



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

---

Corso di Laurea in Medicina e Chirurgia

**Sviluppo e caratterizzazione di organoidi  
da mesotelioma maligno della pleura:  
risposta terapeutica e medicina di  
precisione**

Relatore: Chiar.mo  
**Lory Santarelli**

Tesi di Laurea di:  
**Angela Ponziano**

Correlatore: Dott.  
**Marco Tomasetti**

A.A. 2021/2022

# INDICE

<b>1 MESOTELIOMA MALIGNO DELLA PLEURA</b> .....	<b>4</b>
<b>1.1 Eziologia</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2 Epidemiologia</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 Esposizione amianto</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3.1 Il pericolo amianto</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4 Patogenesi</b> .....	<b>11</b>
<b>1.5 Stadiazione TNM del MPM</b> .....	<b>13</b>
<b>1.6 Diagnosi</b> .....	<b>16</b>
<b>1.7 Istotipi</b> .....	<b>17</b>
<b>1.8 Prognosi</b> .....	<b>20</b>
<b>2 TRATTAMENTO TERAPEUTICO</b> .....	<b>22</b>
<b>2.1 Chirurgia</b> .....	<b>23</b>
<b>2.2 Radioterapia</b> .....	<b>24</b>
<b>2.3 Chemioterapia</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4 Mirna</b> .....	<b>26</b>
<b>2.5 Terapia sistemica di seconda linea</b> .....	<b>27</b>
<b>2.6 Immunoterapia</b> .....	<b>28</b>
<b>2.7 Impatto finanziario</b> .....	<b>30</b>
<b>3 MODELLI PRE-CLINICI NELLO SVIUPPO DEL MESOTEIOMA</b> .....	<b>31</b>
<b>4 ORGANOIDI</b> .....	<b>32</b>
<b>4.1 Medicina di precisione</b> .....	<b>33</b>
<b>5 SCOPO DELLO STUDIO</b> .....	<b>34</b>
<b>5.1 Materiali e metodi</b> .....	<b>35</b>
<b>5.1.1 Pazienti</b> .....	<b>35</b>

5.1.2 Cultura DOP-MPM .....	36
5.2 Trattamenti farmacologici .....	37
5.2.1 Istologia e immunoistochimica .....	37
5.2.2 Saggio TUNEL.....	38
5.2.3 Analisi di microarray.....	38
5.2.4Analisi di arricchimento .....	39
6 RISULTATI.....	39
7 RISPOSTA AL TRATTAMENTO .....	42
8 DISCUSSIONE.....	53
9 CONCLUSIONI .....	55
<i>BIBLIOGRAFIA</i> .....	56

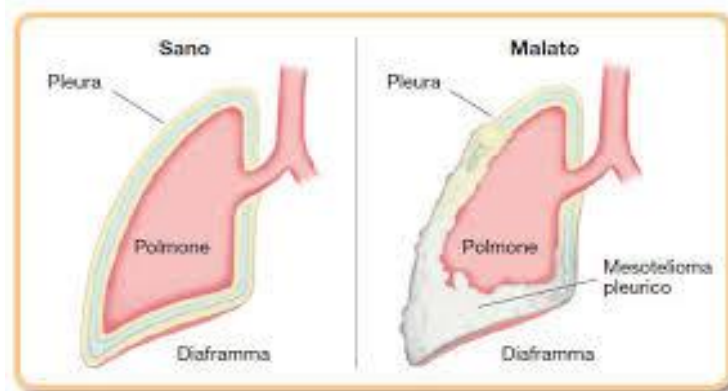
# Sviluppo e caratterizzazione di organoidi da mesotelioma maligno della pleura: risposta terapeutica e medicina di precisione

## 1 MESOTELIOMA MALIGNO DELLA PLEURA

### 1.1 Eziologia

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un tipo di cancro raro ma aggressivo, origina dal mesotelio della pleura, del pericardio, del peritoneo e della tunica vaginale che coprono rispettivamente il polmone, il cuore, l'addome e i testicoli (Carolina H. Cavarson et al 2021).

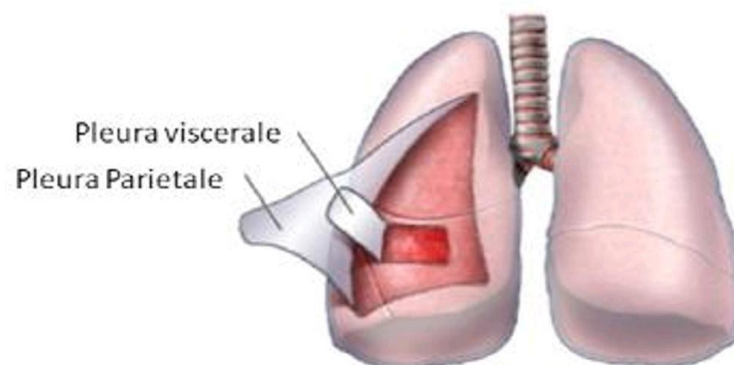
La maggior parte dei mesoteliomi maligni interessa la pleura, rappresenta l'80% dei casi di mesotelioma e meno dell'1% di tutti i tipi di tumore ed è correlato con l'esposizione alle fibre aereodisperse dell'amianto o asbesto.



*Figura 1. Rappresentazione schematica del Mesotelioma pleurico*

Il mesotelioma maligno si infiltra ampiamente nella pleura, determinando un versamento pleurico e un'importante compromissione, in fase avanzata, della funzionalità e della meccanica respiratoria.

Le pleure sono membrane sierose, sottili e trasparenti, che rivestono i polmoni e la superficie interna della cavità toracica e permette ai polmoni di dilatarsi negli scambi respiratori. Ogni pleura è distinta in due porzioni: una che avvolge i polmoni, detta pleura viscerale (o polmonare) e l'altra che riveste le pareti della cavità che accoglie i polmoni, detta pleura parietale. Entrambe le pleure nei polmoni hanno uno strato di cellule piatte ed estese (mesotelio) ed uno strato di fasci di collagene. Esse presentano una superficie aderente e una superficie libera, liscia e umida. Delimitano uno spazio chiuso, denominato cavità pleurica, che normalmente è virtuale. Tale cavità contiene un liquido sieroso, che consente alle due pleure di scorrere facilmente, senza attrito, l'una sull'altra. La cavità pleurica diviene reale solo quando, in condizioni patologiche, vi si raccoglie liquido (versamento pleurico) o vi penetra aria (pneumotorace).



**Figura 2.** Rappresentazione schematica della disposizione delle pleure

La pleura con liquido può essere colpita da processi infiammatori come la pleurite acuta, da versamento pleurico, tumore, da pneumotorace e da processi fibrosi, come le placche

pleuriche, mesotelioma fibroso, mesotelioma della pleura, ispessimenti pleurici e da altre neoplasie, tra cui il tumore ai polmoni.

## **1.2 Epidemiologia**

Il primo caso di MM associato all'amianto è stato segnalato negli USA, nel 1967, a causa di un evento epidemico di MM tra i minatori, che ha contribuito a stabilire l'associazione tra l'esposizione all'amianto e lo sviluppo della malattia. Finora rara, l'incidenza del MM è in aumento dalla seconda metà del 20° secolo, un contesto in cui il MM è stato collegato all'uso indiscriminato dell'amianto nel secolo scorso. La reale portata di tale epidemia mondiale di MM non è nota. Attualmente, il carico maggiore di utilizzo dell'amianto si concentra in Brasile, Russia, India e Cina (Pietro Apostoli et al 2019).

Si stima che tra il 2005 e il 2050 negli Stati Uniti saranno stati diagnosticati circa 94.000 casi di MPM e 15.000 casi di mesotelioma peritoneale maligno.

Il Brasile è considerato uno dei più importanti produttori ed esportatori di amianto. Tuttavia, un gran numero di pazienti rimane non diagnosticato, determinando l'attuale bassa incidenza di MM in Brasile.

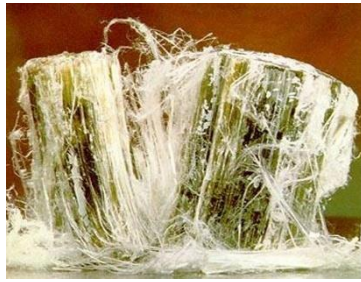
Dati preoccupanti arrivano soprattutto dai Paesi in via di sviluppo, come l'India, dove le attività di estrazione e lavorazione dell'asbesto riguardano ancora un numero considerevole di addetti e dove solo recentemente sono state intraprese rigorose misure di prevenzione.

Una delle peculiarità di questa patologia è il lungo periodo di latenza, che varia tra 20 e 40 anni, con una prognosi sfavorevole e una sopravvivenza mediana a 1 anno dal momento della diagnosi. Questa lunga latenza rende molto difficile la diagnosi della

malattia, in quanto nei pazienti che mostrano i primi sintomi quali versamento pleurico, dolore alla parte bassa della schiena o ad un lato del torace, fiato corto, tosse, stanchezza, perdita di peso, difficoltà a deglutire, il tumore è ormai già considerato in uno stato avanzato con poche possibilità di trattamento. Il MM colpisce prevalentemente i maschi (rapporto maschi/femmine 5:1) e il rischio aumenta con l'età, con una maggiore prevalenza negli individui >65 anni di età. La maggior parte dei casi di MPM è causata da una precedente esposizione all'amianto, che spesso si è verificata >40 anni prima.

### **1.3 Esposizione amianto**

Con il termine generico “amianto” si indica una famiglia di minerali silicatici di origine naturale utilizzati per la produzione di materiali che per le loro particolari caratteristiche sono stati ampiamente sfruttati e commercializzati in passato, fino alla messa al bando sancita dalla legge 257/1992. Tali materiali sono stati impiegati principalmente nei settori della cantieristica navale, rotabili ferroviari, metallurgia, siderurgia, metalmeccanica, industria automobilistica, industria militare, industria del cemento-amianto, edilizia, zuccherifici, agricoltura, raffinerie (settore petrolifero), tessile e industria del vetro. Dal punto di vista mineralogico, non esiste invece un gruppo di minerali chiamato amianto, ma esistono sei forme minerali naturali di silicati idrati fibrosi (Crisotilo, Crocidolite, Amosite, Tremolite, Antofillite, Actinolite), afferenti alla serie degli anfiboli e dei serpentini, che si distinguono sulla base della loro composizione chimica e delle loro caratteristiche morfologiche (struttura fibrosa).



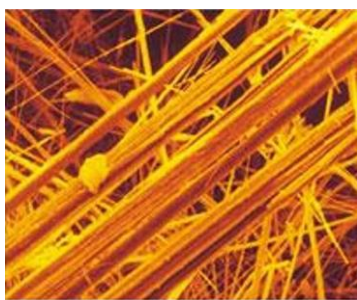
Crisotilio



Tremolite



Crocidolite



Amosite



Actinolite



Antofillite

*Figura 3. Fibre di amianto*

L'attività industriale ebbe un notevole impulso in epoca post bellica, anni in cui l'amianto era considerato materiale strategico.

A seguito di numerosi studi epidemiologici che hanno dimostrato, già a partire dagli anni '60 del secolo scorso, la cancerogenicità di tali fibre, tutti i minerali di amianto sono stati riconosciuti dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Iarc) come cancerogeni per l'uomo.

L'esposizione quindi può essere lavorativa, per gli operatori impegnati nella produzione e nell'utilizzo industriale di amianto e derivati, o paraoccupazionale, per l'uso dei



relativi manufatti e nelle mogli dei lavoratori dell'amianto che lavano i loro vestiti. Inoltre, l'esposizione all'amianto potrebbe essersi verificata al di fuori del luogo di lavoro o potrebbe essersi verificata all'insaputa del paziente.

L'amianto è stato utilizzato in numerosissime applicazioni industriali prima della messa a bando del 1992, e vi è ancora una presenza massiccia di materiale non rimosso e potenzialmente pericoloso.

L'età media alla diagnosi è 69 anni. La forma pleurica è più frequente (93%) rispetto a quella peritoneale (6,4%); seguono il pericardio (0,3%) e la tunica vaginale del testicolo (0,4%). La latenza di insorgenza della malattia rispetto all'esposizione all'asbesto è di circa 45 anni.

Da quando viene eseguita la sorveglianza epidemiologica è stato possibile riconoscere situazioni di esposizione inconsapevole e in circostanze inattese.

