tipo I (M1), sia macrofagi pro-tumorali di tipo 2 (M2) (Figura 20.1) (10).

In una coorte australiana composta da 46 pazienti trattati fuori indicazione con l'anti-PD1 pembrolizumab (n=45) o con l'anti-PD-L1 BGB-A317, principalmente in seconda o successive linee (43/46=93%), l'espressione di PD-L1 è stata valutata con l'anticorpo E1L3N con il 5% di colorazione delle membrane cellulari come limite di positività (11). I tumori erano principalmente epitelioidi (n=32/46;70%). La valutazione di PD-L1 è stata effettuata su 14 campioni, con una positività PD-L1+ in 5 (36%) di cui 4 (29%) con espressione elevata (oltre il 50% delle cellule tumorali marcate). I soggetti con PD-L1^{high>50%} hanno mostrato un tasso di risposta (overall response rate, ORR) del 50 % che scendeva al 22% nei pazienti PD-L1 negativi o PD-L1 +. La sopravvivenza libera da progressione (progression free survival, PFS) e OS erano migliori sia nei pazienti PD-L1+ (PFS HR: 0,26) che nei pazienti PD-L1^{hi} (PFS HR: 0,17) sebbene questi dati non siano significativi a causa della bassa numerosità. La positività PD-L1+ rimane un fattore ai limiti della predittività per l'aumento di sopravvivenza anche con un'analisi multivariata (p=0,06), suggerendo un possibile valore predittivo positivo in questi pazienti trattati con l'immunoterapia.

Nello studio di fase III MAPS (12) usando il clone E1L3N sui campioni diagnostici di 214 pazienti reclutati con tessuto rimanente disponibile, fissando il limite per la positività all'1% di marcature delle membrane indipendentemente dall'intensità del segnale, solo il 36% dei pazienti è stato classificato come positivo, ancora una volta con un tasso di positività significativamente più alto in pazienti con tumore sarcomatoide o bifasico (68% di campioni positivi confrontato con il 29,6% dei campioni epitelioidi, con un p<0,001) (G. Zalcman e S. Brosseau dati personali non pubblicati). In un'analisi multivariata includente una stratificazione per le variabili prognostiche dello studio randomizzato, con questo limite dell'1% la positività per PD-L1 non impattava sulla OS, anche se la OS mediana era di 22 mesi nei pazienti positivi per l'espressione di PD-L1 e di 12,3 nei pazienti con PD-L1 negativo, suggerendo una possibile influenza della espressione di PD-L1.

Il gruppo di Raffit Hassan ha studiato l'espressione di PD-L1 in campioni di effusioni maligne da 65 pazienti con mesotelioma pleurico o peritoneale, sia sulle cellule tumorali che sull'infiltrato leucocitario (13). Hanno trovato 41 pazienti (63%) positivi per l'espressione di PD-L1 (con un limite del 5% per la positività, ma non hanno dettagliato l'anticorpo utilizzato) che dimostravano una prognosi più infausta (mediana di 23,3 mesi contro 33,3 mesi, sebbene non statisticamente significativa). Ancora più interessante, gli investigatori sono stati in grado di mostrare che, in nove effusioni valutate, c'era una frazione di cellule fluttuanti esprimenti PD-L1 in un intervallo tra il 12% e l'83%. In sette pazienti in cui oltre all'effusione erano disponibili campioni di cellule mononucleate da

sangue periferico (PMBC), l'espressione di PD-L1 era significativamente più alta nelle cellule T CD3 positive identificate nelle effusioni maligne rispetto a quelle nei campioni di PMBC ($p=0.016$). Il numero di cellule CD14 positive e PD-1 positive erano aumentate nelle effusioni maligne in confronto ai PMBCs ($p=0.03$). Di conseguenza, i linfociti contenuti nelle effusioni maligne riconoscono come autologhe le cellule tumorali come mostrato dall'espressione di PD-L1 sulla superficie delle cellule tumorali, mediata dall'interferone- γ indotto. Questi esperimenti hanno mostrato che effettivamente c'era una risposta immunitaria antitumorale da parte delle cellule T all'interno della cavità pleurica, che conduce al tentativo da parte delle cellule tumorali di limitare questa azione antitumorale delle cellule T attraverso l'espressione di PD-L1 sulla loro superficie. Queste osservazioni supportano il razionale per una possibile efficacia dei farmaci anti PD-1/PD-L1 nel mesotelioma.

Infine, una serie di mesoteliomi pleurici primari diffusi comprendenti gli istotipi epitelioide ($n=148$), bifasico ($n=15$) e sarcomatoide ($n=12$) è stata recentemente valutata attraverso analisi immunohistochimiche per l'espressione di marcatori di cellule tumorali staminali e di PD-L1 con l'anticorpo E1LN3 (10). Il 33% dei tumori esaminati (57/175) contenevano cellule PD-L1 positive (è stata considerata sia la marcatura delle membrane che quella citoplasmatica, usando un limite per la positività del 5%), con una ridotta sopravvivenza nei 66 pazienti con dati di sopravvivenza disponibili (OS mediana = 6,0 mesi contro i 18 mesi dei pazienti con tumori PD-L1 negativi, $p<0,01$). L'espressione di PD-L1 nelle cellule immunitarie associate al tumore (tumor-associated immune cells, TAIs, principalmente macrofagi) è stata valutata e rilevata in 35 casi (20%). Il marcatore delle cellule staminali tumorali ALCAM (CD166) era co-espresso con PD-L1 in 20 tumori, con una certa correlazione tra l'espressione di entrambi i marcatori ($p=0,04$). Questi pazienti mostravano le sopravvivenze più corte (OS mediana 4 mesi contro i 36 mesi senza espressione di ALCAM o PD-L1; $p<0,01$). È interessante che CD166 è stato riportato agire a monte del pathway di Hippo /Yap per regolare la EMT, caratteristica associata ad una maggior aggressività del MPM, tumore nel quale questo pathway è frequentemente alterato.

Quindi, in campioni paraffinati d'archivio, di diversi studi retrospettivi e diversi autori, con serie di diverse dimensioni, usando le fettine intere o i TMA e diversi anticorpi monoclonali diagnostici, con diversi sistemi di assegnazione del punteggio (colorazione delle cellule tumorali e immunitarie, delle membrane e del citoplasma) e diverse piattaforme immunohistochimiche, il mesotelioma pleurico maligno esprime PD-L1 nel 30-63 % dei casi. Comunque, in tutti questi studi, l'espressione di PD-L1 è risultata più alta nei MPM sarcomatoidi o bifasici e in molte serie correla con una sopravvivenza più corta, anche se l'impatto prognostico dell'espressione di PD-L1, in queste serie retrospettive, è difficilmente discriminabile dal maggior impatto prognostico di questi sottotipi istologici, anche utilizzando un'analisi multivariata.

20.3 Dati disponibili dagli studi clinici attualmente presentati

20.3.1 Studi di seconda linea utilizzando una monoterapia con anticorpi monoclonali contro CTLA-4 (tabella 20.1)

La proteina CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein) è il primo checkpoint la cui inibizione è stata studiata in studi clinici dedicati al mesotelioma, probabilmente grazie alla disponibilità di anticorpi anti-CTLA4 e alla loro efficacia nel melanoma. Anticorpi anti-PD1 o PD-L1 erano all'epoca valutati in tumori più frequenti. I primi risultati, considerati incoraggianti, sono stati riportati in pazienti con mesotelioma maligno avanzato resistente alla chemioterapia, utilizzando tremelimumab, un anticorpo monoclonale selettivo contro CTLA-4 costituito da una immunoglobulina umana G2, che in uno studio accademico di fase 2 in aperto a braccio singolo (MESOTTREM-2008) ha promosso l'attività delle cellule T, ma senza causare deplezione delle cellule T regolatorie (14).

I pazienti affetti da MPM o da mesotelioma peritoneale (solo un caso come indicato nella prima tabella del lavoro che descrive la popolazione in studio) con performance status (PS) 0-2 e lesioni misurabili, hanno ricevuto tremelimumab alla dose di 15 mg/kg endovena, una volta ogni 90 giorni fino alla progressione o ad una tossicità severa. L'obiettivo primario di questo studio era il tasso di risposta globale (overall response rate, ORR), valutato secondo i criteri di valutazione della risposta nei tumori solidi (response evaluation criteria in solid tumors, RECIST) modificati per il mesotelioma pleurico maligno, ma senza una revisione centralizzata indipendente delle risposte. È stato usato un disegno classico di Simon a due stadi, che ha condotto al reclutamento di 29 pazienti in un periodo di tempo relativamente lungo (30 mesi), con un tasso di risposta del 17% come obiettivo considerato indicativo di attività del farmaco in questo contesto, che presuppone la necessità di osservare 4 risposte oggettive in 29 pazienti per raggiungere questo obiettivo. La maggior parte di questi pazienti (25/29, 86%) aveva ricevuto una terapia standard di prima linea con platino combinato a pemetrexed. Su 29 pazienti, 23 (79%) avevano avuto una progressione di malattia documentata entro 6 mesi dalla prima linea a base di platino e in 15 (68%) la progressione era avvenuta durante la chemioterapia. Quindi, un quinto di questi pazienti (21%) aveva mostrato una progressione indolente della malattia, oltre 6 mesi dopo la fine della prima linea a base di platino, il che deve portare a utilizzare le dovute cautele nell'interpretare il significato del tasso di pazienti con stabilizzazione della malattia. Il tempo mediano tra la fine del primo regime terapeutico contenente platino e l'osservazione documentata di una progressione di malattia è stato di 2,1 mesi con un successivo tempo mediano di 1,3 mesi tra la progressione e l'inizio del trattamento con anti-CTLA4, ottenendo complessivamente un tempo mediano totale di 3,4 mesi, nuovamente indicativo di tumori relativamente indolenti (un bias classico di questi studi di fase II a braccio singolo).

Sono state osservate solo due risposte, e di conseguenza questo studio deve essere considerato negativo, tuttavia con l'aggiunta di altri 7 pazienti con stabilizzazione di malattia si è raggiunto un tasso di controllo della malattia (disease control rate, DCR) del 31%, considerato incoraggiante dagli autori, nonostante il reclutamento di pazienti con tumori potenzialmente a lenta crescita. La durata mediana del controllo della malattia è stata stimata di 12,4 mesi. Da notare che le due risposte osservate sono state molto durature, oltre i sei mesi, cogliendo l'attenzione dei ricercatori. La PFS mediana dell'intera corte di studio è stata di 6,2 mesi e anche questo dato si presta ad una doppia interpretazione, sia come effetto del trattamento o come reclutamento di pazienti con tumori indolenti. La OS mediana è stata di 10,7 mesi, con un 37% di sopravvivenza ai 2 anni che può essere interpretata allo stesso modo tenendo in considerazione la relativa inefficacia dei trattamenti di seconda e terza linea nel MPM, con l'eccezione del ritrattamento con pemetrexed nei pazienti che non lo ricevono nei precedenti 6-12 mesi (15).

Tabella 1: Elenco degli studi clinici valutanti l'efficacia della monoterapia a base di anticorpi monoclonali anti-CTLA-4 in pazienti affetti da mesotelioma

Studio	Linea di terapia	Farmaco	Localizzazione	Fase	N° di pazienti	DCR (mRECIST)	PFS	OS	ref
MESOTTREM-2008 (NCT01649024)	2 ^a	Tremelimumab	Pleurico +peritoneale	2	29	31%	6.2 mesi	10.7 mesi	(14)
MESOTTREM-2012 (NCT01655888)	2 ^a	Tremelimumab	Pleurico +peritoneale	2	29	37.9%	6.2 mesi	11.3 mesi	(15)
DETERMINE (NCT01843374)	2 ^a	Tremelimumab	Pleurico +peritoneale	2b R	571 (382 Treme 189 placebo)	27 vs. 21.7 %	2.8 vs. 2.7 mesi	7.7 vs. 7.3 mesi	(16)

ND: Non disponibile; DCR= Tasso di controllo della malattia (Disease Control Rate), PFS= sopravvivenza libera da progressione (Progression-Free Survival); OS= Sopravvivenza globale

Sfortunatamente non è stato mostrato nessun dato su terapie seguenti. Il profilo di sicurezza di tremelimumab è stato favorevole, senza morti tossiche e con solo il 14% di pazienti con eventi di grado 3-4. Il 72% degli eventi di grado 1-2 osservati si è risolto spontaneamente o con trattamenti sintomatici con brevi cicli di steroidi. Due pazienti hanno riportato colite microscopica con diarrea, un evento comunemente associato all'immunità e frequente con i farmaci anti-CTLA4. I dati più interessanti di questo studio fondamentale sono stati quelli del monitoraggio dei linfociti nel sangue in 28 dei 29 pazienti arruolati. Il tasso di cellule T circolanti CD4+/ICOS+, determinato valutando l'espressione di marcatori selezionati sulla superficie attraverso tecniche di immuofluorescenza diretta e citometria a flusso, al giorno 30 del primo ciclo di trattamento, è stato associato ad una più lunga sopravvivenza, mentre la determinazione del numero dei diversi sottotipi di cellule T al basale non aiutava a predire le sopravvivenze più lunghe dopo tremelimumab. Questa osservazione suggeriva che alcune indicazioni di efficacia potrebbero essere osservate subito dopo il primo mese di trattamento, seppur con una tecnologia costosa quale il FACS (fluorescence-activated cell sorting).