Di particolare interesse sono il numero di casi di mesotelioma registrati in categorie nuove come produzione e manutenzione dei mezzi di trasporto; industria alimentare, del legno, del tabacco; industrie manifatturiere; agricoltura e allevamento; ristorazione; istruzione e servizi del settore amministrativo.

Ad oggi la sospensione dell'uso dell'amianto nei paesi sviluppati fa supporre che l'incidenza dovrebbe diminuire nel tempo, mentre si prevede che possa continuare ad aumentare nei paesi in via di sviluppo dove si continua ad utilizzarlo come India e Bangladesh (Robinson C. et al 2006).

Pur essendo passati trent'anni da quando l'Italia ha messo al bando l'amianto con la legge 257/92, i danni che questa sostanza provoca sulla salute dell'uomo sono ancora evidenti (Pubblicazioni Inail 2021).

Per provocare l'asbestosi non è sufficiente un'occasionale inalazione di fibra d'amianto in scarsa quantità e per un periodo di tempo limitato, ma è necessaria un'esposizione prolungata e quantitativamente rilevante.

Per sviluppare un mesotelioma pleurico maligno è, invece, sufficiente una quantità di fibra anche non particolarmente elevata per periodi spesso limitati. È di solito necessario un lungo periodo di tempo tra l'esposizione alla sostanza e lo sviluppo del tumore pleurico (circa 12 – 40 anni) ed è per questo che i casi di mesotelioma pleurico maligno che vediamo oggi rappresentano la conseguenza di un'esposizione professionale ed extra-professionale del passato essendo l'estrazione e la lavorazione dell'amianto in tutto il mondo abbandonata o fortemente ridotta dopo il 1970 per i rischi che comporta.

### **1.3.1 Il pericolo amianto**

L'amianto è uno dei più importanti agenti cancerogeni professionali, causando circa la metà dei decessi per cancro professionale. Il fardello delle malattie asbesto-correlate è ancora attuale anche in quei Paesi, come l'Italia, in cui l'amianto è stato messo al bando dai primi anni novanta.

A seguito di numerosi studi epidemiologici che hanno dimostrato, già a partire dagli anni '60 del secolo scorso, la cancerogenicità di tali fibre, tutti i sopracitati minerali di amianto sono stati riconosciuti dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (Iarc) come cancerogeni per l'uomo.

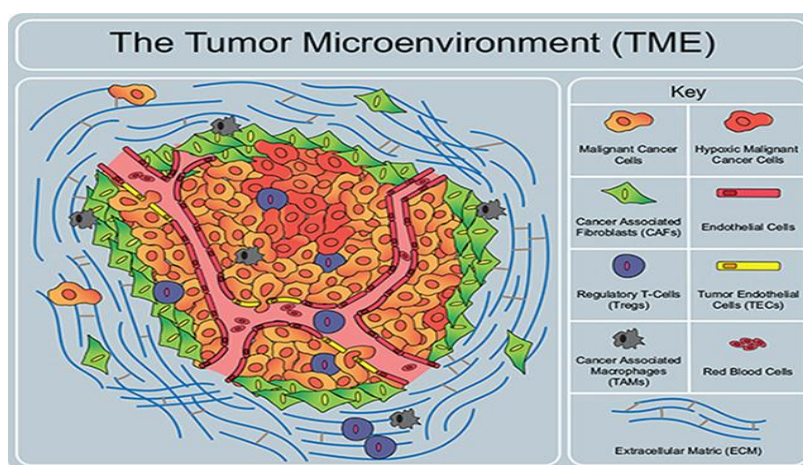
L'Italia ha provveduto, tra le prime nazioni in ambito europeo ed internazionale, a mettere al bando l'amianto con la legge 257/1992 e ad emanare norme tecniche di settore, volte alla tutela dei lavoratori e degli ambienti di vita.

## 1.4 Patogenesi

Il mesotelioma pleurico è correlato, nell'apparato respiratorio dei soggetti esposti, con l'inalazione e la deposizione di microscopiche particelle volatili dell'amianto che, non potendo essere distrutte dai macrofagi (TAM) deputate all'eliminazione delle sostanze estranee penetrate nei polmoni in quanto fibre non degradabili, si accumulano nel tempo.

La risposta infiammatoria alle fibre di amianto che raggiungono il parenchima polmonare esterno è una caratteristica della patogenesi e del microambiente del mesotelioma ed è un'ipotesi di come le fibre e il fluido degli anfiboli entrino in primo luogo nello spazio pleurico (Gerard J.Chu et al, 2019).

Inoltre, le cellule mesoteliali a contatto con le fibre di amianto generano CCL2, attirando macrofagi che vengono coinvolti in "fagocitosi frustrata" a causa delle dimensioni e della biopersistenza delle fibre anfiboliche (Gerard J.Chu et al, 2019).



*Figura 4. Microambiente tumorale*

La produzione di macrofagi di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di specie azotate aumenta le specie reattive di ossigeno/azoto già catalizzate dal ferro nelle fibre di amianto (Gerard J.Chu et al, 2019). La quantità di radicali liberi idrossilici e radicali liberi dell'ossido nitrico è stata associata all'estensione delle rotture del filamento di DNA e delle delezioni geniche in linee cellulari in coltura e sono considerati responsabili di eventi mutageni chiave (Gerard J.Chu et al, 2019).

Inoltre, le cellule che hanno subito danni genotossici subirebbero normalmente la morte cellulare programmata indotta da poli(ADP)ribosio polimerasi (Gerard J.Chu et al, 2019.) ma sono "salvate" da aspetti della risposta infiammatoria. In sintesi, il sistema immunitario innato, in particolare i macrofagi, contribuiscono a un ambiente che promuove la mutagenesi e la sopravvivenza delle cellule mesoteliali mutate (Gerard J.Chu et al, 2019).

## **1.5 Stadiazione TNM del MPM**

Determinare lo stadio del tumore, ovvero quanto è estesa la malattia, è essenziale per decidere il tipo di terapia. Per il mesotelioma vengono infatti individuati quattro stadi sulla base dei criteri TNM (Tumor-Node-Metastasis) che tengono conto dell'estensione del tumore (T), dell'eventuale coinvolgimento dei linfonodi regionali adiacenti al tumore (N) e della presenza di metastasi a distanza (M). Nel 2017 è stata pubblicata l'ottava edizione della stadiazione TNM del MPM. Rispetto alla precedente classificazione, viene eliminata la suddivisione del descrittore T1 in T1a e T1b per assenza di differenze in termini di sopravvivenza e per quanto riguarda il descrittore N, sono stati creati un nuovo N1 (che comprende i descrittori N1 e N2 della settima edizione) ed un nuovo N2 (precedentemente N3). Stadiazione secondo i criteri TNM (Ottava Edizione) (Lawek Berzenji et al 2018):

<i>Classificazione</i>	<i>Descrizione</i>
<i>T</i>	<i>Tumore primitivo</i>
Tx	Il tumore primitivo non può essere definito
T0	Assenza di evidenza del tumore primitivo
T1	Il tumore coinvolge la pleura parietale omolaterale oppure la sola pleura viscerale, con o senza coinvolgimento di pleura viscerale, mediastinica o diaframmatica
T2	Il tumore coinvolge la pleura omolaterale (viscerale o parietale) con almeno uno dei seguenti aspetti: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coinvolgimento del muscolo diaframma</li> <li>- Invasione del parenchima polmonare</li> </ul>
T3	Il tumore coinvolge la pleura omolaterale (viscerale o parietale) con almeno uno dei seguenti aspetti: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Coinvolgimento della fascia endotoracica</li> <li>- Invasione del grasso mediastinico</li> <li>- Focus solitario di tumore che invade i tessuti molli della parete toracica</li> <li>- Coinvolgimento del pericardio non trasmurale</li> </ul>

T4	<p>Il tumore coinvolge la pleura omolaterale (viscerale o parietale) con almeno uno dei seguenti aspetti:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Estensione diffusa alla parete toracica con o senza erosione costale associata</li> <li>- Estensione diretta al peritoneo attraverso il diaframma</li> <li>- Estensione alla pleura controlaterale</li> <li>- Estensione diretta del tumore agli organi mediastinici (esofago, trachea, cuore, grandi vasi)</li> <li>- Estensione diretta del tumore alle vertebre, forami intervertebrali, midollo spinale</li> <li>- Estensione del tumore alla superficie interna del pericardio (con o senza versamento pericardico)</li> </ul>
----	--

<i>N</i>	<i>Linfonodi regionali</i>
NX	Linfonodi non valutabili
N1	Metastasi ai linfonodi intratoracici omolaterali (bronco-polmonari, ilari, sottocarinali, paratracheali, aorto-polmonari, paraesofagei, peridiaframmatici, del grasso del cuscinetto pericardico, intercostali e mammari interni)
N2	Metastasi ai linfonodi intratoracici controlaterali; metastasi ai linfonodi omolaterali o controlaterali sovraclaveari
<i>M</i>	<i>Metastasi a distanza</i>
M0	Assenza di metastasi a distanza
M1	Presenza di metastasi a distanza

*Figura 5. Ottava edizione TNM*

## 1.6 Diagnosi

La manifestazione clinica più comune di MPM è la dispnea progressiva, solitamente secondaria alla formazione di versamento pleurico, associata o meno a dolore toracico non pleuritico causato da invasione della parete toracica. Possono essere presenti anche tosse non produttiva, febbre, astenia, ipossia, perdita di peso o sudorazione notturna. La malattia è generalmente monolaterale (95%) e prevalentemente localizzata all'emittoce destro (60%). I sintomi di solito si manifestano in modo insidioso e per un lungo periodo di tempo dalla presentazione iniziale alla diagnosi (da 3 a 6 mesi), portando infine a una diagnosi in fase avanzata. (Yanyun Gao et al.2018).

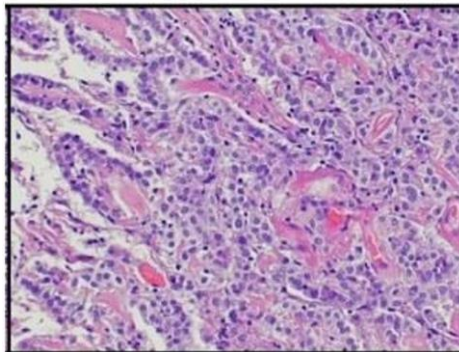
La diagnosi dipende dall'integrazione di presentazione clinica, imaging e patologia. Nello specifico, il versamento pleurico appare all'esame obiettivo o alla radiografia del torace fino al 95% dei casi, ma il suo volume diminuisce con la progressione della malattia. La presenza di dolore toracico o di una massa palpabile suggerisce l'invasione della parete toracica e fa presagire l'inoperabilità chirurgica. La tomografia toracica, così come la risonanza magnetica toracica, consente la visualizzazione del versamento pleurico, la presenza di masse pleuriche e la valutazione dei linfonodi ilari e mediastinici (Van Zandwijk et al 2013). Tuttavia, la risonanza magnetica è un metodo più sensibile e dovrebbe essere preso in considerazione nei casi potenzialmente resecabili.



## 1.7 Istotipi

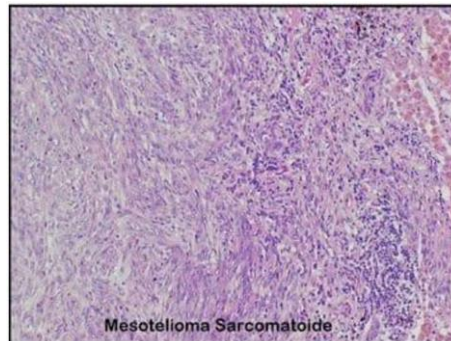
La classificazione dell'OMS del 2015 suddivide il MM in sottotipi epitelioide (60-80%), bifasico (10-15%) e sarcomatoide (10%), con caratteristiche desmoplastiche (2%) riconosciute nel sottotipo sarcomatoide. In alcuni casi, la classificazione può essere difficile a causa della presenza di popolazioni miste (Mary Beth Beasley et al 2022).

- mesotelioma epitelioide (70-80%): è l'istotipo più frequente, formato da aggregati di cellule atipiche epitelioidi mesoteliali raggruppati in fasci, tubuli, acini e con aspetto simile all'adenocarcinoma. La presenza di cellule anaplastiche e/o giganti multinucleate è tipica della forma pleomorfa, mentre la variante linfo-istiocitoide è composta da un denso infiltrato infiammatorio misto che può mimare un linfoma o un carcinoma simil-linfoepiteliale.



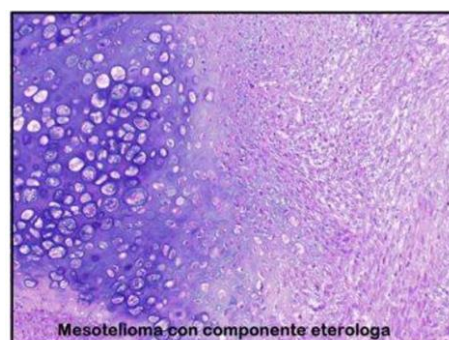
*Figura 6. Mesotelioma epitelioide*

- mesotelioma sarcomatoide (10%): composto da cellule fusiformi arrangiate in corti fascicoli, che infiltra i tessuti molli della pleura parietale o del parenchima polmonare. Questo aspetto lo rende simile al fibrosarcoma o all'istiocitoma fibroso maligno.



*Figura 7. Mesotelioma Sarcomatoide*

- mesotelioma bifasico (10-25%): raggruppa entrambi i tipi istologici precedenti, in diverse proporzioni, con la presenza di almeno il 10% di una delle due componenti. È raccomandato dalle linee guida di riportare la percentuale di componente sarcomatoide utile per scegliere eventuali futuri interventi terapeutici.



*Figura 8. Mesotelioma bifasico*

- mesotelioma desmoplastico (< 2%): forma più rara con aggressività simile al sarcomatoide.

Esistono altre forme istologiche rare di mesotelioma quali:

- mesotelioma localizzato: rara presentazione di mesotelioma maligno come massa solitaria localizzata a base pleurica;
- mesotelioma papillare ben differenziato: rara forma di mesotelioma di basso grado che spesso coinvolge il peritoneo in assenza di chiari aspetti di invasione.

La variante sarcomatoide è associata agli esiti peggiori, con una sopravvivenza mediana di soli 4 mesi. Al contrario, l'epitelioide ha la prognosi più favorevole con una sopravvivenza mediana di 13,1 mesi.

## 1.8 Prognosi

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un tumore letale, notoriamente noto per le sue opzioni di trattamento limitate, la mancanza di terapie mirate e i tassi di sopravvivenza catastrofici.

I tumori MPM sono altamente eterogenei e mostrano una sostanziale varianza nel panorama del genoma tra i singoli pazienti, caratterizzati da mutazioni diffuse con perdita di funzione dei geni oncosoppressori (TSG) che sono difficili da colpire.

Una caratteristica della malattia è la prevalenza dominante di alterazioni inattivanti terapeutamente intrattabili nelle TSG, rendendo il MPM uno dei tumori più difficili da trattare e un cancro caratterizzato da una significativa mancanza di opzioni terapeutiche e una prognosi estremamente sfavorevole (tasso di sopravvivenza a 5 anni di solo dal 5% al 10%) (Yanyun Gao et al., 2022).

Infatti, nonostante gli avanzamenti nella terapia, il mesotelioma pleurico maligno rimane una neoplasia ad elevato livello di mortalità. L'intervento chirurgico per rimuovere la pleura, il polmone omolaterale, il nervo frenico, l'emidiaframma e il pericardio, combinato con la chemioterapia o la radioterapia, può essere preso in considerazione anche se non modifica sostanzialmente la prognosi o il tempo di sopravvivenza.

La sopravvivenza a lungo termine è superiore nei pazienti affetti da MPM ad istotipo epitelioide senza coinvolgimento linfonodale e trattati con terapia multimodale. I pazienti con istotipo sarcomatoide e/o con coinvolgimento linfonodale o mancata risposta al trattamento multimodale hanno un outcome peggiore, poiché tali caratteristiche sono spesso legate a progressione precoce di malattia .

La fase di imaging e quella istopatologica forniscono le informazioni prognostiche più forti.

L'Organizzazione europea per la ricerca e la cura del cancro (EORTC) suggerisce che lo scarso performance status, la leucocitosi, il tipo sarcomatoide e gli individui di sesso maschile sono associati a una prognosi peggiore. Nel frattempo, il punteggio CALGB include:

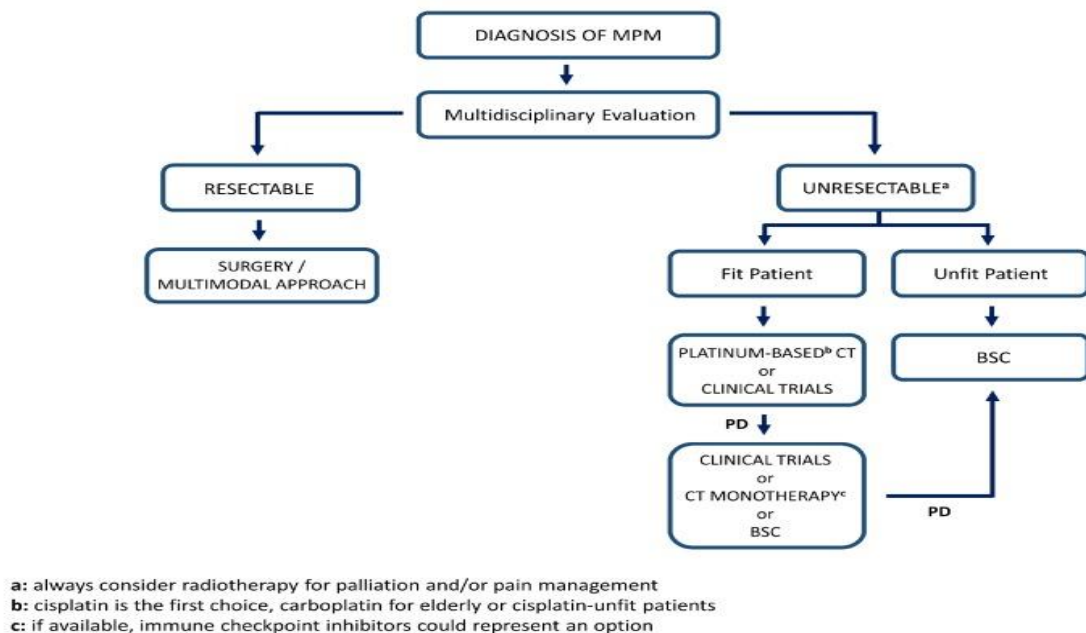
- Età > 75 al momento della diagnosi
- Cattivo status della performance
- Livelli di lattato deidrogenasi (LDH) > 500 U/L (> 8,4 microkat/L)
- Conta piastrinica > 400 000/microL (> 400 × 10<sup>9</sup>/L)
- Dolore toracico
- Istologia non epiteliale

Oltre al suo coinvolgimento nella patogenesi, l'infiammazione sistemica è associata alla sopravvivenza globale e alla risposta al trattamento. I fattori prognostici basati sulla risposta infiammatoria, che includono la combinazione di proteina C-reattiva e albumina, la combinazione della conta dei neutrofili e dei linfociti (rapporto neutrofili-linfociti, NLR) e la combinazione della conta piastrinica e dei linfociti sono associati alla sopravvivenza in pazienti con vari tipi di cancro, tra cui MPM, con livelli più elevati che prevedono una sopravvivenza più scarsa.

## 2 TRATTAMENTO TERAPEUTICO

Il trattamento terapeutico viene determinato in base allo stadio clinico, alle caratteristiche del paziente e dell'istotipo di malattia, suddividendolo per intento (intento curativo sulla malattia o palliativo).

Non esiste un trattamento curativo per MPM. Le opzioni di trattamento sistemico comprendono la chemioterapia, la terapia mirata e la radioterapia, erogate separatamente o come parte di un trattamento multimodale. La chirurgia è controversa e limitata ai pazienti con malattia allo stadio iniziale e buono stato funzionale. Le cure palliative e la gestione dei sintomi sono essenziali e il controllo dei versamenti pleurici è un fattore importante.



*Figura 9. Algoritmo terapeutico*

## **2.1 Chirurgia**

Nel contesto della malattia resecabile, il trattamento del MPM si basa sulla terapia trimodale: chirurgia, chemioterapia (neoadiuvante o adiuvante) e radioterapia, specialmente nei pazienti senza coinvolgimento linfonodale.

In generale, la prognosi è infausta, poiché la maggior parte dei pazienti ha una malattia non resecabile alla diagnosi o è considerata inoperabile a causa dell'età, del performance status o di comorbidità. È importante che i pazienti candidati all'intervento chirurgico vengano sottoposti a EBUS (ecografia endobronchiale) o mediastinoscopia, poiché la disseminazione linfonodale mediastinica è un fattore prognostico sfavorevole nel MPM.

Per i tumori resecabili, le tre procedure chirurgiche più comunemente utilizzate nel trattamento del mesotelioma sono la toracoscopia con pleurodesi, la pleurectomia/decorticazione e la pleuropneumonectomia extrapleurica (EEP).

## 2.2 Radioterapia

Le principali indicazioni attuali per la radioterapia nel MPM sono: radioterapia emitoracica prima o dopo pneumonectomia extrapleurica, radioterapia emitoracica dopo decorticazione/pleurectomia e radioterapia palliativa per alleviare i sintomi locali.



*Figura 10. Radiografia toracica di un paziente con MPM*

La radioterapia emitoracica radicale (RHR) può essere eseguita dopo pneumonectomia extrapleurica per migliorare il controllo locale.



## 2.3 Chemioterapia

La chemioterapia sistemica è una forma di terapia farmacologica che può essere somministrata per infusione endovenosa (EV). Può essere utilizzata, in casi selezionati, per ridurre la malattia, favorendo l'approccio chirurgico radicale (trattamento trimodale) o, in alternativa, per bloccare la crescita della malattia e favorire il miglioramento dei sintomi ad essa correlati.

La chemioterapia nel mesotelioma maligno può essere utilizzata sia nei casi di malattia potenzialmente operabili che non operabili anche se è il trattamento di scelta nel contesto della malattia non resecabile e per i pazienti con malattia recidivante o che non desiderano sottoporsi a intervento chirurgico. Gli effetti del trattamento chirurgico sulla sopravvivenza a lungo termine sono ancora poco chiari e, questo trattamento è proposto solo in pazienti affetti da MPM a variante epitelioide e bifasica, con scarsa componente sarcomatoide.

Per la terapia chemioterapica molti studi in passato hanno utilizzato schemi a base di cisplatino, ottenendo percentuali di risposte sino al 30% e consentendo al 75% dei pazienti di essere successivamente sottoposti a pleuropneumonectomia extrapleurica (EPP).

Nei pazienti con mesotelioma inoperabile o in ripresa di malattia, la chemioterapia spesso viene somministrata con l'intento di migliorare la qualità della vita e la sopravvivenza. Pertanto, in pazienti selezionati, con buon performance status, il trattamento chemioterapico di prima linea raccomandato attualmente è cisplatino (che, in caso di intolleranza, può essere sostituito dal carboplatino senza incidere sulla efficacia

terapeutica) in associazione con pemetrexed ogni 21 giorni (Andrea Mazzocch et al 2018). La cianocobalamina o vitamina B12 e acido folico o vitamina B9 associati al trattamento chemioterapico riducono la tossicità ematologica.

La chemioterapia di associazione con pemetrexed e cisplatino è rimasta invariata come standard di cura dal 2003 a seguito di uno studio clinico di fase III che ha dimostrato la superiorità della combinazione rispetto al solo cisplatino (sopravvivenza mediana 13,3 mesi vs 10 mesi) (Marie Shamseddin et al., 2021)

## **2.4 Mirna**

Molteplici studi, inoltre, supportano il continuo sviluppo di terapie basate su miRNA per il MPM.

I miRNA hanno dimostrato di contribuire alle caratteristiche del cancro nelle cellule MPM in vitro, e manipolare la loro espressione usando miRNA specifici per inibire la proliferazione e l'invasione delle cellule MPM e la loro interazione con le cellule stromali e immunitarie. Oltre alla somministrazione sistemica mirata con micelle, la somministrazione intrapleurica di miRNA complessati con atelocollagene o incapsulati in vescicole extracellulari (EV) come esosomi o microvescicole per la consegna di miRNA, ha un enorme potenziale per il trattamento (Glen Reid et al, 2020).