Gli stessi ricercatori hanno riportato un secondo studio accademico di fase II in aperto a braccio singolo (MESOTTREM-2012) (16), con uno schema di trattamento di tremelimumab intensificato a 10 mg/kg ogni 4 settimane per 6 dosi e successivamente ogni 12 settimane fino a progressione o tossicità. L'obiettivo principale era ancora la ORR, ma utilizzando i criteri iRECIST e quindi determinando la proporzione di pazienti che raggiungevano una risposta oggettiva (completa o parziale) immuno-relata, aggiudicato che avessero ricevuto almeno una dose del farmaco in studio. I criteri di inclusione erano sostanzialmente gli stessi dello studio precedente, con ancora un solo paziente con mesotelioma peritoneale. In questo studio, i pazienti che mostravano una progressione della malattia alla prima rivalutazione continuavano a ricevere tremelimumab in assenza di segni clinici o sintomi di

progressione. A meno che le condizioni del paziente deteriorassero rapidamente, la progressione veniva confermata da due scansioni CT a distanza di almeno 6 settimane, anche se, ancora una volta, senza una revisione centralizzata. Come nello studio precedente è stato utilizzato un disegno di Simon a due stadi con un tasso di risposta del 17 % scelto come obiettivo per considerare il farmaco in studio clinicamente attivo e una potenza del 70%. La dimensione campionaria di 29 pazienti è stata raggiunta entro un anno. Una analisi intermedia prestabilita sulla sicurezza è stata un successo non essendo state osservate tossicità rilevanti nella prima fase dello studio sui primi 11 pazienti trattati. Quattro pazienti hanno avuto una risposta parziale immuno-relata: uno alla prima rivalutazione (dopo circa 12 settimane) e tre alla seconda rivalutazione (a circa 24 settimane), portando l'ORR valutato secondo i criteri iRECIST a solo 13,8%, senza pertanto indicare chiaramente un'attività significativa. Ancora più sconcertante era il fatto che quando venivano utilizzati i classici criteri mRECIST per il mesotelioma, veniva trovata solo una risposta parziale. La proporzione di pazienti in cui si otteneva un controllo della malattia con iRECIST, era del 51,7% (15 su 29 pazienti), con una durata media del controllo della malattia di 10,9 mesi, ma il DCR era solo del 37,9% con mRECIST. La sopravvivenza libera da progressione immuno-relata mediana è stata di 6,2 mesi, la sopravvivenza globale mediana di 11,3 mesi e la sopravvivenza ad un anno è stata del 48,3%, tutti valori strettamente confrontabili allo studio precedente. Comunque, i sette pazienti con mesotelioma maligno bifasico o sarcomatoide avevano avuto una sopravvivenza globale mediana di 15,8 mesi che si confrontava favorevolmente con quella osservata con pemetrexed nello studio registrativo, in questo sottogruppo di popolazione noto avere una prognosi peggiore e resistenza alla chemioterapia, suggerendo che questi sottotipi possono trarre specificamente benefici dall'immunoterapia, come sospettato dalle analisi patologiche del contenuto immunitario e dai dati di espressione di PD-L1, sopra riportati. In ogni caso, i numeri limitati di questo sottogruppo spiegano perché non sono state osservate correlazioni con iORR, iPFS o OS mentre il PS o l'indice EORTC (European Organization for Research and Treatment of Cancer) sono significativamente associati con iPFS o OS. Inoltre, il profilo di sicurezza era favorevole, senza morti tossiche e con molto pochi eventi avversi (AE) inattesi di grado 3-4. I pazienti con un rapporto di neutrofili circolanti su cellule T CD4+, ICOS+ sotto la mediana al giorno 14 del secondo ciclo, ma non ai precedenti punti sperimentali analizzati, avevano una sopravvivenza globale significativamente migliore di quelli con un rapporto uguale o più grande della mediana, ricordando le precedenti osservazioni, sebbene espresse diversamente e misurate a tempi diversi (44 vs 30 giorni dopo il primo ciclo), forse per mancanze di riproducibilità o stabilità di questa variabile prognostica/predittiva.

Infine, congratulazioni agli autori in quanto questo studio era uno dei rari esempi che hanno incluso un'analisi farmacocinetica, effettuata sui primi 14 pazienti, che dimostrava che la maggior parte dei pazienti manteneva concentrazioni di tremelimumab al di sopra della soglia di 30 µg/ml durante l'intero intervallo tra le dosi, quindi sostenendo il nuovo schema di dosaggio scelto per questo studio.

Sulla base di questi dati, anche se, come detto, alcune limitazioni potrebbero aver oscurato l'interpretazione di entrambi gli studi, tremelimumab è stato valutato nel MPM da solo contro placebo in seconda e terza linea di trattamento nello studio DETERMINE, un grande studio di fase IIb randomizzato (17). Erano eleggibili pazienti, con mesotelioma maligno pleurico o peritoneale non resecabile, con malattia misurabile e con PS 0-1, in progressione dopo uno o due precedenti trattamenti sistemici per la malattia avanzata. La randomizzazione dei pazienti era stratificata per lo status EORTC (basso rischio vs alto rischio), per la linea di terapia (seconda vs terza linea) e sede anatomica (pleurica

vs peritoneale). Tuttavia, il tempo trascorso tra l'ultima linea di trattamento contenente pemetrexed non è stato incluso tra le variabili di stratificazione e quindi uno sbilanciamento nell'arruolamento di tumori indolenti tra i due bracci potrebbe non essere controllato con questo schema di randomizzazione. Tremelimumab 10 mg/kg o placebo sono stati somministrati endovena, ogni 4 settimane per sette dosi e in seguito ogni 12 settimane fino a progressione o tossicità. L'arruolamento è stato particolarmente veloce con 571 pazienti randomizzati (2:1) per ricevere tremelimumab o placebo, in 18 mesi, in 105 centri nel mondo. Siccome questo studio sponsorizzato da un'azienda (AstraZeneca) era controllato contro placebo, ha utilizzato i criteri classici mRECIST per il mesotelioma e la OS era l'obiettivo primario. Non è stata effettuata una revisione centralizzata delle risposte. Se il paziente derivava un beneficio clinico dal trattamento, gli investigatori avevano la possibilità di continuarlo anche in caso di progressione mRECIST, per prendere in considerazione le cosiddette pseudo-progressioni, particolarmente frequenti nei pazienti con melanoma, ma la cui incidenza è attualmente sconosciuta nel mesotelioma. Tuttavia, se il carico tumorale alla scansione di conferma era del 20% più grande del carico tumorale alla scansione iniziale mostrando una reale progressione di malattia, il paziente veniva considerato in progressione e il trattamento in studio interrotto. Lo studio era stato inizialmente disegnato per arruolare 180 pazienti, in base ad un disegno di superiorità con 80% di potenza e un rischio α a due code del 20%. Dopo la randomizzazione di 107 pazienti e prima di ogni apertura del cieco, è stato emendato in accordo con le analisi delle due fasi II descritte in precedenza. Complessivamente 382 pazienti sono stati assegnati a ricevere tremelimumab, 189 al placebo, con un'età mediana di 66 anni. Il 95,5% dei pazienti aveva il mesotelioma pleurico, di cui il 16,4% con un'istologia non epitelioide; un terzo aveva ricevuto due linee di terapia precedenti di cui il 99% una prima linea a base di pemetrexed; il 58,8% aveva un punteggio EORTC a basso rischio e il 95% aveva un mesotelioma allo stadio IIIB/IV. I pazienti hanno ricevuto una mediana di tre cicli. Sfortunatamente non è stato ottenuto un vantaggio sulla sopravvivenza dei pazienti nel gruppo trattato con tremelimumab verso il placebo (OS mediana rispettivamente di 7,7 vs 7,3 mesi, HR=0,92; p=0,408) e nessun sottogruppo di pazienti ha beneficiato significativamente dal trattamento con tremelimumab sebbene una tendenza non significativa sia stata osservata nel gruppo degli MPM sarcomatoidi (HR=0,68) e nel gruppo degli stadi precoci (\leq III). Un'analisi successiva attuata quando l'80% dei pazienti erano morti confermava che la sopravvivenza a lungo termine non era diversa, con le curve di sopravvivenza praticamente sovrapponibili. Non è stata osservata nessuna differenza nelle terapie seguenti, nessun paziente di entrambi i gruppi ha ricevuto farmaci anti-PD1 o anti-PD-L1. Solo otto pazienti hanno avuto risposte parziali confermate, avvalorando la totale mancanza di attività di tremelimumab in monoterapia. Anche se il 27% dei pazienti ha avuto una stabilizzazione della malattia (\geq di sei settimane post-randomizzazione) il braccio placebo si è comportato in modo simile, con un 22% di stabilizzazioni, mostrando come queste debbano essere considerate con cautela nel MPM e sostenendo l'utilizzo di un braccio di controllo negli studi sul MPM, anche in fase II per evitare il bias di tumori pleurici indolenti. Questi risultati avrebbero potuto affondare studi successivi con ICI se i farmaci anti-PD-1/PD-L1 non avessero dato risultati rapidi e sorprendenti la cui ampiezza appariva chiaramente dal confronto con i dati storici ma ancora recenti dello studio DETERMINE.

20.3.2 Studi di seconda linea usando la monoterapia con anticorpi monoclonali anti-PD-1 o PD-L1 (tabella 20.2)

Diversi studi volti a valutare l'efficacia degli ICI contro il pathway di PD-1/PD-L1 hanno certamente generato risultati promettenti, tutti presentati oralmente negli ultimi congressi internazionali, molti di essi meritevoli di pubblicazione.

Il primo dato viene da uno studio "basket" multi-coorte di fase Ib, multicentrico, non randomizzato in aperto (Keynote 028), con uno strato dedicato al MPM, con inclusi 25 pazienti affetti da MPM positivo per l'espressione di PD-L1, trattati con l'anticorpo anti-PD-1 pembrolizumab della Merk, alla dose di 10 mg/kg e.v. ogni 2 settimane (18).

Tabella 2: Elenco degli studi clinici valutanti l'efficacia della monoterapia a base di anticorpi monoclonali anti-PD-1 o PD-L1 in pazienti affetti da mesotelioma

Studio	Linea di terapia	Farmaco	Localizzazione	Fase	N° di pazienti	DCR (mRECIST)	PFS	OS	ref
KEYNOTE 028 (NCT0205480)	2 ^a	Anti-PD-1 Pembrolizumab	Pleurico +peritoneale	1b	25	72%	5.4 mesi	18 mesi	(18)
KEYNOTE-139 Chicago University /NCI (NCT02399371)	2 ^a /3 ^a	Anti-PD1 Pembrolizumab	Pleurico +peritoneale	2	35 (part 1)	77%	6.2 mesi	11.9 mesi	(19)
Registro Nazionale Svizzero	2 ^a o successive linee	Anti-PD1 Pembrolizumab	Pleurico +peritoneale	—	48	52%	3.6 mesi	7.2 mesi	(20)
NIVOMES (NCT02497508)	2 ^a o successive linee	Anti-PD-1 Nivolumab	Pleurico +peritoneale	2	34	29% a 6 mesi	3.6 mesi	11.8 mesi	(21)
MERIT (ONO-4538-41/ Japic CTI- No.163247)	2 ^a /3 ^a	Anti-PD-1 Nivolumab	Pleurico +peritoneale	2	29	67.6% a 6 mesi	6.1 mesi	NR	(22)
JAVELIN	2 nd o successive linee	Anti- PD-L1 Avelumab	Pleurico +peritoneale	1b	53	58.5%	4.1 mesi	10.9 mesi	(23)
ETOP 9-14 PROMISE-Meso (NCT02991482)	2 ^a /3 ^a	Anti-PD-1 Pembrolizumab vs. Gemcitabine or Vinorelbine	Pleurico +peritoneale	3	144	ND	ND	ND	http://www.etop-eu
CONFIRM (University of Southampton) (Numero di studio UK CRUK 16/022)	2 ^a	Anti-PD-1 Nivolumab vs. placebo (doppio cieco)	Pleurico +peritoneale	3	336 (randomizzazione 2:1)	ND	ND	ND	https://www.southampton.ac.uk/
KEYNOTE-158* (NCT02628067)	2 ^a o successive linee	Anti-PD1 Pembrolizumab	Pleurico +peritoneale	2 basket	1350 (totale con tutti i diversi tumori)	ND	ND	ND	https://clinicaltrials.gov

* Keynote-158 è un grande studio basket in cui l'esatto numero di pazienti con mesotelioma è sconosciuto.

ND: Non disponibile; DCR= Tasso di controllo della malattia (Disease Control Rate), PFS= sopravvivenza libera da progressione (Progression-Free Survival); OS= Sopravvivenza globale; NR= Non Raggiunto

I pazienti dovevano avere un PS di 0-1, una malattia misurabile, una diagnosi istologica di MPM e dovevano avere fallito la terapia standard o essere considerati “non idonei a ricevere la chemioterapia”. L’espressione di PD-L1 è stata valutata con l’utilizzo dell’anticorpo 22C3 (Merk, Kenilworth NJ, USA), con un limite di cellule tumorali o *cellule infiammatorie associate* con segnale sulle membrane stabilito per la positività $\geq 1\%$, indipendentemente dall’intensità del segnale stesso. Su 83 pazienti con campioni istologici valutabili, il 45,7% (n=38) ha avuto un risultato positivo, di questi 25 erano eleggibili per lo studio. Sebbene altamente selezionati per questa fase I (i due terzi avevano un PS=1), i pazienti non differivano fondamentalmente dalla popolazione standard di pazienti con MPM, come atteso in questo contesto sperimentale, con una età mediana di 65 anni, una prevalenza di sesso maschile (due terzi della popolazione) e il 72% di istotipi epitelioidi, di cui un terzo con due o più linee precedenti (solo due pazienti non erano pretrattati). L’84% aveva ricevuto precedenti trattamenti con pemetrexed e l’88% era stato esposto ai derivati del platino. L’obiettivo primario è stato condiviso in tutti gli strati, per mostrare una ORR superiore al 10% con un errore α complessivo a una coda dell’8%. Ventidue pazienti dovevano essere reclutati per avere una potenza dell’80%. In realtà sono stati arruolati 25 pazienti che hanno ricevuto almeno una dose di pembrolizumab. Il profilo di sicurezza è stato gestibile, con i classici eventi avversi immuno-mediati (IRAEs) nel 12 % dei pazienti ma in un solo paziente è stato necessario ridurre la dose di farmaco. AEs di grado 3 sono stati osservati nel 20% dei pazienti, mentre non è stato registrato nessun evento di grado 4 o 5.

I risultati sono stati incoraggianti, con il 20% di ORR e il 52 % dei pazienti che ha raggiunto una stabilizzazione della malattia (SD). La durata delle risposte (duration of response, DOR) era più convincente, con una mediana di 12 mesi (95%CI: 3,7-non raggiunto (NR)), mentre la durata delle stabilizzazioni di malattia (5,6 mesi) era coerente con quella osservata nel braccio placebo dello studio DETERMINE. Il tempo alla risposta è stato breve (mediana 1,8 mesi (1,7-3,8)) e la PFS mediana non fantastica, essendo di 5,4 mesi. Tuttavia, la OS mediana è stata di 18 mesi e il 62,6% dei pazienti erano ancora vivi a 1 anno, con due pazienti che avevano ricevuto il farmaco per la durata massima di 24 mesi di trattamento, e due altri pazienti con risposta ancora in trattamento a 22 mesi. Ancora più sorprendentemente, quattro pazienti hanno ottenuto una riduzione del carico tumorale di oltre il 70%, supportando chiaramente l’attività del farmaco, una caratteristica che non era stata riportata nei precedenti studi con anti-CTLA-4.