Le cellule rilasciano una varietà di EV che contengono una gamma di molecole cellulari tra cui miRNA.

Lo sviluppo in corso di farmaci a base di siRNA e miRNA che utilizzano la coniugazione liposomiale o diretta sottolinea il potenziale per i miRNA di servire come farmaci antitumorali (Glen Reid et al, 2020).

Le continue indagini cliniche descrivono nuovi approcci terapeutici come il rilascio di metotrexato (MTX)-TMP. Si è visto come la maggior parte dei pazienti aveva avuto miglioramenti sintomatici, ridotto il volume dell'MPE , e la valutazione del fluido ha rivelato un minor numero di cellule tumorali (Glen Reid et al, 2020).

## **2.5 Terapia sistemica di seconda linea**

Sfortunatamente, quasi tutti i pazienti progrediscono durante o dopo la terapia di prima linea e non esistono trattamenti standard raccomandati di seconda linea dopo il regime a base di platino.

Il ritrattamento con pemetrexed, eventualmente associato a composto a base di platino, può essere proposto nei pazienti che hanno raggiunto un controllo duraturo della malattia (>6 mesi) con la chemioterapia di prima linea.

La chemioterapia a singolo agente con vinorelbina o gemcitabina è la scelta preferita della maggior parte dei medici principalmente sulla base di analisi retrospettive o piccoli studi di fase II con un tasso di risposta del 15%–20%, PFS mediana di circa 2 mesi e OS mediana 6–9 mesi.

Pertanto, la valutazione per l'arruolamento negli studi clinici rappresenta un'opzione consigliabile per i pazienti che ricadono dopo il trattamento di prima linea, mentre i pazienti con PS di tre o più dell'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) dovrebbero ricevere solo cure palliative (Tsao A.S. et al 2022).

## 2.6 Immunoterapia

L'immunoterapia è una branca dell'oncologia che sfrutta il sistema immunitario per riconoscere e fermare il più possibile la crescita del tumore.

L'uso di inibitori del checkpoint immunitario (ICI) ha rivoluzionato il trattamento di vari tipi di tumore negli ultimi anni.

Al momento sono in corso molti trial clinici in cui vengono studiate molecole volte a modulare il sistema immunitario contro la malattia tumorale in stadio avanzato (Marie Shamseddin et al, 2021).

Uno studio francese multicentrico, randomizzato, di fase II (MAPS-2) ha confrontato nivolumab (anti-PD1) con nivolumab in combinazione con ipilimumab (anti-CTLA4) in pazienti che avevano fallito la terapia di prima o seconda linea. Il tasso di controllo della malattia a 12 settimane è stato del 44% nel gruppo nivolumab e del 50% nel gruppo di combinazione. L'alta espressione di PD-L1 è stata associata a un tasso di risposta più elevato.

Un approccio "taglia unica" diventa ancora più accettato quando si considerano i tumori rari/difficili da trattare, in quanto poche risorse sono generalmente assegnate a questi tumori.

Il 2 ottobre 2020 la FDA ha approvato l'uso degli inibitori del checkpoint immunitario Ipilimumab/Nivolumab come trattamento di prima linea per i pazienti adulti con MPM non resecabile, sulla base dei risultati del CHECKMATE-743 (CM-743) sperimentazione clinica ( Scherpereel A. et al 2020).

Si è visto che comporta la riduzione del 26% del rischio di morte per i pazienti oncologici rispetto al solo trattamento chemioterapico, confermando il raggiungimento dell'obiettivo: una sopravvivenza globale superiore.

L'immunoterapia passiva mediante la somministrazione di anticorpi monoclonali presenta però dei limiti. Il mesotelioma pleurico maligno, come la maggior parte dei tumori, comprende molteplici sottotipi istologici (epitelioide, sarcomatoide e bifasico) che non sempre rispondono allo stesso modo ai farmaci o alle terapie oncologiche classiche. I pazienti sottoposti agli anticorpi monoclonali che hanno beneficiato in assoluto della nuova terapia sono stati i pazienti con mesotelioma di tipo sarcomatoide e bifasico. Non è stato raggiunto lo stesso risultato nei pazienti affetti da mesotelioma pleurico di tipo epitelioide che ricordiamo essere il più comune.

Questi risultati, seppur "contenuti", rappresentano un importante punto di partenza per la cura mesotelioma pleurico maligno. Con la nuova opzione di trattamento, oltre a cambiare l'approccio terapeutico rimasto invariato per più di 16 anni, si apportano miglioramenti significativi della sopravvivenza globale.

## **2.7 Impatto finanziario**

Attualmente vi è un'esigenza critica di un adeguato bilanciamento tra l'impatto finanziario dei nuovi farmaci antitumorali e il loro effettivo beneficio per i pazienti.

È necessario bilanciare il rapporto costi/benefici sia per i pazienti che per gli operatori sanitari.

Nel corso degli ultimi anni la progettazione e l'analisi delle sperimentazioni cliniche sono state oggetto di esame soprattutto a causa del crescente numero di nuovi trattamenti approvati unito alla necessità di comprenderne l'effettivo impatto clinico ed economico.

Non c'è dubbio che tali trattamenti in questa era di oncologia di precisione hanno il potenziale per migliorare notevolmente gli esiti clinici di distinti sottogruppi di pazienti , dato il costo crescente di questi farmaci sarebbe opportuno che la loro approvazione nella pratica clinica venga concessa solo quando mostrano un impatto comprovato sia clinicamente che economicamente (Mutti L. et al 2022) .

In precedenza, nel 2011, la Oncology Commission of Lancet ha dichiarato: “ la professione e l'industria del cancro dovrebbero assumersi la responsabilità e non accettare una base di prove al di sotto degli standard e un'etica di piccolissimi benefici a qualunque costo; piuttosto, abbiamo bisogno di fornire un processo equo e un valore reale dalle nuove tecnologie ", per ottenere valutazioni affidabili e quantitative dei risultati e dei costi sanitari, sia per l'equità che per l'accessibilità economica . In particolare, le combinazioni ICI come Ipi/Nivo superano la soglia di disponibilità a pagare dal punto di vista dei contribuenti statunitensi per il trattamento di MPM . Per il rapporto costo-efficacia incrementale (ICER) di \$ 372.414,28/QALY e ICER di \$

475.677/QALY rispettivamente per la combinazione ICI recentemente approvata in MPM.

Abbiamo bisogno di ulteriori screening preclinici di qualsiasi nuovo trattamento proposto per il cancro, nonché un maggiore rigore metodologico nelle statistiche degli studi e un'analisi del rapporto costo/efficacia per garantire la migliore efficacia per i nostri pazienti e la sostenibilità per i sistemi sanitari.

### **3 MODELLI PRE-CLINICI NELLO SVIUPPO DEL MESOTEIOMA**

Modelli pre-clinici accurati sono fondamentali per la scoperta di nuove terapie e lo sviluppo di una medicina personalizzata.

Di conseguenza, è stato investito molto impegno nella creazione di linee cellulari prima bidimensionali (2D) (cellule cresciute come colture 2D piatte) da tumori MPM primari e versamenti pleurici e poi sono stati sviluppati modelli tridimensionali (3D) in vitro più complessi :gli Organoidi.

## 4. ORGANOIDI

Gli organoidi sono una struttura 3D in vitro "simile a un organo" derivata dal tessuto tumorale del paziente (liquido pleurico o biopsia) che imita fedelmente la biologia e la complessa architettura del cancro e supera in gran parte i limiti di altri modelli esistenti. Esistono ora diversi metodi per generare organoidi derivati dal paziente PDO, tra cui la coltura basata su Matrigel, la coltura in sospensione e la coltura su chip. La maggior parte degli organoidi del cancro umano potrebbe essere prodotta utilizzando Matrigel, che è un idrogel a 24–37 °C e un liquido a 0–4 °C. (Anthony Dominijanni et al 2020).

Gli organoidi richiedono campioni biologici di tessuto dal paziente, in quanto consentono di personalizzare e rendere significativi i risultati quantitativi su base individuale, fornendo così dati clinicamente rilevanti e predittivi che possono essere utilizzabili per migliorare i risultati del paziente (Mahesh Devarasett et al, 2018).

Questo modello tumorale di nuova generazione consente l'avanzamento degli studi utilizzando ambienti 3D rispetto alle tradizionali colture bidimensionali (2D), che possono essere limitanti quando si cerca di replicare la fisiologia a livello tissutale.

Gli organoidi hanno consentito lo studio individuale dei tipi di tessuto rilevanti per comprendere meglio la risposta ai composti farmacologici e alle tossine in relazione alla dose e al tempo (Andrea Mazzocchi et al 2020).



## 4.1 MEDICINA DI PRECISIONE

L'uso degli organoidi viene esplorato anche nelle applicazioni della medicina di precisione.

La medicina di precisione può essere definita come diagnosi e trattamento individualizzato che utilizza strategie diagnostiche e terapeutiche mirate a caratteristiche genetiche, proteomiche e fenotipiche specifiche del paziente o della malattia (Alfonso Baldi et al 2020). Tali innovazioni sono diventate vitali per il progresso della prognosi, della diagnosi e del trattamento orientati al paziente. Gli organoidi sono diventati uno strumento all'interno degli sforzi della medicina di precisione per una serie di motivi; ad esempio, richiedono un numero minimo di cellule per replicare il microambiente in vivo e possono essere utilizzate per molte applicazioni di precisione per determinare specifici esiti di cellule primarie e pazienti .

Finora, sono stati sviluppati pochi modelli organoidi personalizzati orientati al paziente per lo studio del comportamento della malattia o della loro risposta a stimoli esterni.

Gli organoidi possono essere specifici per il paziente e consentire modelli personalizzati della malattia e del trattamento. Tali applicazioni includono la diagnostica della malattia e la previsione del comportamento cellulare, test e selezione personalizzati dei farmaci e rigenerazione dei tessuti.

La medicina di precisione può riguardare ampiamente metodi, tecniche e analisi che producono risultati esatti per i singoli pazienti e il loro stato patologico. Tali studi non generalizzano più la malattia, ma cercano di comprendere più precisamente il suo comportamento e la risposta al trattamento a beneficio del paziente e ottenere una maggiore comprensione della malattia

Gli organoidi creano un'opportunità unica per lo studio dello sviluppo della malattia, del comportamento e della risposta terapeutica, nonché per il progresso delle applicazioni della medicina personalizzata (Mahesh Devarasett et al, 2018).

La creazione di organoidi da biopsie tissutali e tumorali del paziente fornirà opportunità per approcci personalizzati specifici per il paziente per la valutazione dell'efficacia del trattamento in laboratorio prima che il trattamento venga applicato.

Sebbene gli organoidi siano stati prodotti e utilizzati con successo in molti tumori, tra cui il cancro del colon, il cancro gastrointestinale, il cancro del pancreas, il cancro alla prostata, il cancro della vescica, il cancro al fegato, il cancro al seno e il cancro al cervello, lo sviluppo degli organoidi MPM è ancora agli inizi.

## **5. SCOPO DELLO STUDIO**

Nell'era dell'oncologia di precisione gli organoidi derivati dal paziente (patient-derived organoids, PDOs) sono stati proposti come modello preclinico per l'ottimizzazione del trattamento prima dell'inizio della terapia. Pertanto, lo scopo dello studio è quello di valutare la fattibilità della formazione di organoidi da pazienti affetti da MPM, valutare le loro caratteristiche fenotipiche, e successivamente quello di valutare il loro uso nello screening farmacologico e risposta alla terapia.

## **5.1 Materiali e metodi**

### **5.1.1 Pazienti**

I pazienti sottoposti a toracosopia o toracotomia per sospetto MPM sono stati reclutati da gennaio 2021 a novembre 2022 presso l'Unità di Malattie Respiratorie dell'Ospedale Universitario-Regionale "Ospedali Riuniti" di Ancona, Italia. Il consenso informato è stato ottenuto da tutti i soggetti e sono stati raccolti campioni di EP e biopsia. La diagnosi patologica è stata eseguita su biopsie pleuriche ottenute mediante toracosopia o toracotomia. I tumori sono stati classificati come epiteliali (MPM-E), bifasici (MPM-B) e sarcomatoidi (MPM-S). Secondo la diagnosi, sono stati arruolati solo gli individui con MPM. I criteri di esclusione erano la presenza o il sospetto di qualsiasi malattia infettiva, precedente intervento chirurgico radicale, radioterapia e chemioterapia per MPM. Le caratteristiche demografiche e patologiche dei soggetti sono riassunte nella **Tabella 1**.