I risultati finali di uno studio statunitense di fase II a braccio singolo (KEYNOTE-139, NCT02399371) che valutava l’attività in seconda linea di una dose fissa di pembrolizumab (200 mg ogni 3 settimane), hanno confermato l’attività e la tollerabilità di questo farmaco anti-PD1 in pazienti con MPM pretrattati (19). Sessantacinque pazienti affetti da MPM con PS=0-1, malattia in progressione dopo uno o due precedenti regimi di trattamento di cui uno a base della combinazione pemetrexed-platino e malattia misurabile, sono stati trattati con pembrolizumab alla dose di 200 mg e.v. ogni 21 giorni, con la prima rivalutazione mediante CT effettuata a 9 settimane. L’età mediana era di 68 anni, il 53% dei pazienti aveva PS=0 e nel 77% dei casi l’istologia era epitelioide. Il 12% dei pazienti aveva una malattia peritoneale e il 61% aveva ricevuto solo un precedente trattamento. Risposte parziali in accordo con i criteri mRECIST sono state osservate in 14 pazienti (22%), mentre 26 avevano una malattia stabile a 9 settimane. La tossicità è stata gestibile (4,5% di polmoniti di grado 2-3, 4,5% di insufficienza surrenalica di grado 3, 1,5% di coliti di grado 3 e 3% di epatiti di grado 3-5), tuttavia un paziente ha sviluppato un’epatite autoimmune di grado 5 e un altro è morto per cause sconosciute.

Secondo un'analisi immunohistochimica centralizzata, effettuata su 62 pazienti con l'anticorpo 22C3 (Qualtek laboratory), l'espressione di PD-L1 era negativa (<1% delle cellule) nel 45% dei casi, mentre il 32% aveva una bassa espressione di PD-L1 (1-49% delle cellule) e il 23% un'espressione elevata (\geq 50% delle cellule). Quando usata come marcatore continuo, l'elevata espressione di PD-L1 correlava con un tasso di risposta più alto (area sotto la curva ROC =0,69; 95%CI; 0,53-0,84). ORR e PFS erano rispettivamente più alto ($p=0,021$) e più lunga ($p=0,034$) in pazienti con elevati livelli di espressione di PD-L1 in confronto ai pazienti con espressione bassa o assente, ma la OS non era influenzata dal contenuto di PD-L1. La PFS a un anno era del 40,2% in pazienti con elevata espressione di PD-L1 e del 9,3% negli altri ($p=0,019$).

Infine, l'analisi di un registro svizzero su 48 pazienti con MPM, PS 0-2, in progressione dopo una singola linea di trattamento a base di pemetrexed, e trattati fuori indicazione con pembrolizumab è stata presentata al congresso ESMO 2017 (20). Un'analisi delle risposte basata sul giudizio dello sperimentatore in accordo con i criteri mRECIST ha trovato un 25% di ORR e un 53% di DCR. La PFS mediana era di 3,6 mesi nell'intera coorte, con 7,2 mesi di OS mediana. I pazienti con PS = 0-1 avevano 10,2 mesi di OS. Certamente, questi dati retrospettivi, senza una revisione centralizzata della risposta, dovrebbero essere considerati con cautela anche se questi dati di "vita reale" possono supportare i dati di attività ottenuti dagli studi di fase I-II di seconda linea con pembrolizumab. In questa serie la valutazione dell'espressione di PD-L1 ha mostrato una chiara correlazione tra l'attività del pembrolizumab e l'espressione crescente di PD-L1 nelle cellule tumorali: tutti i 4 pazienti con espressione in più del 50% delle cellule tumorali hanno raggiunto una stabilizzazione della malattia contro il 32% dei pazienti PD-L1 negativi (con meno dell'1% di cellule tumorale esprimenti PD-L1), con un HR significativo di 0,27 per la PFS.

Convinto da questi dati preliminari, un altro gruppo ETOP ha lanciato uno studio ben disegnato, ETOP 9-14 PROMISE, con lo scopo di confrontare, dopo una precedente linea di chemioterapia, il pembrolizumab a dose fissa di 200 mg e.v. al giorno 1 di un ciclo di tre settimane, ripetuto fino alla progressione attestata secondo i criteri iRECIST, per un massimo di due anni, con una chemioterapia di seconda linea scelta istituzionalmente tra gemcitabina 1.000 mg/m² e.v. d1/d8, q3w o vinorelbina 30 mg/m² e.v. d1/d8 q3w o vinorelbina 60 mg/m² p.o. d1/d8 q3w, con la possibilità di crossover alla progressione. Questo studio di fase III, ha bisogno di arruolare 142 pazienti per osservare un aumento della sopravvivenza libera da progressione, valutata secondo una revisione indipendente, da 3 a 6 mesi (HR=0,58).

Un altro anticorpo anti-PD-1, nivolumab (Nivo), è stato valutato in seconda o terza linea da un gruppo tedesco nello studio NivoMes, presentato oralmente ai congressi IMIG 2016 e WCLC 2017 dal Dr Paul Baas (21). I pazienti dovevano essere in progressione dopo almeno una linea di trattamento, i campioni istologici al basale dovevano essere disponibili, il tumore doveva essere accessibile per nuove biopsie e con analisi delle cellule mononucleate da sangue periferico al FACS su campioni ematici prelevati al basale. L'obiettivo primario era il DCR a 12 settimane prevedendo un aumento dal 20 al 40%, che con una potenza dell'80% e un livello α del 5% ha portato all'arruolamento di 33 pazienti, in accordo con il disegno dello studio che prevedeva l'osservazione di cinque OR nei primi 18 pazienti arruolati. I pazienti hanno ricevuto nivolumab tramite infusione endovenosa, alla dose di 3 mg/kg ogni due settimane. Una nuova biopsia e un campionamento dei PBMC sono stati effettuati a 6 settimane. Il reclutamento è stato rapido, con 34 pazienti (28 epitelioidi e 6 sarcomatoidi e bifasici) arruolati in

meno di un anno. I pazienti avevano le classiche caratteristiche epidemiologiche, con una età mediana di 68 anni, 28 maschi, ma solo un paziente aveva ricevuto più di una linea precedente. Solo 9/34 pazienti (26,5%) avevano campioni con più dell'1% di cellule tumorali marcate per l'espressione di PD-L1 e di cui tre avevano oltre il 50% di cellule positive utilizzando il saggio 28.8 DAKO. Lo studio è stato chiaramente positivo con un DCR del 29% a 6 mesi (di cui due casi di pseudo-progression), ORR del 23,5 % (n=8) e una PFS mediana di 110 giorni (3,6 mesi). Al momento dell'ultima presentazione, sei pazienti erano ancora in trattamento a 40 settimane, con un 33% di DCR a 6 mesi (inclusi 4 pazienti con SD), mostrando ancora una volta una durata convincente dell'effetto del trattamento. Il profilo di sicurezza non ha mostrato eventi inattesi, con il 26 % di IRASs di grado 3-4, ma si è osservata una morte tossica legata al trattamento dovuta a polmonite. Le risposte sono state viste in tutti i gruppi, indipendentemente dall'espressione di PD-L1, sebbene la numerosità limitata precluda ogni conclusione definitiva.

Uno studio multicentrico giapponese, MERIT (ONO-4538-41/JapicCTI-No.163247) è stato presentato al congresso WCLC 2018 da Nakano et al. in pazienti con MPM avanzato o metastatico in seconda o terza linea, o in pazienti intolleranti alle combinazioni a base di platino e pemetrexed (n=34) (22). L'obiettivo primario era l'ORR e nivolumab è stato utilizzato alla dose di 240 mg ogni 2 settimane. Il tasso di risposta atteso era del 19,2% con un 80% di potenza e un livello α del 5%. L'età mediana era di 68 anni, il 29,4% dei pazienti aveva ricevuto due precedenti linee di trattamento, il 79,4% aveva un'istologia epitelioide e il 61% aveva un PS=1. Lo studio è stato positivo siccome l'ORR ha raggiunto il 29,4% e la DCR a 6 mesi era del 67,6% senza problemi di tossicità inattesi. I pazienti sono stati seguiti per un tempo mediano di 16,8 mesi, la PFS mediana era di 6,1 mesi e la OS mediana di 17,3 mesi. Lo stato dell'espressione di PD-L1, valutato utilizzando il test Dako PD-L1 IHC 28-8 pharmDx, influenzava chiaramente la sopravvivenza, con una PFS di 7,2 mesi in pazienti con espressione di PD-L1 >1% e di 2,9 mesi negli altri, e una OS mediana di 17,3 mesi nei pazienti PD-L1 positivi e di 11,6 in quelli negativi. Polmoniti interstiziali o polmoniti di grado 3 sono state osservate in 3 dei 20 pazienti PD-L1 positivi (15%). Sulla base dello studio MERIT, il 21 agosto nivolumab è stato approvato in Giappone per il trattamento di pazienti con MPM avanzato non resecabile in progressione dopo la chemioterapia. Finalmente i risultati dello studio dedicato al mesotelioma dello studio "basket" di fase Ib JAVELIN (NCT01772004), a coorti multiple, multicentrico, non randomizzato, in aperto che valutava avelumab, un anticorpo IgG1 anti-PD-L1, completamente umanizzato in circa 2.200 pazienti con oltre 15 tipi di tumori, sono stati presentati come poster al congresso ASCO 2018 (23). Cinquantatré pazienti con mesotelioma pleurico o peritoneale non resecabile in progressione dopo platino e pemetrexed, sono stati trattati con avelumab, 10 mg/kg e.v. ogni due settimane fino alla progressione, tossicità inaccettabile o all'abbandono del paziente. I pazienti avevano precedentemente ricevuto 1 (n=18), 2(n=15) o ≥ 3 (n=20) precedenti linee di chemioterapia. Dopo un periodo di osservazione mediano di 24,8 mesi, vi era solo il 9,4% di ORR confermate con 15,2 mesi di durata mediana delle risposte, in contrasto con i dati precedenti, sebbene in questa casistica un numero maggiore di pazienti era pesantemente pretrattato. La DCR era del 58,5%, anch'essa modesta e la PFS e la OS mediane rispettivamente di 4,1 e 10,9 mesi. Comunque, nei 16 pazienti valutabili con tumori PD-L1+ (cellule tumorali positive alla colorazione $\geq 5\%$), l'ORR era del 18,8% sebbene la PFS a 6 mesi non differisse da quella dell'intera serie. Il profilo di sicurezza è risultato accettabile senza morti tossiche.

20.3.3 Studi con combinazioni di anticorpi monoclonali anti-PD-1 o anti PD-L1 e anti-CTLA4 (tabella 20.3)

Con questo scenario in mente, lo studio IFCT 1501 MAPS2 (NCT02716272) di fase II non comparativa randomizzata, è stato lanciato per valutare in pazienti con MPM le potenzialità dell'anti PD-1 nivolumab come agente singolo o in combinazione con l'anti-CTLA4 della BMS, ipilimumab, in seconda o terza linea (24). Pazienti con PS 0-1, diagnosi istologica di mesotelioma pleurico maligno non resecabile, malattia misurabile secondo una valutazione centralizzata da parte di due gruppi indipendenti di radiologi utilizzando i criteri mRECIST e con una progressione documentata (tutte le scansioni CT sono state revisionate centralmente), sono stati randomizzati 1:1 per ricevere nivolumab (nivo) 3 mg/kg, ogni 2 settimane o nivo 3 mg/kg ogni 2 settimane più ipilimumab (ipi) a 1 g/kg ogni 6 settimane, e trattati fino alla progressione o a una tossicità inaccettabile per un periodo massimo di 2 anni. E' stata usata una fase II non comparativa a fase unica con disegno di Fleming, che analizzava i due bracci indipendentemente con DCR a 12 mesi come obiettivo primario. Assumendo come obiettivo una $DCR \geq 40\%$ con un errore α ad una coda di 0,05 si otteneva una numerosità di 54 pazienti eleggibili da reclutare in ciascun braccio, portata a 57 con l'assunzione di un tasso di ineleggibilità del 5%. I pazienti sono stati stratificati per istologia (epitelioide vs non-epitelioide), linea di trattamento (seconda vs terza linea) e risultati della precedente linea di trattamento (progressione dopo un periodo di tempo \geq di 3 mesi o $<$ di 3 mesi). I risultati di questo trial sono stati presentati all'ASCO e all'ESMO 2017. Il reclutamento, supportato dall'entusiasmo degli investigatori per l'immunoterapia e dai precedenti risultati, è avvenuto ad una velocità impressionante, con 125 pazienti reclutati in meno di 5 mesi in 25 centri francesi, 11 dei quali registrati l'ultimo giorno! Sessantatre pazienti sono stati allocati al braccio del nivo, 62 alla combinazione. Rispettivamente 63 e 61 pazienti hanno effettivamente ricevuto il trattamento e sono state eseguite analisi intent-to-treat (ITT). L'età mediana (72,3 e 71,7 anni) era leggermente più alta rispetto agli studi precedenti, riflettendo probabilmente la minor selezione effettuata dei pazienti rispetto ai più piccoli studi precedenti. Complessivamente, l'84% dei pazienti aveva un tumore con un'istologia epitelioide, due terzi avevano un PS=1. Nel braccio di combinazione c'erano un po' più di maschi (rispettivamente l'85% vs il 75%, non significativo) e di pazienti che erano andati in progressione oltre 3 mesi dopo la fine dell'ultima linea di terapie (rispettivamente 66% vs 59%, non significativo). Approssimativamente il 70% erano pazienti di seconda linea, l'86,4% aveva tumori allo stadio III-IV, e le caratteristiche biologiche prognostiche quali leucociti, conta piastrinica e concentrazione di emoglobina (variabili dall'indice prognostico EORTC) erano simili in entrambi i gruppi. La valutazione dell'espressione di PD-L1 nelle cellule tumorali è stata centralizzata ed effettuata utilizzando i saggi 28.8Daki PharmDX™ su 99 campioni e SP-263 Ventana™ su 104 campioni, con un limite per la positività dell'1% come precedentemente descritto dal gruppo di patologi francesi (Mesopath), che hanno rivisto tutte le diagnosi patologiche. Il 41,4% e il 45,2% dei campioni sono stati classificati come positivi, rispettivamente con il saggio 28.8 e SP-263, con un indice di concordanza kappa sorprendentemente basso ($k=0.56$) ottenuto dagli stessi patologi per entrambi i saggi. La somministrazione dei farmaci è andata bene, ma meglio nel ramo con la monoterapia, con il 49,2% e il 38,7% dei pazienti che hanno ricevuto almeno 10 iniezioni, con il 100% del farmaco somministrato durante le infusioni. Ancora una volta il profilo di sicurezza non ha mostrato imprevisti, con una tossicità leggermente maggiore nel braccio della combinazione con un