Lo studio è stato condotto secondo la Dichiarazione di Helsinki e i campioni sono stati elaborati sotto approvazione. Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'Azienda Ospedaliera Universitaria delle Marche, N. 51/DG 05/02/2009, Italia.

### **5.1.2 Cultura PDO-MPM**

Durante la toracosopia, il liquido pleurico (LP) e tessuto tumorale sono stati raccolti e trasferiti freschi al laboratorio per lo sviluppo dell'organoide tumorale. Il LP (tra 500 ml e 1L) è stato immediatamente centrifugato a 1600 rpm, il pellet è stato lavato con PBS e, dopo la lisi dei globuli rossi, è stato ottenuto un pellet di cellule.

Il tessuto (5-6 pezzi di tessuto da 1 mm<sup>3</sup>) è stato digerito meccanicamente ed enzimaticamente mediante collagenasi (1 mg/ml) in terreno DMEM/F12 (Gibco) a 37 °C per 1 ora sotto agitazione intermittente. Dopo l'incubazione, i frammenti tessutali sono stati ripetutamente triturati pipettando energeticamente e successivamente passati in filtri cellulari da 100 µm (BD Falcon, CA, USA).

Le cellule ottenute sia da LP che da tessuto tumorale sono state risospese in 500 µl di terreno RPMI completato e contate. Approssimativamente, 10<sup>6</sup> cellule sono state piastrate in una piastra da 24 pozzetti in gocce di 30 µl di Geltrex (Gibco) e, dopo la gelificazione, è stato aggiunto al pozzetto il mezzo RPMI completo. Gli organoidi sono stati coltivati per oltre 1 mese aggiungendo o cambiando terreno fresco ogni 4 giorni.

## **5.2 Trattamenti farmacologici**

Gli organoidi derivati dal paziente da MPM sono stati trattati con cisplatino/pemetrexed (Cis/PeMtx, 30  $\mu$ M) o con pembrolizumab (Pemb, 10  $\mu$ g/ml) in co-cultura con cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs,  $10^6$ ) ottenute da donatori sani. Sono stati eseguiti due cicli di trattamento con intervallo di tre giorni da un ciclo e l'altro. Dopo trattamento gli organoidi trattati e non trattati (controlli) sono stati raccolti, fissati in formalina o conservati a  $-80^{\circ}\text{C}$  per ulteriori analisi.

### **5.2.1 Istologia e immunoistochimica**

I tessuti e gli organoidi sono stati fissati in formaldeide al 4%. Dopo disidratazione e inclusine in paraffina, sono state eseguite sezioni istologiche da 2.5  $\mu$ m e colorate mediante ematossilina/eosina (EE). Per la colorazione immunoistochimica (IHC), le sezioni istologiche (2.5  $\mu$ m) sono state incubate con anticorpi primari tra cui anti-AE1/AE3 (Dako, CA, USA), anti-D2-40 (Dako, CA, USA), anti-PDL1 (Dako, CA, USA), anti-STAT3 (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-8-oxo-dG (Trevigen), anti- $\gamma$ H2AX (Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-H2AX (Santa Cruz Biotechnology, USA). Le sezioni sono state successivamente incubate con anticorpi secondari (Dako, CA, USA) e visualizzate utilizzando il kit di rilevamento DAB universale ultraView (Dako, CA, USA). I nuclei sono stati controcolorati con ematossilina. Le immagini sono state acquisite su un microscopio ottico (Zeiss, AxioCam MRc5; ingrandimento 600 x). Tutte le sezioni e la colorazione sono state valutate da un patologo esperto di mesotelioma maligno (FB).

### **5.2.2 Saggio TUNEL**

Le sezioni di tessuto sono state analizzate per il test TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit, Roche, Mannheim, Germania) seguendo le istruzioni della casa produttrice. La positività TUNEL (verde fluorescente) è stata considerata un marker di apoptosi. Le immagini sono state visualizzate in un microscopio ottico (Zeiss, AxioCam MRc5, ingrandimento  $\times 60$ ).

### **5.2.3 Analisi di microarray**

L'RNA totale è stato estratto da organoidi trattati e non trattati con chemio-immunoterapia utilizzando il kit PerfectPure RNA (5Prime, Amburgo, Germania) secondo le istruzioni del produttore. Il cDNA è stato sintetizzato utilizzando il kit RT2-First Strand (SA Biosciences, Frederick, MD, USA) e il profilo di espressione dei geni coinvolti nello stress ossidativo e morte cellulare è stato valutato mediante il sistema 'Human Stress and Toxicity PathwayFinder RT2 Profiler PCR Expression Array (PAHS-003 SABiosciences)'. L'espressione di 84 geni correlati allo stress e alla tossicità è stata valutata mediante qRT-PCR (Mastercycler EP Realplex, Eppendorf, Milano, Italia) utilizzando RT2 SYBR Green qPCR Master Mix (SABiosciences); 6 geni housekeeping, 3 geni di controllo per la qualità della retrotrascrizione e 3 geni di controllo per qPCR) sono stati inclusi nell'array. Tra i geni housekeeping testati, il GAPDH si distribuiva stabilmente tra i diversi gruppi di campioni (differenze nei valori Ct <1). I prodotti specifici del gene sono stati quindi normalizzati a GAPDH ed espressi come volte di espressione rispetto al controllo (Fold Change) ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ).

## 5.2.4 Analisi di arricchimento

I geni differenzialmente espressi sono stati elaborati per l'analisi di arricchimento. Le interazioni proteina-proteina (PPI) è stata costruita con il database online STRING e visualizzata utilizzando il software Cytoscape (3.9.1). L'analisi Gene Ontology (GO) con la correzione FDR (false Discovery rate) di Benjamini e Adchberg, (cut-off <0,05) è stata eseguita per identificare i geni coinvolti nei processi biologici, componenti cellulari e funzioni molecolari (nodi) che significativamente si modulavano in seguito al trattamento chemio- immuno-terapico. I dati sono stati analizzati mediante software David.

## 6 RISULTATI

### *Caratterizzazione dei pazienti e del fenotipo dei PDO*

Campioni di tessuto o liquido pleurico (LP) di sei pazienti MPM sono stati utilizzati per la formazione degli organoidi. Di questi campioni, due erano di sottotipo epitelioide e quattro bifasici. I pazienti avevano un'età media di  $83 \pm 8$  anni e soffrivano di malattia localmente avanzata. Nessuno dei pazienti MPM è stato sottoposto a intervento chirurgico o ha ricevuto terapia sistemica prima della raccolta del campione.

Utilizzando un protocollo di coltura degli organoidi, siamo stati in grado di formare tre colture PDO con un successo del 50%. Degli organoidi formati, due sono stati ottenuti da LP di pazienti con sottotipo epitelioide, mentre uno è stato ottenuto dalla biopsia di un paziente con istotipo bifasico (**Tabella 1**).

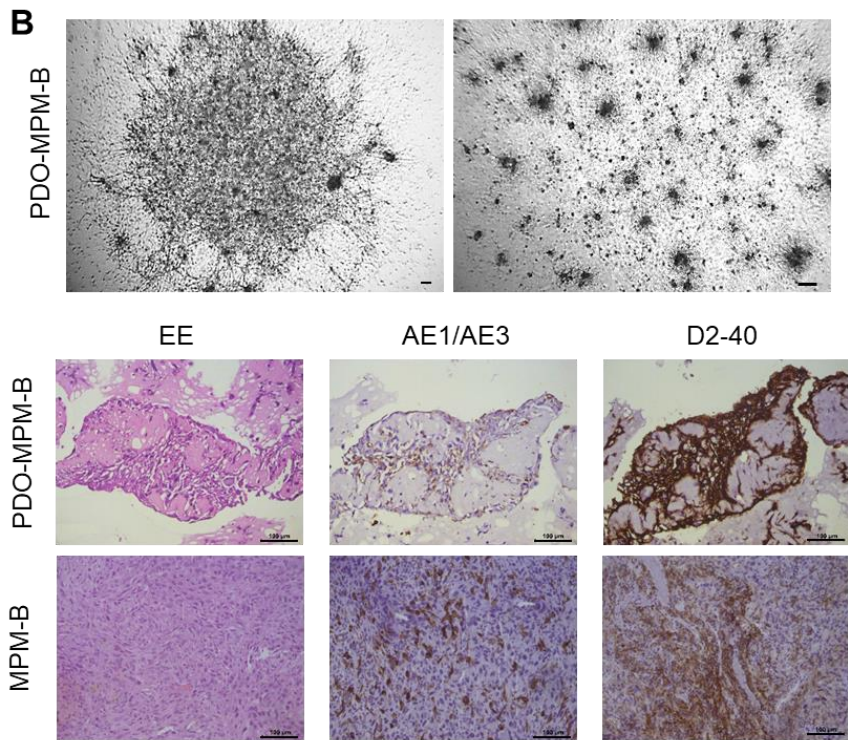
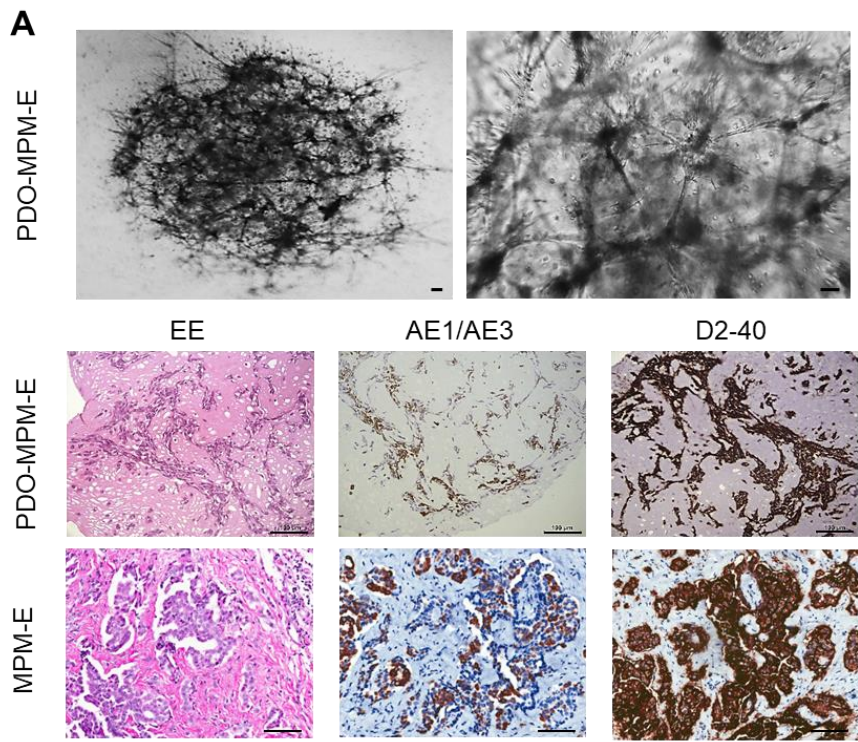
Pazienti	Sesso (M/F)	Età (anni)	Istotipo	Sorgente	Organoid
MPM-1	M	85	Epitelioide	LP	Si
MPM-2	F	83	Bifasico	LP	No
MPM-3	M	98	Bifasico	Biopsia	Si
MPM-4	M	75	Bifasico	LP	No
MPM-5	M	80	Bifasico	LP	No
MPM-6	F	79	Epitelioide	LP	SI

**Tabella 1.** *Caratteristiche demografiche e patologiche dei pazienti MPM*

Come mostrato nella **Figura 11**, le cellule raccolte dal LP di pazienti con istotipo epiteliale (MPM-E) e le cellule dissociate dal tessuto del paziente con istotipo bifasico (MPM-B) hanno formato organoidi dopo una settimana di coltura. In particolare, gli organoidi crescevano formando una struttura ramificata collegando diversi punti focali (foci neoplastici) ricordando la multi-focalità del MPM.