26,2% AEs di grado 3-4, contro un 12,7% nel braccio con il solo nivo. Sono state osservate tre morti tossiche, comprendenti un'epatite fulminante e un'encefalite, tutte nel braccio di combinazione e tutte osservate entro i primi 5 mesi dello studio, senza ulteriori morti tossiche nell'ultimo periodo, probabilmente perché gli investigatori hanno acquisito maggiori competenze nella diagnosi precoce e nel controllo delle tossicità immuno-mediate in questi pazienti. Nonostante queste tossicità, gli esiti riportati dai pazienti (patients reported outcomes, PROs), utilizzando il questionario LCSS nei due gruppi sperimentali, che non erano diversi alla partenza dello studio, non erano significativamente diversi neppure a 12 settimane. Secondo la valutazione, in cieco di tre radiologi esperti in MPM, lo studio ha raggiunto il suo obiettivo primario in entrambi i bracci, con un 44,4% di DCR nel braccio nivo nei primi 54 pazienti eleggibili, un 39,7% nel gruppo ITT di 63 pazienti, mentre la DCR nel braccio di combinazione era del 50% nei primi 54 pazienti eleggibili, e 51,6% nel gruppo ITT di 62 pazienti. Il tasso di risposte oggettive è stato del 18,5% (n=10) nel braccio nivo e del 27,8% (n=15) nel braccio nivo+ipi. L'ORR era significativamente aumentata nel sottogruppo pazienti positivi per l'espressione di PD-L1, con entrambi i saggi utilizzati, nonostante la bassa correlazione (p=0,003 per il saggio 28.8), mentre sia l'ORR che la DCR erano aumentati significativamente in pazienti con elevata espressione istologica di PD-L1 (con un limite $\geq 25\%$ delle membrane delle cellule tumorali marcate). Questo limite ha permesso di identificare 7 campioni positivi con il saggio 28.8 e 16 con il saggio SP 263, che quindi si è dimostrato più sensibile. Sorprendentemente, il grafico a cascata della percentuale dei cambiamenti delle misure tumorali tra l'inizio dello studio e la dodicesima settimana, conferma chiaramente una maggior attività nel gruppo della combinazione con 10 tumori che hanno mostrato una riduzione dimensionale di oltre il 60% contro i 3 del gruppo con il solo nivo, indipendentemente dal sottogruppo istologico (25). Per contro 12 e 5 pazienti hanno mostrato un aumento delle dimensioni del tumore di oltre il 60%, con una grande e rapida progressione del carico tumorale di oltre l'80% in pochi pazienti (rispettivamente 6 e 2), suggerendo iper-progressioni in una malattia abbastanza indolente come il MPM, senza ovvie correlazioni con il sottogruppo istologico. I pazienti sono stati seguiti per un tempo mediano di 20 mesi e la durata mediana delle risposte è stata di 7,4 mesi nel gruppo del solo nivo e di 8,3 mesi nella combinazione. La PFS mediana era di 4,0 mesi e 5,6 mesi, con 90 e 85 eventi, rispettivamente nel gruppo nivo e nivo+ipi. Ancora più sorprendentemente, la PFS a 1 anno è stata del 15,9% e del 22,6% e la mOS di 11,9 e 15,9 mesi, rispettivamente nei gruppi nivo e nivo+ipi, con il 65 e il 50% degli eventi osservati, supportando la maturità dello studio. La sopravvivenza a un anno è stata del 49,2 e del 58,1% rispettivamente nel gruppo nivo e nivo+ipi, senza sbilanciamento nei trattamenti ricevuti dai pazienti dopo l'interruzione degli anticorpi in studio in entrambi i bracci. Questi risultati supportano chiaramente un'attività di nivo e nivo+ipi in pazienti con MPM recidivante con buone condizioni generali, al costo di una maggior tossicità nel gruppo di combinazione, ma con una OS confrontabile con quella ottenuta nello storico studio registrativo di fase III con pemetrexed in prima linea, condotto 15 anni fa. I pazienti di questo studio erano chiaramente selezionati in forma, anche se il disegno randomizzato limitava questo classico bias degli studi di fase II. E' interessante notare che un'analisi esplorativa ha fornito alcune ipotesi, per scegliere tra la monoterapia o la combinazione, mostrando per esempio che, in seguito al trattamento con nivolumab, pazienti con tumori PD-L1 positivi sopravvivono più a lungo dei pazienti con tumori PD-L1 negativi (HR aggiustato=0,53), mentre la terapia di combinazione è egualmente attiva nei pazienti con tumori PD-L1 positivi o negativi. Allo stesso modo, i pazienti con tumori non epitelioidi beneficiano maggiormente della

combinazione rispetto ai pazienti con il sottotipo di mesotelioma epitelioide (HR aggiustato=0,46), mentre i pazienti con tumori contenenti un contingente di cellule sarcomatoidi hanno una prognosi più infausta con la monoterapia a base di nivolumab rispetto ai pazienti con tumore esclusivamente epitelioide (HR aggiustato=1,48).

Infine, i pazienti con tumore sensibile alla chemioterapia (ossia che hanno avuto una progressione dopo oltre 3 mesi dal completamento dell'ultima dose di farmaco) rispondono significativamente meglio al trattamento con nivolumab rispetto ai pazienti con tumori resistenti (HR aggiustato=0,35, $p=0,002$), mentre la combinazione si comporta allo stesso modo nei pazienti con tumori sensibili o resistenti alla chemioterapia (HR aggiustato=0,76).

Un altro piccolo studio non randomizzato ("INITIATE", NCT03048474) condotto da Baa et al., con lo stesso disegno dello studio NIVOMES, è stato recentemente presentato ai congressi 2017 WCLC e 2018 International Mesothelioma Interest Group (IMIG). Lo studio ha valutato l'efficacia di nivo (1 mg/kg ogni 3 settimane contro la stessa dose ogni due settimane) in combinazione con ipi (1 mg/kg ogni 6 settimane) come seconda/terza linea nel mesotelioma (85% dei pazienti) (26). Sono stati osservati andamenti simili dei benefici derivanti dal trattamento alla dodicesima settimana, con ORR e DCR rispettivamente del 30% e del 75 %, con 4,8 mesi di PFS. I dati di OS non sono ancora maturi.

Tutti questi dati hanno condotto allo studio accademico britannico di fase III, "CONFIRM" (Cancer Research UK trial number CRUK/16/022) che ha confrontato nivolumab versus placebo in seconda/terza linea, sollevando discussioni e questioni etiche per l'utilizzo di un braccio placebo dopo i risultati dello studio francese.

I risultati dello studio MAPS2 hanno mostrato che gli studi di combinazione degli ICI, rappresentano un'altra area di grande interesse. Infatti, lo studio di fase II a braccio singolo "NIBIT-MESO-1" (NCT02588131) ha valutato l'efficacia della combinazione di 1 mg/kg di tremelimumab con 20 mg/kg di durvalumab dati per 4 dosi e.v. ogni 4 settimane, seguita da una terapia di mantenimento con il solo durvalumab alla stessa dose e schema di somministrazione per nove settimane, in prima o seconda linea di trattamento in pazienti con mesotelioma maligno non resecabile (27). Questo studio ha raggiunto il suo obiettivo primario con 11/40 pazienti (27,5%) che hanno ottenuto risposte parziali immuno-relate (DOS mediana: 16,1 mesi) e 25/40 pazienti (65%) che hanno ottenuto un controllo della malattia immuno-relato, portando ad una sopravvivenza libera da progressione immuno-relata mediana (PFS) di 8 mesi (mPFS =5,7 mesi) e ad una mOS di 16,6 mesi (95%CI, 13,1-20,2). In questo studio specifico, l'espressione basale di PD-L1 nel tumore non ha avuto alcun valore predittivo o prognostico.

Uno studio di fase Ib pubblicato nel 2015, senza nessun altro risultato di alcuna fase II disponibile, ha riportato per la prima volta, in 15 pazienti con MPM non resecabile e PS=0-1, i risultati sulla sicurezza dell'associazione di pemetrexed e cisplatino con CP-870,893, l'anticorpo completamente umanizzato agonista di CD40L, somministrato al giorno 8 di un ciclo di 21 giorni, per un massimo di 6 cicli (28). L'anticorpo monoclonale agonista di CD40 CP-870,893, lega CD40 su diversi tipi di cellule immunitarie, innescando la proliferazione cellulare e l'attivazione delle cellule che presentano l'antigene (antigen presenting cells, APCs), attivando le cellule B e T, e aumentando la risposta immunitaria. In effetti, la MTD è stata rapidamente raggiunta con una sindrome da rilascio di citochine come principale evento avverso. Come miglior risposta, sono state osservate 6 risposte oggettive (40%) e 9 stabilizzazioni di malattia (53%), con 6,3 mesi di PFS, in linea con quanto normalmente osservato con la prima linea a base di cisplatino e pemetrexed. Tre pazienti sono sopravvissuti oltre 30 mesi, che

non è inusuale con alcuni MPM indolenti, con una OS mediana di 16,5 mesi come osservato nel braccio controllo dello studio MAPS con pemetrexed e cisplatino. Sono stati riportati marcatori biologici di un'effettiva stimolazione della via di segnalazione di CD40, quali un aumento delle cellule B della memoria attivate rispetto al basale. In ogni caso non hanno potuto essere accertati segnali di un'attività particolarmente elevata, mentre la tossicità è risultata aumentata, pur rimanendo controllabile. Nessun ulteriore sviluppo di combinazioni è attualmente in corso, con questo agonista di CD40, in pazienti con MPM.

Le combinazioni a base di immunoterapie sono attualmente in corso di valutazione in studi di prima linea.

Tabella 3: Elenco degli studi clinici valutanti l'attività della combinazione di anticorpi anti-PD1 con anticorpi anti-CTLA-4 o chemioterapia in pazienti affetti da mesotelioma.

Studio	Linea di terapia	Farmaco	Localizzazione	Fase	N° di pazienti	DCR (mRECIST)	PFS	OS	ref
INITIATE (NCT03048474)	2 ^a	Anti-PD-1 Nivolumab+ Anti-CTLA-4 Ipilimumab	Pleurico +peritoneale	2	33	75%	4.8 mesi	ND	(26)
IFCT 1501 MAPS2 (NCT 02716272)	2 ^a	Anti-PD-1 Nivolumab+ Anti-CTLA-4 Ipilimumab or Anti-PD-1 Nivolumab	Pleurico	2R Non comparative		51.6% 39.7%	5.6 mesi 4.0 mesi	15.9 mesi 11.9 mesi	(25)
NIBIT-meso-1 (NCT022588131)	2 ^a	Anti-PD-L1 Durvalumab + anti-CTLA-4 Tremelimumab	Pleurico +peritoneale	2	40	63%	5.7 mesi	16.6 mesi	(27)
DREAM (ALTG15003) (NCT03075527)	1 ^a	Anti-PD-L1 Durvalumab+ pemetrexed e platino		2	31*	84%	7.3 mesi	ND	(29)
CheckMate-743 (NCT02899299)	1 ^a	Anti-PD-1 Nivolumab+ Anti-CTLA-4 Ipilimumab vs. pemetrexed e- platino		3	600	ND	ND	ND	https://clinicaltrials.gov/
CANADIAN CANCER TRIALS GROUP (CCTG 1227) (NCT02784171)	1 ^a	Pembrolizumab vs. Nivolumab+ pemetrexed- cisplatino		2/3	390	ND	ND	ND	https://www.ctg.queensu.ca/

*risultati riportati sui primi 31 pazienti dei 54 arruolati.

ND: Non disponibile; DCR= Tasso di controllo della malattia (Disease Control Rate), PFS= sopravvivenza libera da progressione (Progression-Free Survival); OS= Sopravvivenza globale.

Un grande studio randomizzato di fase III sponsorizzato dalla BMS (“CheckMate CA209-743”; NCT02899299; n=600) sta valutato i benefici di nivo+ipi versus la chemioterapia standard di prima linea (platino+pemetrexed x 6 cicli al massimo) con l’OS come obiettivo primario. Lo studio ha completato il reclutamento e i risultati sono attesi per il congresso ASCO 2019.

Una fase II-III controllata con un farmaco attivo (NCT02784171) è stata iniziata dal Canadian Cancer Trial Group, e sta attualmente esplorando l’efficacia di una prima linea di terapia con pembrolizumab contro cisplatino e pemetrexed o la combinazione pembrolizumab, cisplatino e pemetrexed, con l’inizio della fase 3 dello studio previsto per l’autunno 2018, con il braccio della tripletta confrontato con il braccio della chemioterapia standard.

Infine, due fasi II a braccio singolo stanno valutando l’anticorpo monoclonale anti-PD-L1 durvalumab, di AstraZeneca, combinato con cisplatino e pemetrexed, una negli Stati Uniti (NCT02899195; n=55, risultati non ancora disponibili) e la seconda in Australia (studio “DREAM”; n=54). I risultati finali dei 54 pazienti di quest’ultimo studio sono stati appena presentati al congresso WCLC del 2018 dalla dott.ssa Anna Nowak. Pazienti affetti da MPM con un PS=0-1 hanno ricevuto in prima linea cisplatino e pemetrexed alle dosi standard, con l’aggiunta di 1.125 mg di durvalumab ogni 3 settimane, per sei cicli, come terapia di induzione e in caso di controllo della malattia fino a 17 cicli di mantenimento, progressione o tossicità (29). L’obiettivo primario era la PFS a 6 mesi, usando i criteri mRECIST e un disegno di Simon a 2 stadi. L’arruolamento è stato molto veloce, con 54 pazienti reclutati in 10 centri in 10 mesi, mostrando un bisogno ancora insoddisfatto di un trattamento sistemico efficace per i pazienti affetti da MPM. L’età mediana era di 68 anni, il 68% dei pazienti aveva un PS=0 e l’83% aveva un istotipo epitelioide. Sia il dosaggio della chemioterapia che del durvalumab è stato eccellente, con il 97% dei pazienti che hanno ricevuto 6 dosi di platino e solo 13 pazienti (24%) per i quali il cisplatino è stato convertito in carboplatino e con un numero mediano di 11,5 dosi di durvalumab (94% del dosaggio). La ORR confermata è stata del 48%, con il 37% di stabilizzazioni di malattia valutate secondo i criteri mRECIST. Due pazienti hanno manifestato una pseudo-progressione (portando ad un 58% di ORR secondo i criteri iRECIST). Complessivamente, è stato ottenuto un tasso di controllo della malattia notevole dell’85%, con sei pazienti che hanno mostrato un’importante riduzione della massa tumorale dell’80%. La PFS mediana è stata di 6,2 mesi con e la PFS a 6 mesi del 57%. La mOS mediana non era ancora stata raggiunta dopo una mediana 14,4 mesi di monitoraggio dei pazienti. La OS stimata a un anno è del 64,5%. Il 10 % dei pazienti ha manifestato eventi avversi immuno-mediati, mentre il 66% dei pazienti ha manifestato tossicità di grado 3-5, comprese 5 morti tossiche durante i trattamenti in studio (con una progressione tumorale), senza morti attribuibili a durvalumab. Se confermati questi risultati preliminari potranno giustificare uno studio di fase III randomizzato usando il miglior braccio di controllo disponibile che dovrebbe essere la tripletta pemetrexed-cisplatino-bevacizumab, in accordo coi i risultati dello studio di fase III MAPS.

20.4 Conclusioni

Nonostante il MPM sia un tumore a basso carico mutazionale, e i suoi livelli di espressione di PD-L1 siano moderati nei campioni di tessuto tumorale, si stanno accumulando dati a sostegno dell’uso della moderna immunoterapia a base di anticorpi anti-PD1 o anti-PD-L1 con o senza l’aggiunta di un anticorpo anti-CTLA4 (ma non del solo anticorpo anti-CTLA4) in pazienti affetti da MPM. I dati attualmente disponibili supportano l’effetto prognostico avverso dell’espressione di PD-L1 nel MPM,

mentre una crescente mole di dati si sta accumulando che suggerisce un effetto predittivo favorevole di tale espressione nel tumore di pazienti con MPM trattati con anti-PD1 o anti PD-L1.

Risultati degli studi di fase II sembrano concordanti con la terapia a base di pembrolizumab o nivolumab in pazienti con MPM in buono stato di forma, considerando che, ad oggi, sono stati trattati oltre 300 pazienti in questi studi, con risultati notevoli in termini di sopravvivenza libera da progressione e sopravvivenza a lungo termine, mai osservati prima in letteratura con i farmaci precedentemente disponibili, che raramente danno un ORR superiore al 25% e una PFS significativa oltre i 3 mesi. Sapendo che non è attualmente disponibile una seconda linea di trattamento per questi pazienti, rimane discutibile da un punto di vista etico, aspettare un eventuale studio randomizzato di fase III con un braccio placebo o anche con un trattamento non raccomandato a minor efficacia quale la monoterapia con vinorelbina.

In particolare, lo studio non randomizzato di fase II, MAPS2, sebbene non comparativo, potrebbe avere fornito dati sufficienti su tollerabilità ed efficacia per giustificare l'uso di nivolumab in monoterapia o in combinazione con ipilimumab, in seconda o terza linea di trattamento, in pazienti affetti da MPM e con PS=0-1. In base a questo ragionamento, particolarmente valido in una malattia orfana quale il MPM, l'ultima versione delle linee guida NCCN ha integrato questa possibile opzione terapeutica di seconda linea, senza aspettare i risultati di un putativo studio di fase III.

Al contrario, sono attesi i risultati della combinazione degli anticorpi anti-PD-1 e anti-CTLA4 in prima linea. I primi risultati dello studio di fase III sponsorizzato dall'industria farmaceutica che sta valutando la combinazione in confronto con la doppietta standard a base di pemetrexed e platino, sono previsti entro i prossimi 12 mesi. I risultati preliminari di uno studio di fase II che sta valutando la combinazione dell'anticorpo anti-PD-L1 con la chemioterapia standard, supportano un profilo di sicurezza controllabile, con risultati di efficacia molto incoraggianti, chiaramente meritevoli di uno studio di prima linea con queste combinazioni. Il disegno di questi studi dovrebbe essere lo stesso dello studio recentemente presentato in pazienti con NSCLC in stadio avanzato, che ha portato ad una rapida registrazione grazie al drammatico aumento della sopravvivenza, qualunque sia il livello di espressione di PD-L1. Comunque il braccio controllo di questi studi è ancora una volta discutibile e dovrebbe probabilmente consistere nella tripletta bevacizumab-pemetrexed-cisplatino, in pazienti eleggibili per bevacizumab, sapendo che il passo successivo potrebbe essere la valutazione di una combinazione di 4 farmaci con bevacizumab, anti-PD1/anti-PD-L1, pemetrexed e platino, essendo questa combinazione recentemente risultata efficace in pazienti affetti da NSCL e con un razionale biologico che supporta la sinergia tra la terapia anti-VEGF e l'immunoterapia. Ulteriori studi clinici sono quindi necessari, ma i prossimi anni vedranno chiaramente grandi miglioramenti nella cura dei pazienti affetti da MPM dopo anni di stagnazione e di fallimenti terapeutici.

Referenze

1. Thapa B, Salcedo A, Lin X, Walkiewicz M, Murone C, Ameratunga M, et al. The immune microenvironment, genome-wide copy number aberrations, and survival in mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2017;12(5):850–9.
2. Yamada N, Oizumi S, Kikuchi E, Shinagawa N, Konishi-Sakakibara J, Ishimine A, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes predict favorable prognosis in malignant pleural mesothelioma after resection. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(10):1543–9.
3. Sharpe A, Pauken K. The diverse functions of the PD1inhibitory pathway. *Nat Rev Immunol.* 2018;18:153–67.

4. Bueno R, Stawiski E, Goldstein L, Durinck S, De Rienzo A, Modrusan Z, et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet.* 2016;48(4):407–16.
5. Hellmann MD, Callahan MK, Awad MM, Calvo E, Ascierto PA, Atmaca A, et al. Tumor mutational burden and efficacy of Nivolumab Monotherapy and in combination with Ipilimumab in small-cell lung cancer. *Cancer Cell.* 2018;33(5):853–61 e4.
6. Wang G, Lu X, Dey P, Deng P, Wu CC, Jiang S, et al. Targeting YAP-dependent MDSC infiltration impairs tumor progression. *Cancer Discov.* 2016;6(1):80–95.
7. Rehrauer H, Wu L, Blum W, Pecze L, Henzi T, Serre-Beinier V, et al. How asbestos drives the tissue towards tumors: YAP activation, macrophage and mesothelial precursor recruitment, RNA editing, and somatic mutations. *Oncogene.* 2018;37(20):2645–59.
8. Cedres S, Ponce-Aix S, Zugazagoitia J, Sansano I, Enguita A, Navarro-Mendivil A, et al. Analysis of expression of programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM). *PLoS One.* 2015;10(3):e0121071.
9. Mansfield AS, Roden AC, Peikert T, Sheinin YM, Harrington SM, Krco CJ, et al. B7-H1 expression in malignant pleural mesothelioma is associated with sarcomatoid histology and poor prognosis. *J Thorac Oncol.* 2014;9(7):1036–40.
10. Inaguma S, Lasota J, Wang Z, Czapiewski P, Langfort R, Janusz Rys J, et al. Expression of ALCAM (CD166) and PD-L1 (CD274) independently predicts shorter survival in malignant pleural mesothelioma. *Hum Pathol.* 2018;71:1–7.
11. Rivalland G, Kao S, Pavlakis N, Gordon B, Hughes M, Thapa B, et al. Outcomes of anti-PD-1 therapy in mesothelioma and correlation with PD-L1 expression. *J Clin Oncol.* 2017;35(15_suppl):8514.
12. Zalcman G, Mazieres J, Margery J, Greillier L, Audigier- Valette C, Moro-Sibilot D, et al. Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet.* 2016;387(10026):1405–14.
13. Khanna S, Thomas A, Abate-Daga D, Zhang J, Morrow B, Steinberg S, et al. Malignant mesothelioma effusions are infiltrated by CD3 β T cells highly expressing PD-L1 and the PD-L1 β tumor cells within these effusions are susceptible to ADCC by the anti-PD-L1 antibody Avelumab. *J Thorac Oncol.* 2016;11(11):1993–2005.
14. Calabro L, Morra A, Fonsatti E, Cutaia O, Amato G, Giannarelli D, et al. Tremelimumab for patients with chemotherapy-resistant advanced malignant mesothelioma: an open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2013;14(11):1104–11.
15. Ceresoli GL, Zucali PA, De Vincenzo F, Gianoncelli L, Simonelli M, Lorenzi E, et al. Retreatment with pemetrexed-based chemotherapy in patients with malignant pleural mesothelioma. *Lung Cancer.* 2011;72(1):73–7.
16. Calabro L, Morra A, Fonsatti E, Cutaia O, Fazio C, Annesi D, et al. Efficacy and safety of an intensified schedule of tremelimumab for chemotherapy-resistant malignant mesothelioma: an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Respir Med.* 2015;3(4):301–9.
17. Maio M, Scherpereel A, Calabro L, Aerts J, Perez SC, Bearz A, et al. Tremelimumab as second-line or third-line treatment in relapsed malignant mesothelioma (DETERMINE): a multicentre, international, randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(9):1261–73.
18. Alley EW, Lopez J, Santoro A, Morosky A, Saraf S, Piperdi B, et al. Clinical safety and activity of pembrolizumab in patients with malignant pleural mesothelioma (KEYNOTE-028): preliminary results from a non-randomised, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* 2017;18(5):623–30.
19. Desai A, Karrison T, Rose B, Pemberton E, Hill B, Mendoza A, et al. Phase II trial of Pembrolizumab (NCT02399371) in previously treated malignant mesothelioma: final analysis. *J Thorac Oncol.* 2018;13(10):S339. IASLC 19th World Conference on Lung Cancer; OA 08-03.
20. Mauti L, Klingbiel D, Schmid S, Bouchaab H, Bartnick T, Gautschi O, Rothschild S, et al. Pembrolizumab as second or further line treatment in relapsed malignant pleural mesothelioma: a Swiss registry study. *Ann Oncol.* 2017;28(suppl_5):v568–72. abstr. 1615O.
21. Quispel-Janssen J, Zago G, Schouten R, et al. A phase II study of nivolumab in malignant pleural mesothelioma (NivoMes): with translational research (TR) biopsies. *J Thorac Oncol.* 2017;12(1):S292–S93. abstr. OA 13.01.
22. Nakano T, Okada M, Kijima T, Aoe K, Kato T, Fujimoto N, et al. Long-term efficacy and safety of nivolumab in second- or third-line Japanese malignant pleural mesothelioma patients (phase II: MERIT study). *J Thorac Oncol.* 2018;13(10):S338. IASLC 19th World Conference on Lung Cancer; OA 08-01.
23. Hassan R, Thomas A, Nemunaitis J, Patel M, Bennouna J, Chen F, et al. Phase 1b study of avelumab in advanced previously treated mesothelioma: long-term follow-up from JAVELIN solid tumor. *J Clin Oncol.* 2018;36(15_suppl):abstr 8563.

24. Scherpereel A, Mazieres J, Greillier L, Dô P, Bylicki O, Monnet I, et al. Second- or third-line nivolumab (Nivo) versus nivo plus ipilimumab (Ipi) in malignant pleural mesothelioma (MPM) patients: results of the IFCT-1501 MAPS2 randomized phase II trial. *J Clin Oncol.* 2017;35(suppl):abstr LBA8507.
25. Zalcman G, Mazieres J, Greillier L, Do P, Bylicki O, Monnet O, et al. Second or 3rd line Nivolumab (Nivo) versus Nivo plus Ipilimumab (Ipi) in Malignant Pleural Mesothelioma (MPM) patients: up-dated results of the IFCT-1501 MAPS2 randomized phase 2 trial. *Ann Oncol.* 2017;28(suppl):Abstract LBA58_PR.
26. Baas P, Disselhorst M, Harms E, Quispel J, K M, Burgers S. Phase II trial of Nivolumab and Ipilimumab in patients with malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2017;12(11, suppl.2):S292–S93. OA 9389.
27. Calabro L, Morra A, Giannarelli D, Amato G, D’Incecco A, Covre A, et al. Tremelimumab combined with durvalumab in patients with mesothelioma (NIBIT-MESO-1): an open-label, non-randomised, phase 2 study. *Lancet Respir Med.* 2018;6(6):451–60.
28. Nowak A, Cook A, McDonnell A, Millward M, Creaney J, Francis R, et al. A phase 1b clinical trial of the CD40-activating antibody CP-870,893 in combination with cisplatin and pemetrexed in malignant pleural mesothelioma. *Ann Oncol.* 2015;12:2483–90.
29. Nowak AK, Kok PS, Lesterhuis WJ, Hughes BGM, Brown C, Chuan-Hao Kao S, et al. DREAM: final results of a phase 2 trial of Durvalumab with first line chemotherapy in mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2018;13(10):S338–9. IASLC 19th World Conference on Lung Cancer; OA 08-02.

Capitolo 23

NECESSITA' E PROSPETTIVE FUTURE NELLA GESTIONE DEL MESOTELIOMA

Dean A. Fennell

23.1 Superare il plateau terapeutico nel mesotelioma

Nonostante tutti gli sforzi compiuti dalla ricerca negli ultimi 15 anni, il mesotelioma rimane un tumore per il quale, dopo la prima linea di trattamento, mancano terapie efficaci e questa è chiaramente un'esigenza non ancora soddisfatta. Questo capitolo discuterà come questo problema è attualmente affrontato e alcune delle principali linee di ricerca clinica intraprese per far fronte a questa sfida.

Ci sono stati audaci tentativi di sviluppare trattamenti in pazienti recidivati in grandi e ben disegnati studi clinici randomizzati, ma ad oggi, nessuno di questi ha dato risultati positivi. Un ostacolo importante allo sviluppo di nuove terapie efficaci è *la diversità fenotipica*. Il mesotelioma è un mosaico che comprende diversi sottotipi genomici. Attualmente, la stratificazione molecolare dei trattamenti per il mesotelioma è ancora agli inizi. Tuttavia, stanno emergendo gli approcci mirati a specifici bersagli molecolari che potrebbero fornire un'importante opportunità per trattare i pazienti in maniera selettiva ed efficace in base ai risultati di analisi specifiche su proteine, DNA o metilazioni. Verranno di seguito discussi alcuni dei progressi più significativi.