Allo scopo di valutare se gli organoidi mantenessero le caratteristiche istologiche del tessuto parentale, entrambi gli organoidi a diversi fenotipi sono stati valutati utilizzando la colorazione con ematossilina ed eosina (EE) e l'immunoistochimica (IHC). La colorazione EE ha rivelato varie strutture all'interno degli organoidi, tra cui cellule stromali allineate e gruppi di cellule tumorali con componenti stromali. L'analisi immunoistochimica ha mostrato che i PDO-MPM mostravano caratteristiche nettamente maligne con positività ai marcatori di MPM, quali le citocheratine AE1/AE3 e D2-40, come osservato nel tessuto tumorale parentale. Nel complesso, gli organoidi rispettavano morfologicamente l'istotipo del tessuto parentale.



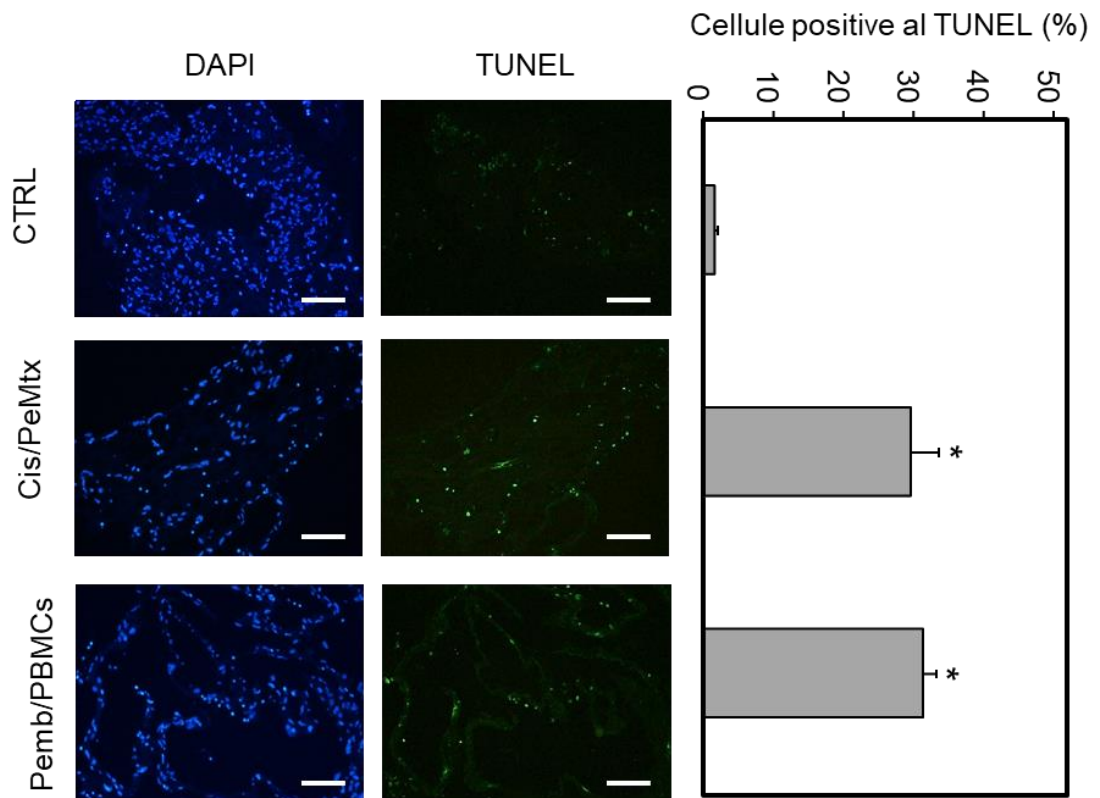


**Figura 11.** Valutazione istologica degli organoidi di MPM. Immagine rappresentativa al microscopio ottico (barra scala = 100  $\mu$ m e 200  $\mu$ m), colorazione con ematossilina/eosina (EE) e immunistochemica con anticorpi anti-AE1/AE3 e anti-D2-40 di organoide da MPM-E (A) e da MPM-B (B). Barra scala= 100  $\mu$ m.

## 7 RISPOSTA AL TRATTAMENTO

Allo scopo di valutare l'uso dei PDO-MPMs come surrogati tumorali per prevedere le risposte ai regimi di trattamento, abbiamo eseguito uno screening farmacologico su PDO-MPM ad istotipo bifasico. L'organoide è stato ottenuto da biopsia di un paziente MPM-B di 98 anni che non aveva avuto nessun tipo di trattamento. La suscettibilità farmacologica è stata valutata trattando il PDO-MPM-B con Cis/PeMtx (chemioterapia) e con pembrolizumab in co-coltura con PBMC (immunoterapia).

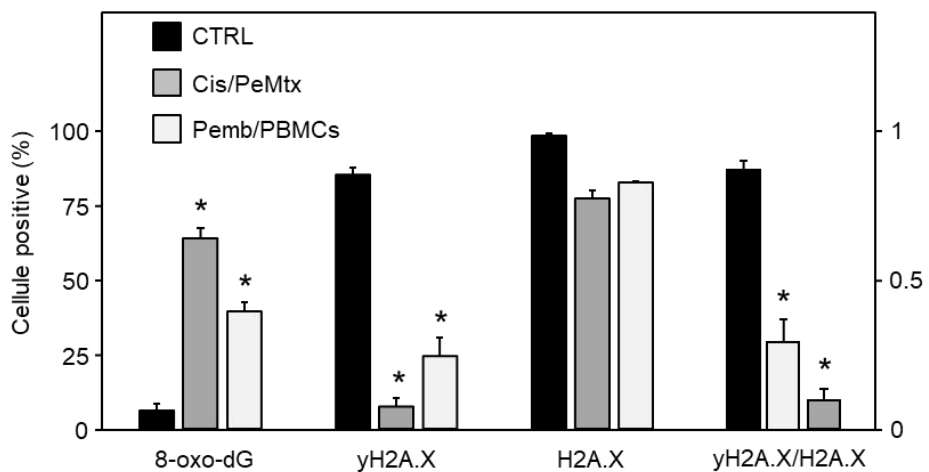
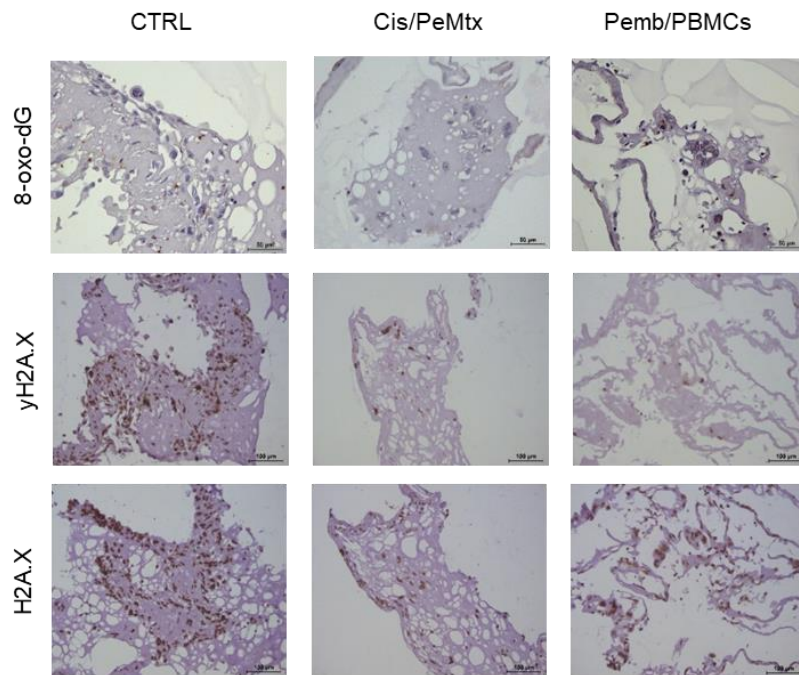
Come evidenziato dal saggio TUNEL, i due cicli di trattamento chemio ed immunoterapico hanno indotto circa il 30% della morte cellulare (**Figura 12**).



**Figura 12.** Valutazione della morte cellulare in PDO-MPM-B dopo trattamento con chemio e immunoterapia. L'organoide è stato trattato con cisplatino/pemetrexed (Cis/PeMtx, 30  $\mu$ M) o con pembrolizumab (Pemb, 10  $\mu$ g/ml) in co-coltura con cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs,  $10^6$ ) ottenute da donatori sani. Dopo due cicli di trattamento con intervallo di tre giorni da un ciclo e l'altro, è stata valutata la morte cellulare con il Tunel assay (i puntini flurescenti verdi rappresentano le cellule morte). La morte è stata espressa come percentuale di cellule positive al tunel sul numero totale delle cellule. Barra scala= 100  $\mu$ m. Il simbolo \* indica la significatività statistica PDO-MPM-B trattato vs non-trattato (controllo, CTRL).

Piuttosto che indurre una cospicua morte cellulare, entrambi i trattamenti hanno provocato un aumento della tossicità cellulare attraverso l'induzione di danni ossidativi al DNA. Elevati livelli della base guanina ossidata, 8-oxo-dG, sono stati trovati dopo i trattamenti con Cis/PeMtx e Premb/PBMCs (**Figura 13**).

La fosforilazione dell'istone H2AX su una serina (yH2AX) è stata valutata come marcatore delle rotture del doppio filamento del DNA (double strand breaks, DSBs). Come mostrato in **Figura 13**, i livelli di H2AX e la sua forma fosforilata attivata yH2AX erano altamente espressi nell'organoide a livello basale. Il trattamento chemio ed immunoterapico ha significativamente inibito dell'espressione della forma attivata (yH2AX).

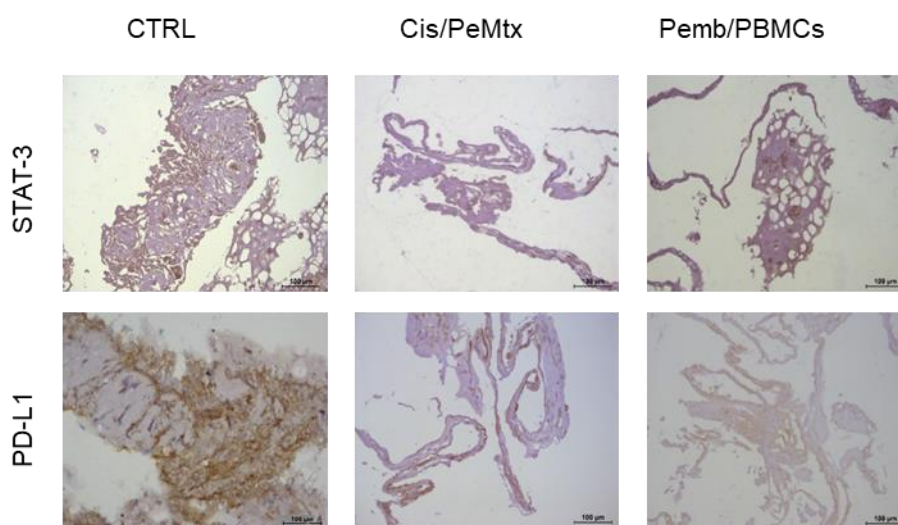


**Figura 13.** Risposta al danno al DNA (DNA Damage Response, DDR) in PDO-MPM-B trattato con chemio ed immunoterapia. L'organoide è stato trattato con cisplatino/pemetrexed (Cis/PeMtx, 30  $\mu$ M) o con pembrolizumab (Pemb, 10  $\mu$ g/ml) in co-coltura con cellule mononucleate del sangue periferico (PBMCs, 106) ottenute da donatori sani. Dopo due cicli di trattamento con intervallo di tre giorni da un ciclo e l'altro, è stata valutata l'espressione della base guanina ossidata (8-oxo-dG), l'istone H2A.X e la sua forma attiva fosforilata  $\gamma$ H2A.X. Barra scala= 50 o 100  $\mu$ m. Il simbolo



\* indica la significatività statistica PDO-MPM-B trattato vs non-trattato (controllo, CTRL).