In aggiunta, la nostra conoscenza del mesotelioma e della sua biologia sta cambiando rapidamente in seguito alla rivoluzione informatica e a sforzi collaborativi internazionali quali l'atlante genetico dei tumori (tumour genome atlas, TCGA) e ad altri sforzi di profilazione genomica su larga scala. Grazie alle piattaforme in grado di selezionare le interazioni farmaco-gene, esistono oggi opportunità stimolanti non solo per mettere a nudo i più promettenti bersagli molecolari, ma anche per generare ipotesi di interazione farmaco-gene che possono essere studiate in laboratorio al fine di trasferirle alla clinica.

Infine, la rivoluzione dell'immunoterapia ha trasformato il trattamento di un altro tumore toracico (il tumore polmonare non a piccole cellule). Può accadere anche per il mesotelioma? Credo che questa risposta sia "quasi certamente" e per il consenso internazionale è "sì". Questo è evidente dai dati emersi dalle prime fasi di studio con l'immunoterapia. Tuttavia, per approvare il trattamento, saranno necessari grandi studi randomizzati di fase III, insieme allo sviluppo di biomarcatori in grado di consentire la selezione dei pazienti con maggiori probabilità di beneficiare del trattamento.

23.2 Eterogeneità genomica tra paziente: una barriera ad un approccio unico per tutti

L'identificazione di una terapia efficace, approvata per i pazienti recidivanti si è dimostrata ad oggi una sfida insormontabile. Tre sono le ragioni principali alla base di questo fallimento.

Forse il fattore più importante è stata l'insufficiente efficacia dei nuovi farmaci all'interno di una popolazione non selezionata. Per affrontare questo problema sono necessari investimenti nella ricerca, per identificare caratteristiche biologiche specifiche del mesotelioma e strategie ottimali per colpirle. Ad oggi gli investimenti per lo sviluppo di farmaci per il mesotelioma sono limitati, aumentando le difficoltà per i ricercatori sia in campo clinico che preclinico.

Seconda ragione è l'eterogeneità tra pazienti. Il mesotelioma presenta tre diversi sottogruppi morfologici con uno spettro di aggressività che aumenta dall'epitelioide, al bifasico, al sarcomatoide. Amalgamando questi sottotipi in un unico gruppo, come accaduto storicamente nella maggior parte

degli studi, i tentativi di scoprire segnali di efficacia possono essere stati ostacolati da una diluizione dell'effetto dovuto all'eterogeneità inter-paziente. Ad esempio, nel contesto di uno studio clinico ben disegnato, randomizzato e controllato con placebo, i pazienti con mesotelioma indolente o a crescita lenta possono andar bene in un'analisi del tempo all'evento. In modo simile, l'assenza di un braccio di controllo efficace, la scarsità di studi in doppio cieco o di randomizzazioni controllate possono avere contribuito al fallimento nell'identificazione di trattamenti potenzialmente attivi. Ad esempio, guardando indietro all'evoluzione delle terapie per il carcinoma polmonare, i primi miglioramenti nel trattamento dei pazienti in recidiva dipendono da studi attuati con una metodologia adeguata (1,2).

I recenti studi genomici hanno molto migliorato la nostra comprensione di come il panorama delle alterazioni somatiche sia diverso tra individui, dell'impatto di questi cambiamenti genetici sul comportamento del tumore (3), e delle implicazioni per gli interventi farmacologici. Bueno et al. hanno condotto il più grande studio genomico ad oggi, su 216 pazienti di mesotelioma, analizzando 99 esomi completi e 103 targeted exome (4). Come in altri studi precedenti, più piccoli ma comunque fondamentali per la valutazione dell'eterogeneità inter-paziente, sono state osservate mutazioni in geni quali BAP1, NF2, e alterazioni del numero di copie geniche come la delezione molto frequente di CDKN2. In base al catalogo delle mutazioni somatiche nel cancro (catalogue of somatic mutations in cancer, COSMIC), agli studi di trasformazione neoplastica (7,8) e ai dati nei topi transgenici (9), queste alterazioni genomiche sono tra le più comuni aberrazioni nel mesotelioma che possono probabilmente avere un ruolo chiave nello sviluppo di questa neoplasia e per le quali potrebbe essere applicata una terapia a bersaglio molecolare. È evidente un effetto cumulativo dei difetti genomici, con un fenotipo più aggressivo quando si ha il coinvolgimento di più geni "driver" (9).

In generale, gli studi rivelano un'architettura genomica complessa del mesotelioma, con alterazioni diverse quali fusioni, mutazioni a singolo nucleotide, fusioni e alterazioni del numero di copie geniche (incluse le microdelezioni), ospitate sullo stesso gene, come nel caso dell'inattivazione di BAP1. In questo esempio l'inattivazione correla con una perdita dell'espressione nucleare della proteina (o nel caso di delezione, di perdita dell'espressione). Conseguentemente, la valutazione dell'espressione della proteina tramite immunoistochimica può essere il test più pratico per valutarne la funzionalità, in modo da poter essere utilizzata come biomarcatore predittivo (10-12) in studi clinici stratificati. Nel caso di NF2 l'inattivazione può avvenire attraverso doppio meccanismo che coinvolgono sia una perdita allelica che una mutazione (13); inoltre, l'inattivazione di NF2 può essere fenocopiata da mutazioni nello stesso pathway, che coinvolgono LATS2, RASSF1 e SAV1 (14), complicando ancora una volta la scelta di un possibile biomarcatore per la stratificazione delle terapie.

La disponibilità di dati di sequenziamento dell'intero genoma ha consentito l'esplorazione di sottogruppi terapeuticamente trattabili. Ad esempio, come stimato dalla banca dati genomica MANTIS, l'instabilità di microsatellite (microsatellite instability, MSI) che comporta ipermutazioni causate da difetti del sistema di riparo del mismatch (mismatch repair, MMR), nel mesotelioma occorre con una bassa frequenza (<3%) (15). L'MSI è associata ad un alto carico antigenico, a infiammazione tumorale e ad una maggior sensibilità all'immunoterapia con anti-PD1. L'inibitore di PD1 pembrolizumab, ha recentemente ottenuto da parte della Federal Drug Administration la prima approvazione "agnostica", in tumori con elevata MSI, della quale potrebbe beneficiare anche una piccola percentuale di pazienti con mesotelioma. Un recente studio volto a esplorare la deficienza del sistema dell'MMR nel mesotelioma, in una coorte di 329 pazienti, non è riuscito a identificare MSI attraverso un approccio

combinato di immunoistochimica e analisi multiplex di marcatori di microsatellite (16). Complessivamente la MSI sembra essere un evento raro, ed è improbabile che spieghi la risposta all'immunoterapia riportata nel mesotelioma e discussa più dettagliatamente in seguito.

La deficienza della ricombinazione omologa del DNA (Homologous DNA repair deficiency, HRD) con l'inattivazione del gene oncosoppressore BRCA1 conferisce letalità sintetica agli inibitori di PARP (17-18). Sebbene BRCA1 non sia mutata nel mesotelioma, la sua espressione risulta variabile con perdita della proteina nel 38% dei pazienti (19).

Nel caso del mesotelioma, la presenza di HRD correla con una prognosi peggiore. In uno studio clinico, su 82 pazienti 10 presentavano almeno un'alterazione genica nel pathway della ricombinazione omologa, ma non è noto se questi pazienti potessero essere sensibili al trattamento con gli inibitori di PARP (20). BAP1 è implicato nella regolazione di BRCA1 con mutazioni che provocano una minore espressione di BRCA1, proteina coinvolta nella ricombinazione omologa (21). Questa osservazione insieme alla dimostrazione che BAP1 è coinvolta direttamente nel meccanismo di ricombinazione omologa (21), sostiene la possibilità che alterazioni di questo gene possano conferire un fenotipo HRD al mesotelioma. Studi preclinici, su linee cellulari, hanno recentemente mostrato che gli inibitori di PARP hanno un'attività significativa in monoterapia. Il preciso meccanismo alla base di questo fenotipo e la sua traslabilità alla clinica non sono ancora stati determinati.

Hassan et al. hanno recentemente riportato che il 12% dei pazienti con mesotelioma (29 su 239), hanno difetti patogenetici germinali in geni chiave per i processi di riparazione del DNA (ne sono stati controllati 73). Questi includono *BAP1* (N=17 pazienti), *CHEK2* (N=5 pazienti), *PALB2* (N=2) e *BRCA1*, *MLH1*, *POT1*, *TP53* e *MRE11A* (N=1 paziente ciascuno). In particolare, tutti i pazienti portatori di mutazioni germinali di BAP1 (7%), erano portatori anche di una seconda mutazione che dovrebbe determinarne una completa inattivazione. Su queste basi gli autori hanno iniziato uno studio clinico (NCT03531840) per valutare l'efficacia dell'inibitore di PARP olaparib nel mesotelioma.

23.3 Eventi genomici rari e opportunità terapeutiche

Nel mesotelioma, alterazioni inattivanti insorgono ad una frequenza relativamente alta in un sottogruppo di geni tumorali (*CDKN2A*, *BAP1*, *NF2*). Studi recenti del profilo genomico di questa neoplasia, hanno identificato eventi rari, che possono essere trattati farmacologicamente. L'analisi dei geni che vanno incontro ad una selezione positiva ($dN/dS > 1$) e che sono potenzialmente coinvolti nella trasformazione neoplastica come geni "driver", ha rivelato tre geni tumorali che sono presenti al di sotto del 10%: *SETD2*, *LATS1* e *PTCH1*, di cui quest'ultimo potenzialmente utilizzabile come bersaglio terapeutico (22).

PTCH1 (protein patched homolog 1) è un oncosoppressore. E' un recettore per sonic hedgehog, una molecola di secrezione coinvolta nella tumorigenesi che in seguito al legame con *PTCH1* conduce al rilascio della proteina smoothed (SMO), un recettore associato alle proteine G che stimola la proliferazione cellulare. In condizioni normali *PTCH1* sopprime il rilascio di SMO. Mutazioni patogeniche di *PTCH1* sono state riscontrate frequentemente nel basalioma e possono essere bersagliate farmacologicamente (23,24), ottenendo regressioni significative del tumore. In accordo con questi dati, mesoteliomi con mutazioni di *PTCH1* potrebbero essere suscettibili al trattamento con inibitori specifici. Sono stati recentemente riportati dati preclinici che evidenziano l'attività dell'antagonista di Hedgehog (Hh), vismodegib (25-27) consistenti con altri lavori che riportano un

segnale costitutivo del pathway di Hh nei mesoteliomi. Deve ancora essere esplorata la dipendenza del segnale di Hh dalle mutazioni driver di *PTCH1*. In modelli preclinici, sono state identificate mutazioni di SMO e SUFO coinvolte nella via di segnale di Hh, suggerendo che Hh può esser attivato anche da meccanismi diversi dalla mutazione di *PTCH1* (28).

Le mutazioni del fattore di crescita epidermico (epidermal growth factor receptor, EGFR) sono bersagli molecolari riconosciuti per il trattamento dell'adenocarcinoma polmonare. I primi studi nel mesotelioma con gli inibitori dell'attività tirosino chinasi (Tyrosine kinase inhibitor, TKI) di EGFR non hanno mostrato attività, nonostante l'evidenza di una sovra espressione di EGFR nel 97% dei pazienti. Mutazioni patogeniche di EGFR conferiscono alla cellula tumorale una dipendenza del pathway di EGFR e conseguentemente sensibilità al trattamento con i TKI (29,30). Nel mesotelioma tali mutazioni sono state descritte seppur raramente (31-33). Ad oggi non vi sono tuttavia evidenze che suggeriscono che le mutazioni di EGFR nel mesotelioma conferiscano dipendenza e sensibilità clinica ai TKI.

Come per EGFR, il riarrangiamento del gene ALK (Anaplastic lymphoma kinase), più comunemente EML-ALK è un bersaglio molecolare per la terapia stratificata dell'adenocarcinoma polmonare (34-37). Un'analisi recente condotta in 88 pazienti affetti da mesotelioma peritoneale, ha rivelato una positività per ALK nel 13% dei casi. Un elevato livello di espressione era associato a riarrangiamenti del gene ALK, anche con nuovi partner di fusione quali STRN, TPM1 e ATG16L (38). E' interessante notare che questi mesoteliomi mancano delle più comuni mutazioni driver CDKN2A, BAP1, NF2 o SETD2, suggerendo come queste alterazioni geniche siano mutualmente esclusive. I riarrangiamenti di ALK sono associati con le giovani donne e non con il mesotelioma pleurico. Come per EGFR non sono riportati dati che suggeriscano la capacità di questi nuovi riarrangiamenti di conferire alle cellule tumorali dipendenza dal pathway di ALK sia in laboratorio che in clinica; comunque il potenziale terapeutico degli inibitori di questa chinasi è una possibilità che attende di essere esplorata.

La tempistica evolutiva delle mutazioni rare è uno dei principali fattori che ne determina il potenziale terapeutico. Queste mutazioni possono comparire tardi nella storia naturale dello sviluppo del tumore e apparire come mutazioni subclonali (39) che non sono presenti in tutto il tumore e quindi non rappresentano un buon bersaglio farmacologico come avviene invece nel caso di EGRF e ALK nel tumore del polmone e di *PTCH1* nel basalioma. Capire la tempistica evolutiva di mutazioni potenzialmente trattabili farmacologicamente e la loro eterogeneità spaziale sarà cruciale per definirne la potenzialità di conferire una dipendenza oncogenica. Un simile studio chiamato TraceRx è stato condotto nel tumore del polmone non a piccole cellule e nel tumore del rene (40-43). Nel contesto del mesotelioma pleurico maligno, un'analisi sistematica dell'eterogeneità genomica intratumorale è necessaria per catalogare e segregare le alterazioni clonali e quelle non clonali.

23.4 Nascita della terapia personalizzata per il mesotelioma

Esempi di studi stratificati stanno emergendo nel campo del mesotelioma e cominciano ad entrare nella scena clinica con qualche segnale di efficacia. Gli studi in cui lo sviluppo del farmaco è più avanzato sono quelli nel mesotelioma negativo per l'argininosuccinasi sintetasi I (ASS1). Questo enzima è coinvolto nella sintesi dell'arginina dalla citrullina, il penultimo passaggio del processo di biosintesi dell'arginina. Le cellule normali sintetizzano l'arginina attraverso questa via e pertanto questo aminoacido è classificato come non essenziale. E' stato dimostrato che l'espressione di ASS1 viene

persa in un numero significativo di mesoteliomi (44) che conseguentemente perdono la capacità di generare arginina diventando auxotrofi, ossia l'arginina diventa un amino acido essenziale e si sviluppa una dipendenza metabolica. La sottrazione di arginina causa apoptosi nei mesoteliomi che non esprimono ASS1. I primi studi preclinici hanno evidenziato il potenziale terapeutico della manipolazione farmacologica dei livelli circolanti di arginina (44), che può essere ottenuta attraverso una degradazione catalitica dell'aminoacido utilizzando l'enzima arginina deaminasi in forma pegilata (ADI PEG20). Questo concetto è stato traslato in clinica con lo studio ADAM (45), nel quale i pazienti venivano randomizzati per ricevere ADI PEG20 o un trattamento sintomatico. Lo studio ha raggiunto l'obiettivo primario sulla sopravvivenza libera da progressione, con un hazard ratio di 0,56 ed evidenze di risposta metabolica (46). La perdita di ASS1 è stata correlata con la metilazione del promotore e il livello di silenziamento di ASS1 con l'efficacia. Studi successivi in linee cellulari ovariche hanno rivelato una correlazione tra la perdita di ASS1 e la resistenza al platino (47). La potenziale sinergia con il platino ha condotto ad uno studio di fase I che ha confermato la sicurezza della combinazione di ADI PEG20 con pemetrexed e cisplatino (48). Sulla base di questo studio e dell'osservazione che i mesoteliomi bifasici e sarcomatoidi avevano la più alta incidenza di deficienza di ASS1, è stato avviato lo studio randomizzato ATOMIC, una fase II/III, disegnata per valutare il beneficio dell'aggiunta di ADI PEG20 alla chemioterapia (NCT02709512).

L'utilizzo di ASS1 come bersaglio terapeutico rappresenta uno dei rari esempi di strategia razionale per il trattamento del mesotelioma che, partendo dal bancone del laboratorio, è progredita progressivamente fino ad arrivare al letto del paziente. La perdita di ASS1 avviene a causa di un meccanismo epigenetico e la demetilazione di ASS1 è il meccanismo chiave che spiega la resistenza acquisita, dimostrando la plasticità del bersaglio. Tuttavia, questa resistenza sposta la dipendenza metabolica dall'arginina alla biosintesi di poliammine (49). Un aumento dei metaboliti delle poliammine è stato osservato in pazienti con deficienza di ASS1 che diventano resistenti al trattamento con ADI PEG20 ed esiste una letalità sintetica che coinvolge il metabolismo delle poliammine e la mancanza di ASS1, che potrebbe fornire la base per una nuova strategia terapeutica di questi tumori.

Le mutazioni di BAP1 sono state originariamente descritte in due pubblicazioni fondamentali che hanno identificato eventi inattivanti sia germinali che somatici in questo gene oncosoppressore (5,6). BAP1 coopera con il complesso PRC2 (polycomb repressive complex 2) per modificare l'epigenoma tramite la trimetilazione dell'istone H3 a livello dell'aspartato 23. Il gruppo di Levine ha mostrato che la iper-regolazione di PRC2 mediata da BAP1 richiede l'attività metiltransferasica di EZH2 e conferisce, sia in vitro che in vivo, sensibilità all'inibizione di EZH2 (50). Sulla base di queste osservazioni, uno studio di fase II con l'inibitore di EZH2 tazemetostat (NCT02860286) è stato disegnato in pazienti con mesoteliomi che presentano inattivazione di BAP1 (determinata attraverso analisi di immunohistochimica). Questo studio, riportato all'ASCO 2018, ha raggiunto l'obiettivo primario di 12 settimane di controllo della malattia suggerendo che EZH2 può essere un bersaglio farmacologico con una attività clinica significativa. Questo è il primo studio clinico prospettico stratificato in base ad oncosoppressore comunemente mutato come bersaglio molecolare.

23.5 Sfruttare i dati informatici su larga scala per identificare nuovi approcci terapeutici

Sono in corso sforzi su larga scala per decifrare nuovi geni chiave per la vitalità cellulare e nuove interazioni farmaco-gene che potrebbero servire da ipotesi per futuri studi clinici di proof-of-concept

(51-54). Questi sforzi hanno la potenzialità di identificare nuovi modi per colpire mutazioni comuni presenti nel mesotelioma. Un esempio importante è quello della scoperta della proteina arginina metiltransferasi 5 (PRMT5) un bersaglio molecolare in grado di dare letalità sintetica in tumori con delezione della metiltioadenosina fosforilasi (methylthioadenosine phosphorilase, MTAP) (55-57). Questa alterazione genomica occorre frequentemente nel mesotelioma e in diversi altri tumori ed è associata con una delezione in omozigosi di una regione del braccio corto del cromosoma 9 (9p21.1). Questa delezione oltre a MTAP interessa anche CDKN2A che codifica gli oncosoppressori p16ink4A (inibitore di CDK4/6) e p14ARF (inibitore di MDM2). È stato descritto come una delezione completa di MTAP sia in grado di perturbare i livelli metabolici di metiltioadenosina (MTA) inibendo PRMT5 e aumentando la suscettibilità di PRMT5 all'inibizione esogena. Al contrario di precedenti tentativi, falliti nel tentativo di identificare una strategia basata sulla letalità sintetica utilizzando L-alanosina in mesoteliomi con delezione di MTAP (58-59), un approccio in grado di colpire la relazione di letalità sintetica MTAP-PRMT5, potrebbe essere potenzialmente sfruttato terapeutamente.

La delezione in omozigosi del cromosoma 9p21.2 contenente CDKN2A2, porta alla perdita di espressione di p16ink4a, l'inibitore endogeno delle chinasi ciclina dipendenti (cell division kinase, CDK) 4 e 6 (60). CDK4/6 guidano la transizione del ciclo cellulare attraverso il checkpoint G1/S, inibendo, tramite fosforilazione, la proteina del retinoblastoma (Rb) causando la dissociazione dell'oncosoppressore dal fattore di trascrizione E2F. In aggiunta, la perdita di P16inkA aumenta la fosforilazione mediata da CDK4/6 aumentando ulteriormente la proliferazione e contribuendo alla trasformazione neoplastica. Nel mesotelioma, la delezione di CDK2A è associata ad una prognosi negativa (61-62). Al contrario, uno studio su larga scala condotto su diversi istotipi tumorali, ha mostrato una robusta e forte associazione tra la delezione di CDKN2A e la sensibilità agli inibitori di CDK4/6 (52). Come atteso, questa interazione è bloccata dalle mutazioni di Rb, che nel mesotelioma occorrono con una frequenza molto bassa del 1,22%.

L'utilizzo di linee cellulari farmacogenomicamente caratterizzate è stato recentemente applicato nel contesto del mesotelioma. Il recettore DR5 (recettore di TRAIL) è risultato essere un potenziale bersaglio terapeutico in modelli in vitro, in vivo ed espianti ex vivo di mesotelioma con mutazione di BAP1 (63). Questa osservazione rilancia le potenzialità di anticorpi contro DR5 come possibili terapie in casi selezionati sulla base dell'espressione del recettore.

Utilizzando lo stesso approccio di high throughput screening, anche la sensibilità agli inibitori del recettore per il fattore di crescita dei fibroblasti è aumentata in presenza della mutazione di BAP1 (64). Entrambe queste strategie che sfruttano BAP1 sono trattabili farmacologicamente, aumentando le possibilità di sfruttare BAP1 come biomarcatore predittivo.

Complessivamente, la crescente quantità di dati che legano la presenza di mutazioni somatiche nel mesotelioma con la sensibilità ai farmaci, fornisce la base per spiegare l'aumento del numero di studi clinici prospettici randomizzati e stratificati. Un modello per esplorare ipotesi multiple nel contesto clinico è quello degli studi ombrello (65), esempi dei quali sono attualmente in corso nel carcinoma del polmone non a piccole cellule (66). Ad esempio, la British Lung Foundation ha finanziato lo studio MiST (67) che valuterà nuove terapie per BAP1, BRCA1, p16INK4A e PDL1, allo scopo di acquisire segnali di efficacia preliminari in un contesto prospettico e stratificato in base a caratteristiche molecolari.

23.6 La rivoluzione dell'immunoterapia e il mesotelioma: principali sfide

L'avvento degli inibitori di PD1 e PDL1 ha portato ad un cambiamento nel paradigma di trattamento di molti tumori, compreso il tumore polmonare non a piccole cellule dove, in un tempo record, ci sono state diverse modifiche nello standard di cura (68-74). La disattivazione del checkpoint inibitorio di PD1 nel mesotelioma ha dimostrato un'attività incoraggiante nei pazienti recidivanti. Il primo studio prospettico di attività con anti-PD1 (75) è stato condotto in 25 pazienti con espressione di PDL1 >1% e ha mostrato il 20% di risposte oggettive e il tasso di controllo della malattia è stato del 75%. I pazienti che mostravano una risposta, continuavano fino ad una durata mediana di 12 mesi. In modo simile, l'inibitore di PD1 nivolumab, ha mostrato attività in monoterapia in mesoteliomi non selezionati (76). Trentadue pazienti sono stati arruolati in uno studio di fase II monocentrico, e trattati con nivolumab. Lo studio ha raggiunto l'obiettivo primario, con un tasso di controllo della malattia a 12 settimane del 47%, associato ad un 24% di risposte parziali. È da notare che non si è osservata una correlazione tra l'espressione di PDL1 e l'esito dei pazienti.

Di conseguenza, in nessuno dei due studi (gli unici studi di fase II prospettici fino ad ora pubblicati) c'è un verdetto definitivo sul ruolo di PDL1 come biomarcatore. Studi randomizzati saranno necessari per stabilire rigorosamente l'interazione tra l'espressione di PDL1 e l'efficacia; questo perché, nel mesotelioma, PDL1 è significativamente associato ad una prognosi peggiore (77). Se PDL1 fosse effettivamente positivamente predittivo e negativamente prognostico, questo dovrebbe aumentare le possibilità di rilevare un segnale di efficacia. Lo studio CONFIRM (NCT03063450) è una fase III attualmente in corso che sta valutando il nivolumab rispetto al placebo in pazienti con mesotelioma recidivante (78), insieme allo studio PROMISE (NCT02991582) che confronta pembrolizumab e chemioterapia (gemcitabina o vinorelbina). Questi grandi studi randomizzati forniranno evidenze più robuste sull'efficacia dell'immunoterapia e anche sul valore di PDL1 come biomarcatore.

Studi recenti hanno mostrato interazioni sinergiche tra la terapia con anti-PD1 e differenti trattamenti combinati, portando a modificare le terapie standard in altri istotipi tumorali quali il melanoma (79) e il tumore del polmone (80,81). Nel mesotelioma, l'utilizzo di CTLA4 come bersaglio si è dimostrato inattivo in un robusto studio randomizzato di fase III (72,82), tuttavia vi sono prove convincenti che combinato con anti-PD1 o anti-PDL1 può essere clinicamente utile. Uno studio preliminare a braccio singolo ha riportato attività con la terapia combinata CTLA4/PDL1, tremelimumab/durvalumab, in pazienti con mesotelioma recidivante (83) con un tasso di risposta del 28% e una durata media della risposta di 16 mesi. Lo studio MAPS2 (IFCT-1501), ha confrontato il trattamento con nivolumab e ipilimumab con il solo nivolumab riportando un tasso di controllo della malattia incrementale (42,6% versus 51,9%), consistente con un'interazione sinergica (84).

Altre combinazioni possono risultare promettenti in clinica. Il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (vascular endothelial growth factor, VEGF) regola negativamente l'infiltrazione di linfociti T e, razionalmente, la sua inibizione è sinergica con la terapia anti-PD1 (85). Nel tumore del polmone, l'aggiunta di bevacizumab aumenta progressivamente l'efficacia della combinazione di anti-PD1 e chemioterapia (80). Nel mesotelioma studi clinici stanno arruolando (NCT03502746) o sono in fase di sviluppo per esplorare le combinazioni di anti-angiogenici con anti-PD1 o anti-PDL1 (compreso lo studio MiST). In base alle emergenti evidenze, una sinergia clinica può essere una possibilità reale nel mesotelioma.

Le cellule T regolatorie hanno un'attività inibitoria sul sistema immunitario e sono aumentate dalle proteine FAK (focal adesion kinase), portando all'evasione dall'attacco immunitario contro il tumore. (86). L'inibizione delle FAK potenzia l'attività di anti-PD1 in modelli preclinici (87). Questa osservazione ha condotto ad uno studio di fase I nel mesotelioma con la combinazione pembrolizumab e dafactinib (NCT02758587). La modulazione del microambiente tumorale verso un fenotipo anti-tumorale, è uno dei fattori principali che hanno condotto ad un aumento del numero di studi di combinazione non randomizzati che includono l'aggiunta di anticorpo-coniugati, ipertermia e inibitori dell'arginasi.

Forse, la strategia di combinazione più promettente emersa recentemente è la combinazione di anti-PD1 o anti-PDL1 con la chemioterapia nel tumore del polmone non a piccole cellule (72,80). Studi sono ora in corso nel mesotelioma (NCT02784171, NCT02899195, ACTRN12616001170415) che, se in grado di confermare i benefici osservati nei tumori polmonari, potrebbero portare ad una applicazione delle stesse combinazioni per la terapia dei mesoteliomi. Questo approccio può essere particolarmente importante nel diminuire i requisiti per una stratificazione anticipata in base ai biomarcatori.

23.7 Sommario: un panorama di nuove opportunità terapeutiche in rapida evoluzione

Gli ultimi 5 anni hanno visto una trasformazione straordinaria nel panorama della ricerca sul mesotelioma. Questi cambiamenti attraversano la nostra comprensione del profilo genomico e dell'eterogeneità inter-paziente e stanno guidando le terapie stratificate emergenti, con studi clinici iniziali promettenti. La rivoluzione dell'immunoterapia ha già trasformato le vite di pazienti con un'ampia gamma di tumori e il mesotelioma è fra i tumori in cui ci sono grandi aspettative. C'è stata un'accelerazione nella rapidità con cui nuovi paradigmi vengono traslati al mesotelioma da altri tumori (due esempi sono la combinazione di immunoterapia e la chemioimmunoterapia). Di questo passo, è possibile prevedere che nel prossimo quinquennio vedremo cambiamenti significativi nella terapia standard del mesotelioma, a lungo attesi particolarmente nelle recidive.