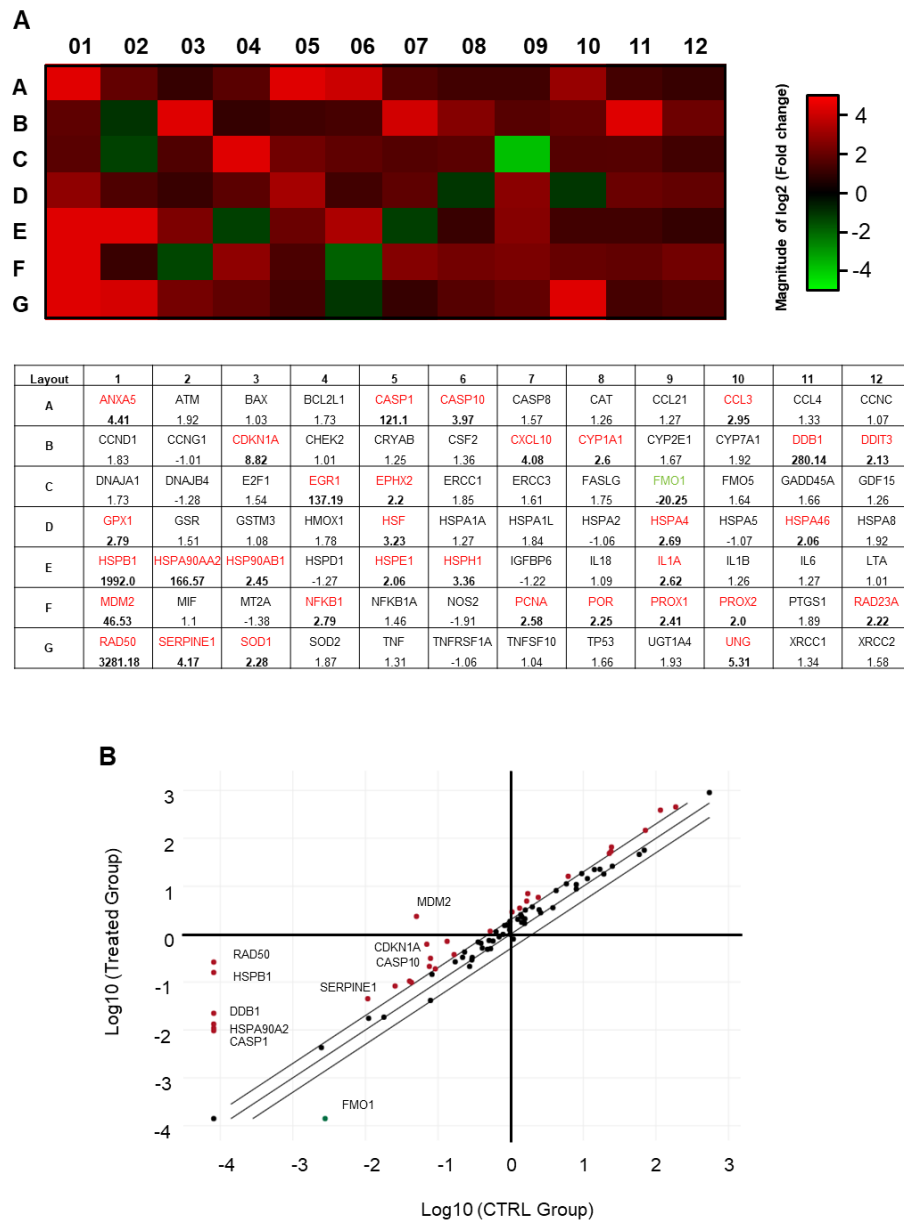
La risposta immunitaria antitumorale è stata valutata analizzando l'espressione di STAT-3 (signal transducer and activator of transcription-3) e di PDL-1. Il PD-L1 è una proteina espressa sulla superficie del tumore e regola la risposta immunitaria: legandosi al recettore PD1 dei linfociti CD4/CD8 regola la tolleranza immunitaria del tumore. STAT-3 è stata trovata altamente espressa nelle cellule tumorali all'interno dell'ambiente PDO-MPM. Il trattamento immunologico ha ridotto l'espressione di STAT-3, come risultato dell'inibizione delle vie di segnalazione infiammatoria, che a sua volta ha ridotto l'espressione della trascrizione del PDL-1 (**Figura 14**).



**Figura 14.** Valutazione della via immunologica in organoidi derivati dal paziente da MPM bifasico (PDO-MPM-B) trattato con chemio e immunoterapia. PDO-MPM sono stati trattati con cisplatino/pemetrexed (Cis/Pemtx, 30 µM) o con pembrolizumab (10 µg/ml) in co-coltura con PBMC ( $10^6$ ) da donatori sani (Pemb/PBMC), due cicli di trattamenti con intervallo di tre giorni da un ciclo e l'altro. Le sezioni tumorali fissate

*in formalina e incluse in paraffina (2,5  $\mu$ m) sono state incubate con anti-STAT-3 e anti-PDL-1. Le cellule positive sono state quantificate ed espresse in percentuale sul numero totale di cellule. Barra scala = 100  $\mu$ m.*

Successivamente, l'espressione dei geni coinvolti nello stress ossidativo e nella morte cellulare è stata valutata nell'organoide prima e dopo i trattamenti chemio ed immunoterapici. Il PDO-MPM-B trattato con due cicli di Cis/PeMtx seguiti da Premb/PBMC ha indotto l'espressione di geni coinvolti nella riparazione del DNA, stress cellulare e tossicità (**Figura 15**).

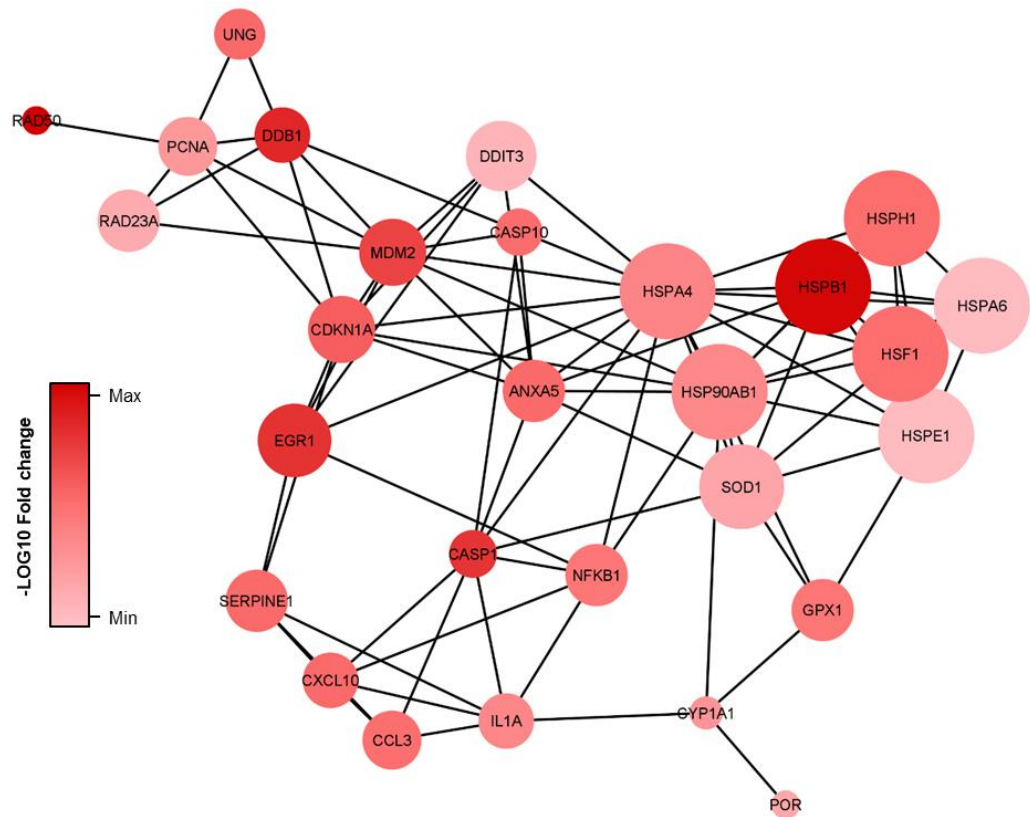


**Figura 15.** Valutazione dell'espressione dei geni coinvolti nello stress ossidativo e morte cellulare in organoidi derivati dal paziente da MPM bifasico (PDO-MPM-B) trattati con chemio e immunoterapia. A) Heatmap dell'espressione dei geni significativamente espressi in PDO-MPM-B ( $n = 3$ ) trattato con Cis/PeMtx ( $30 \mu\text{M}$ ) seguito da pembrolizumab ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) in co-cultura con PBMC ( $10^6$ ) (Pemb/PBMCs). I geni sopra e sotto espressi dopo il trattamento (Fold change, FC) sono mostrati



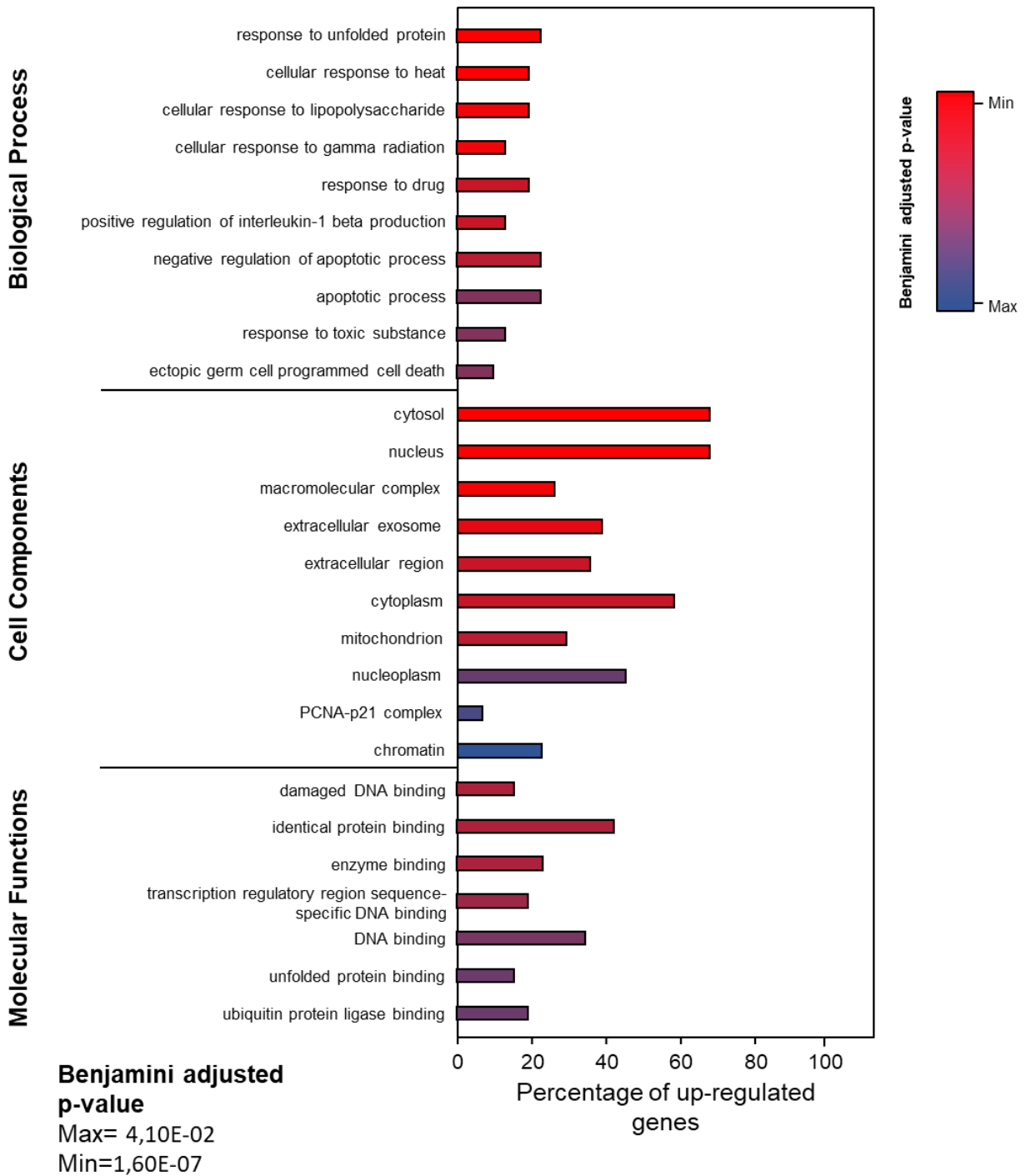
*rispettivamente in rosso e verde, con i geni statisticamente significativi evidenziati in rosso. L'analisi dei microarray e la normalizzazione sono state effettuate con il software RT2 Profiler PCR Array Analysis versione 3.5 (SABiosciences). B) grafici a dispersione dell'espressione genica differenziale confrontando PDO-MPM-B non trattato e trattato. I geni sono rappresentati da punti (colore rosso: sovra-regolazione; colore verde: sotto-regolazione). Il grafico mostra i geni con un cambiamento di espressione di almeno due volte rispetto al controllo e con un  $p < 0.05$ .*

Allo scopo di identificare le potenziali funzioni biologiche dei geni differenzialmente espressi, è stata eseguita l'analisi di arricchimento. Sulla base del database, sono stati identificati sottogruppi di geni altamente interconnessi tra loro che includono la proteina da shock termico (HSP), i fattori DNA-DSB e le chemochine (**Figura 16**).