Referenze

1. Shepherd FA, et al. Prospective randomized trial of docetaxel versus best supportive care in patients with non-small-cell lung cancer previously treated with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2000;18:2095–103. <https://doi.org/10.1200/JCO.2000.18.10.2095>.
2. Shepherd FA, et al. Erlotinib in previously treated non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2005;353:123–32. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050753>.
3. Farzin M, et al. Loss of expression of BAP1 predicts longer survival in mesothelioma. *Pathology*. 2015;47:302–7. <https://doi.org/10.1097/PAT.0000000000000250>.
4. Bueno R, et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet*. 2016;48:407–16. <https://doi.org/10.1038/ng.3520>.
5. Bott M, et al. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet*. 2011;43:668–72. <https://doi.org/10.1038/ng.855>.
6. Testa JR, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet*. 2011;43:1022–5. <https://doi.org/10.1038/ng.912>.
7. Xu J, et al. Germline mutation of Bap1 accelerates development of asbestos-induced malignant mesothelioma. *Cancer Res*. 2014;74:4388–97. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1328>.
8. Altomare DA, et al. A mouse model recapitulating molecular features of human mesothelioma. *Cancer Res*. 2005;65:8090–5. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2312>.

9. Jongsma J, et al. A conditional mouse model for malignant mesothelioma. *Cancer Cell*. 2008;13:261–71. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.01.030>.
10. Walts AE, et al. BAP1 immunostain and CDKN2A (p16) FISH analysis: clinical applicability for the diagnosis of malignant mesothelioma in effusions. *Diagn Cytopathol*. 2016;44:599–606. <https://doi.org/10.1002/dc.23491>.
11. Hida T, et al. BAP1 immunohistochemistry and p16 FISH results in combination provide higher confidence in malignant pleural mesothelioma diagnosis: ROC analysis of the two tests. *Pathol Int*. 2016;66:563–70. <https://doi.org/10.1111/pin.12453>.
12. Hida T, et al. Immunohistochemical detection of MTAP and BAP1 protein loss for mesothelioma diagnosis: comparison with 9p21 FISH and BAP1 immunohistochemistry. *Lung Cancer*. 2017;104:98–105. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2016.12.017>.
13. Cheng JQ, et al. Frequent mutations of NF2 and allelic loss from chromosome band 22q12 in malignant mesothelioma: evidence for a two-hit mechanism of NF2 inactivation. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999;24:238–42.
14. Miyana A, et al. Hippo pathway gene mutations in malignant mesothelioma: revealed by RNA and targeted exon sequencing. *J Thorac Oncol*. 2015;10:844–51. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000493>.
15. Bonneville R, et al. Landscape of microsatellite instability across 39 cancer types. *JCO Precision Oncol*. 2017;2017:1–15. <https://doi.org/10.1200/PO.17.00073>.
16. Arulananda S, et al. Mismatch repair protein defects and microsatellite instability in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol*. 2018;13:1588–94. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.07.015>.
17. Farmer H, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005;434:917–21. <https://doi.org/10.1038/nature03445>.
18. Fong PC, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*. 2009;361:123–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0900212>.
19. Busacca S, et al. BRCA1 is an essential mediator of vinorelbine-induced apoptosis in mesothelioma. *J Pathol*. 2012;227:200–8. <https://doi.org/10.1002/path.3979>.
20. Knijnenburg TA, et al. Genomic and molecular landscape of DNA damage repair deficiency across the cancer genome atlas. *Cell Rep*. 2018;23:239–254. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.03.076>.
21. Hakiri S, et al. Functional differences between wild-type and mutant-type BRCA1-associated protein 1 tumor suppressor against malignant mesothelioma cells. *Cancer Sci*. 2015;106:990–9. <https://doi.org/10.1111/cas.12698>.
22. Martincorena I, et al. Universal patterns of selection in cancer and somatic tissues. *Cell*. 2018;173:1823. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.001>.
23. Von Hoff DD, et al. Inhibition of the hedgehog pathway in advanced basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361:1164–72. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905360>.
24. Rudin CM, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med*. 2009;361:1173–8. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0902903>.
25. Meerang M, et al. Antagonizing the hedgehog pathway with Vismodegib impairs malignant pleural mesothelioma growth in vivo by affecting Stroma. *Mol Cancer Ther*. 2016;15:1095–105. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0583>.
26. You M, et al. Targeting of the hedgehog signal transduction pathway suppresses survival of malignant pleural mesothelioma cells in vitro. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2014;147:508–16. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2013.08.035>.
27. Shi Y, et al. Role of hedgehog signaling in malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res*. 2012;18:4646–56. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0599>.
28. Lim CB, et al. Mutational analysis of hedgehog signaling pathway genes in human malignant mesothelioma. *PLoS One*. 2013;8:e66685. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066685>.
29. Mok TS, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009;361:947–57. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0810699>.
30. Paez JG, et al. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. 2004;304:1497–500. <https://doi.org/10.1126/science.1099314>.
31. Enomoto Y, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in malignant pleural and peritoneal mesothelioma. *J Clin Pathol*. 2012;65:522–7. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2011-200631>.
32. Kim JE, et al. Mutational profiling of malignant mesothelioma revealed potential therapeutic targets in EGFR and NRAS. *Transl Oncol*. 2018;11:268–74. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.01.005>.
33. Schildgen V, et al. Low frequency of EGFR mutations in pleural mesothelioma patients, Cologne, Germany. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015;23:118–<https://doi.org/10.1097/PDM.0b013e3182a3645e>.
34. Butrynski JE, et al. Crizotinib in ALK-rearranged inflammatory myofibroblastic tumor. *N Engl J Med*. 2010;363:1727–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1007056>.

35. Kwak EL, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2010;363:1693–703. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1006448>.
36. Peters S, et al. Alectinib versus Crizotinib in untreated ALK-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2017;377:829–38. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1704795>.
37. Soda M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007;448:561–6. <https://doi.org/10.1038/nature05945>.
38. Hung YP, et al. Identification of ALK rearrangements in malignant peritoneal mesothelioma. *JAMA Oncol.* 2018;4:235–8. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.2918>.
39. McGranahan N, et al. Clonal status of actionable driver events and the timing of mutational processes in cancer evolution. *Sci Transl Med.* 2015;7:283ra254. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa1408>.
40. Jamal-Hanjani M, et al. Tracking genomic cancer evolution for precision medicine: the lung TRACERx study. *PLoS Biol.* 2014;12:e1001906. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001906>.
41. Jamal-Hanjani M, et al. Tracking the evolution of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2017;376:2109–21. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1616288>.
42. Mitchell TJ, et al. Timing the landmark events in the evolution of clear cell renal cell cancer: TRACERx renal. *Cell.* 2018;173:611–623 e617. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.02.020>.
43. Turajlic S, et al. Deterministic evolutionary trajectories influence primary tumor growth: TRACERx renal. *Cell.* 2018;173:595–610 e511. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.043>.
44. Szlosarek PW, et al. In vivo loss of expression of argininosuccinate synthetase in malignant pleural mesothelioma is a biomarker for susceptibility to arginine depletion. *Clin Cancer Res.* 2006;12:7126–31. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1101>.
45. Szlosarek PW, et al. Arginine deprivation with pegylated arginine deiminase in patients with argininosuccinate synthetase 1-deficient malignant pleural mesothelioma: a randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2017;3:58–66. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.3049>.
46. Szlosarek PW, et al. Metabolic response to pegylated arginine deiminase in mesothelioma with promoter methylation of argininosuccinate synthetase. *J Clin Oncol.* 2013;31:e111–3. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.42.1784>.
47. Nicholson LJ, et al. Epigenetic silencing of argininosuccinate synthetase confers resistance to platinum-induced cell death but collateral sensitivity to arginine auxotrophy in ovarian cancer. *Int J Cancer.* 2009;125:1454–63. <https://doi.org/10.1002/ijc.24546>.
48. Beddowes E, et al. Phase 1 dose-escalation study of pegylated arginine Deiminase, Cisplatin, and Pemetrexed in patients with argininosuccinate synthetase 1-deficient thoracic cancers. *J Clin Oncol.* 2017;35:1778–85. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.71.3230>.
49. Locke M, et al. Inhibition of the polyamine synthesis pathway is synthetically lethal with loss of Argininosuccinate synthase 1. *Cell Rep.* 2016;16:1604–13. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.097>.
50. LaFave LM, et al. Loss of BAP1 function leads to EZH2-dependent transformation. *Nat Med.* 2015;21:1344–9. <https://doi.org/10.1038/nm.3947>.
51. Garnett MJ, et al. Systematic identification of genomic markers of drug sensitivity in cancer cells. *Nature.* 2012;483:570–5. <https://doi.org/10.1038/nature11005>.
52. Iorio F, et al. A landscape of pharmacogenomic interactions in cancer. *Cell.* 2016;166:740–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.017>.
53. Tsherniak A, et al. Defining a cancer dependency map. *Cell.* 2017;170:564–576 e516. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.010>.
54. Boehm JS, Golub TR. An ecosystem of cancer cell line factories to support a cancer dependency map. *Nat Rev Genet.* 2015;16:373–4. <https://doi.org/10.1038/nrg3967>.
55. Marjon K, et al. MTAP deletions in cancer create vulnerability to targeting of the MAT2A/PRMT5/RIOK1 Axis. *Cell Rep.* 2016;15:574–87. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.043>.
56. Mavrakis KJ, et al. Disordered methionine metabolism in MTAP/CDKN2A-deleted cancers leads to dependence on PRMT5. *Science.* 2016;351:1208–13. <https://doi.org/10.1126/science.aad5944>.
57. Kryukov GV, et al. MTAP deletion confers enhanced dependency on the PRMT5 arginine methyltransferase in cancer cells. *Science.* 2016;351:1214–8. <https://doi.org/10.1126/science.aad5214>.
58. Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF, Ladanyi M. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Clin Cancer Res.* 2003;9:2108–13.
59. Kindler HL, Burris HA 3rd, Sandler AB, Oliff IA. A phase II multicenter study of L-alanosine, a potent inhibitor of adenine biosynthesis, in patients with MTAP-deficient cancer. *Investig New Drugs.* 2009;27:75–81. <https://doi.org/10.1007/s10637-008-9160-1>.
60. Russo AA, Tong L, Lee JO, Jeffrey PD, Pavletich NP. Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature.* 1998;395:237–43. <https://doi.org/10.1038/26155>.

61. Lopez-Rios F, et al. Global gene expression profiling of pleural mesotheliomas: overexpression of aurora kinases and P16/CDKN2A deletion as prognostic factors and critical evaluation of microarray-based prognostic prediction. *Cancer Res.* 2006;66:2970–9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3907>.
62. Dacic S, et al. Prognostic significance of p16/cdkn2a loss in pleural malignant mesotheliomas. *Virchows Arch.* 2008;453:627–35. <https://doi.org/10.1007/s00428-008-0689-3>.
63. Kolluri KK, et al. Loss of functional BAP1 augments sensitivity to TRAIL in cancer cells. *elife.* 2018;7:e30224. <https://doi.org/10.7554/eLife.30224>.
64. Quispel-Janssen JM, et al. Comprehensive pharmacogenomic profiling of malignant pleural mesothelioma identifies a subgroup sensitive to FGFR inhibition. *Clin Cancer Res.* 2018;24:84–94. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-1172>.
65. Billingham L, Malotki K, Steven N. Research methods to change clinical practice for patients with rare cancers. *Lancet Oncol.* 2016;17:e70–80. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00396-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00396-4).
66. Middleton G, et al. The National Lung Matrix Trial: translating the biology of stratification in advanced non-small-cell lung cancer. *Ann Oncol.* 2015;26:2464–9. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv394>.
67. Yap TA, Aerts JG, Popat S, Fennell DA. Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat Rev Cancer.* 2017;17:475–88. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.42>.
68. Reck M, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for PD-L1-positive non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2016;375:1823–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1606774>.
69. Brahmer J, et al. Nivolumab versus Docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;373:123–35. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504627>.
70. Langer CJ, et al. Carboplatin and pemetrexed with or without pembrolizumab for advanced, non-squamous non-small-cell lung cancer: a randomised, phase 2 cohort of the open-label KEYNOTE-021 study. *Lancet Oncol.* 2016;17:1497–508. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30498-3](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30498-3).
71. Garon EB, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2015;372:2018–28. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1501824>.
72. Gandhi L, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2018;378:2078–92. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801005>.
73. Soria JC, et al. Osimertinib in untreated EGFR-mutated advanced non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 2018;378:113–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1713137>.
74. Forde PM, et al. Neoadjuvant PD-1 blockade in resectable lung cancer. *N Engl J Med.* 2018;378:1976–86. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716078>.
75. Alley EW, et al. Clinical safety and activity of pembrolizumab in patients with malignant pleural mesothelioma (KEYNOTE-028): preliminary results from a non-randomised, open-label, phase 1b trial. *Lancet Oncol.* 2017;18:623–30. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30169-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30169-9).
76. Quispel-Janssen J, et al. Programmed death 1 blockade with Nivolumab in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2018;13:1436–7. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.05.038>.
77. Mansfield AS, et al. B7-H1 expression in malignant pleural mesothelioma is associated with sarcomatoid histology and poor prognosis. *J Thorac Oncol.* 2014;9:1036–40. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000177>.
78. Fennell DA, et al. CONFIRM: a double-blind, placebo-controlled phase III clinical trial investigating the effect of nivolumab in patients with relapsed mesothelioma: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2018;19:233. <https://doi.org/10.1186/s13063-018-2602-y>.
79. Larkin J, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015;373:23–34. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1504030>.
80. Socinski MA, et al. Atezolizumab for first-line treatment of metastatic nonsquamous NSCLC. *N Engl J Med.* 2018;378:2288–301. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1716948>.
81. Hellmann MD, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in lung cancer with a high tumor mutational burden. *N Engl J Med.* 2018;378:2093–104. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1801946>.
82. Maio M, et al. Tremelimumab as second-line or third-line treatment in relapsed malignant mesothelioma (DETERMINE): a multicentre, international, randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial. *Lancet Oncol.* 2017;18:1261–73. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30446-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30446-1).
83. Calabro L, et al. Tremelimumab combined with durvalumab in patients with mesothelioma (NIBIT-MESO-1): an open-label, non-randomised, phase 2 study. *Lancet Respir Med.* 2018;6:451–60. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(18\)30151-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(18)30151-6).
84. Dual checkpoint blockade takes aim at relapsed mesothelioma. *Cancer Discov.* 2017;7:OF7. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-NB2017-087>.
85. Manegold C, et al. The potential of combined immunotherapy and antiangiogenesis for the synergistic treatment of advanced NSCLC. *J Thorac Oncol.* 2017;12:194–207. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.10.003>.

86. Serrels A, et al. Nuclear FAK controls chemokine transcription, Tregs, and evasion of anti-tumor immunity. *Cell*. 2015;163:160–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.001>.
87. Jiang H, et al. Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nat Med*. 2016;22:851–60. <https://doi.org/10.1038/nm.4123>.