**Figura 16.** Rete di interazione proteina-proteina (PPI). Analisi dell'interazione gene-gene dei geni significativamente espressi in modo differenziato che mostra le pathway molecolari deregolate. I colori rappresentano il Fold Change-LOG10, mentre le dimensioni dei nodi indica il grado di connettività.

L'analisi di arricchimento Gene Ontology (GO) ha mostrato che le principali funzioni molecolari e la composizione cellulare coinvolte erano la risposta alle proteine danneggiate, a sostanze tossiche, a processi apoptotici, ed il legame al DNA/DNA danneggiato a livello di cromatina e nucleoplasma (**Figura 17**).



**Figura 17.** *Classificazione funzionale Gene Ontology (GO). Processi biologici più significativamente associati a geni differenzialmente espressi dopo i trattamenti. Le barre rappresentano il numero di geni coinvolti in un determinato processo biologico, componenti cellulari, funzioni molecolari senza tener conto se il gene è sotto o sovraespresso nel confronto*

*Figura 6. Classificazione funzionale Gene Ontology (GO). Processi biologici più significativamente associati a geni differenzialmente espressi dopo i trattamenti. Le barre rappresentano il numero di geni coinvolti in un determinato processo biologico, componenti cellulari, funzioni molecolari senza tener conto se il gene è sotto o sovraespresso nel confronto.*

## **8 DISCUSSIONE**

Recentemente, tra i nuovi modelli preclinici, gli organoidi hanno attirato grande attenzione per la loro capacità di mimare in vivo la struttura e l'eterogeneità cellulare del tessuto (Shamseddin et al., 2020; Gao et al., 2022).

Gli organoidi del mesotelioma peritoneale maligno epitelioide sono stati descritti per la prima volta da Mazzocchi et al, 2018. Utilizzando biopsie tumorali rimosse chirurgicamente da pazienti affetti da mesotelioma peritoneale, è stata eseguita una piattaforma organoide per i test genetici e per lo screening di regimi chemioterapici standard utilizzati clinicamente per il mesotelioma .

Ad oggi la tecnologia degli organoidi non è stata ancora applicata al mesotelioma maligno della pleura. Nel presente studio, abbiamo dimostrato la fattibilità nella formazione di organoidi da pazienti con MPM e il loro utilizzo nello screening dei farmaci usati in terapia. Utilizzando campioni biologici di mesotelioma, come LP e biopsie di due istotipi di mesotelioma (epiteliale e bifasico), è stato ottenuto un modello organoide per lo screening dei regimi di chemioterapia e immunoterapia standard. Abbiamo osservato che il successo nell'ottenere l'organoide differiva in base campione biologico utilizzato. Il PDO-MPM epiteliale si ottiene facilmente da LP, mentre il PDO-MPM bifasico è meglio ottenuto dal tessuto tumorale. Le caratteristiche fenotipiche dei diversi istotipi influenza il rilascio di cellule tumorali nel liquido pleurico (Brcic et al., 2020). Nel sottotipo bifasico le componenti epitelioide e sarcomatoidi crescono in modo diffuso e infiltrativo, mentre nell'istotipo epitelioide le cellule crescono nella superficie pleurica . Pertanto, rispetto all'istotipo bifasico, il sottotipo epiteliale è probabilmente più incline a rilasciare cellule tumorali nel LP.

Entrambi gli organoidi di MPM-E e MPM-B hanno mantenuto l'architettura istologica e il profilo di espressione dei biomarcatori tipici dei tumori parentali corrispondenti. Per valutare l'uso di PDO-MPM come strumento di medicina di precisione, è stato eseguito uno screening farmacologico trattando gli organoidi con cisplatino/pemetrexed e con l'immunoterapia, quest'ultima eseguita trattando il PDO-MPM con pembrolizumab in co-coltura con PBMCs derivati da donatori sani.

Come aspettato, gli PDO-MPMs erano resistenti ai farmaci chemioterapici e immunoterapici: entrambi i trattamenti hanno indotto solo il 30% della morte cellulare. Analizzando le risposte degli organoidi alla terapia, abbiamo osservato una risposta protettiva al danno del DNA (DDR).

I foci  $\gamma$ H2AX erano altamente espressi in PDO-MPM, come conseguenza della forte instabilità genomica del tumore. L'instabilità del genoma è uno dei meccanismi di resistenza ai farmaci. Il danno al DNA (8-oxo-dG) indotto dai trattamenti ha attivato una risposta di riparazione del DNA che ha contribuito ad una forte riduzione della formazione di foci  $\gamma$ H2AX. Man mano che i DSB venivano riparati, i foci  $\gamma$ H2AX scomparivano come conseguenza dell'avvenuta riparazione del DNA (Mirzayans et al., 2006). L'alterata espressione di geni coinvolti nella riparazione del DNA, come la proteina legante il DNA specifica per il danno 1 (DDB1), la proteina di riparazione dell'escissione dei nucleotidi (RAD23A), la proteina di riparazione del DSB (RAD50), confermano ulteriormente il meccanismo protettivo indotto dalla terapia che riconosce le lesioni del DNA e attiva una serie di meccanismi di riparazione del DNA (DDR).

Il processo DDR innesca diverse vie immunitarie, tra cui l'attivazione di STAT3 (Luo et al., 2021). Alta espressione di STAT3 è stata trovata nei PDO-MPM. Sebbene le

colture di organoidi non includano cellule immunitarie, i PDO-MPM hanno mantenuto l'espressione di PD-L1. L'immunoterapia non solo ha ridotto significativamente l'espressione di STAT3, ma ha anche ridotto i livelli di PD-L1. La relazione tra inibizione di STAT3, soppressione di PD-L1 e induzione dell'apoptosi è stata precedentemente trovata nelle cellule HCT-15 (Jahangiri et al., 2020). STAT3 è una proteina iperattiva in molti tumori umani, può eludere il riconoscimento di errori e danni al DNA, aggirando così un checkpoint critico del ciclo cellulare e una proliferazione cellulare incontrollata (Koganti et al., 2014). Inoltre, STAT3 svolge un ruolo importante nell'inibire l'espressione di importanti regolatori dell'attivazione immunitaria e promuovere la produzione di fattori immunosoppressivi (Huynh et al., 2018). Pertanto, il targeting della via di segnalazione STAT3 è emerso come una promettente strategia terapeutica (Zou et al., 2020).

## **9 CONCLUSIONI**

Un limite dei modelli PDO è la mancanza di un microambiente tumorale che includa cellule stromali e cellule immunitarie (Jenkins et al., 2018). Pertanto, per studiare l'interazione tra le cellule tumorali e il microambiente, è necessario un sistema di co-coltura con cellule immunitarie/stromali.

In questo studio, abbiamo ottenuto PDO che rispettavano le caratteristiche istologiche dei due sottotipi comuni di MPM. Abbiamo utilizzato un sistema di co-coltura con linfociti e PDO-MPM per valutare l'efficacia dell'inibitore del checkpoint immunitario, suggerendo che il sistema PDO-MPM potrà rappresentare una piattaforma utile in futuro per lo screening dei farmaci e per la valutazione delle terapeutiche.

## *BIBLIOGRAFIA*

- Alfonso Baldi, Academic Editor Organoids as a Model for Precision Medicine in Malignant Pleural Mesothelioma: Where Are We Today? 2020.
- Alley EW, Lopez J, Santoro A, Morosky A, Saraf S, Piperdi B, van Brummelen E. 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;18:623–630.
- AMIANTO NATURALE E AMBIENTI DI LAVORO. Indicazioni operative per la prevenzione, Pubblicazione Inail, 2021.
- Andrea Mazzocchi, Mahesh Devarasetty, Samuel Herberg, William J. Petty, Frank Marini, Lance Miller, Gregory Kucera, David K. Dukes, Jimmy Ruiz Aleksander Skardal, Shay Soke Pleural Effusion Aspirate for use in 3D Lung Cancer Modeling and Chemotherapy Screening 2018.
- Andrea R. Mazzocchi, Shiny A. P. Rajan, Konstantinos I. Votanopoulos, Adam R. Hall, and Aleksander Skardal *In vitro* patient-derived 3D mesothelioma tumor organoids facilitate patient-centric therapeutic screening 2018.
- Annabi N, Selimovic S, Acevedo Cox JP, Ribas J, Afshar Bakooshli M, Heintze D, Weiss AS, Cropek D, Khademhosseini A, Hydrogel-coated microfluidic channels for cardiomyocyte culture, *Lab Chip* 2013.
- Anthony Dominijanni, Andrea Mazzocchi, Ethan Shelkey, Steven Forsyth, Mahesh Devarasetty, Shay Soker Bioengineered Tumor Organoids 2020.



- Baas P, Scherpereel A, Nowak AK, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab in unresectable malignant pleural mesothelioma (CheckMate 743): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2021;397:375-86. 10.1016/S0140-6736(20)32714-8.
- Baas P, Scherpereel A, Nowak AK, et al. First-line nivolumab plus ipilimumab in unresectable malignant pleural mesothelioma (CheckMate 743): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2021;397:375-86. 10.1016/S0140-6736(20)32714-8.
- Baas P., Scherpereel A., Nowak A.K., Fujimoto N., Peters S., Tsao A.S., Mansfield A.S., Popat S., Jahan T., Antonia S., et al. First-line nivolumab plus ipilimumab in unresectable malignant pleural mesothelioma (CheckMate 743): A multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2021.
- Bibby AC, Tsim S, Kanellakis N, et al.. Malignant pleural mesothelioma: an update on investigation, diagnosis and treatment. *Eur Respir Rev* 2016.
- BONIFICA DA AMIANTO: ITER PROCEDURALI E FIGURE PROFESSIONALI COINVOLTE. Istruzioni operative Inail per la tutela dei lavoratori e degli ambienti di vita, Pubblicazione Inail, 2020.
- Brcic L, Kern I. Clinical significance of histologic subtyping of malignant pleural mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(3):924-933.  
doi:10.21037/tlcr.2020.03.38.
- Delgermaa V, Takahashi K, Park EK. Les décès mondiaux par mésothéliome rapportés à l'Organisation mondiale de la Santé entre 1994 et 2008. *Bull World Health Organ* 2011.
- Drost J., Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat. Rev. Cancer*. 2018.

- Gao Y, Kruithof-de Julio M, Peng RW, Dorn P. Organoids as a Model for Precision Medicine in Malignant Pleural Mesothelioma: Where Are We Today? *Cancers (Basel)*. 2022;14(15):3758. doi: 10.3390/cancers14153758.
- Gerard J. Chu<sup>1</sup>, Nico van Zandwijk and John E. J. Rask The Immune Microenvironment in Mesothelioma: Mechanisms of Resistance to Immunotherapy 2019.
- Glen Reid<sup>1</sup>, Thomas G. Johnson and Nico van Zandwijk Manipulating microRNAs for the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma: Past, Present and Future 2020.
- Huynh J, Chand A, Gough D, Ernst M. Therapeutically exploiting STAT3 activity in cancer using tissue repair as a road map. *Nature Reviews Cancer* 2018;1:82–96.
- IL LIBRO BIANCO DELLE MORTI DI AMIANTO, Quaderni tematici dell'Osservatorio Nazionale sull'Amianto, edizione 2022.
- Jahangiri A, Dadmanesh M, Ghorban K. STAT3 inhibition reduced PD-L1 expression and enhanced antitumor immune responses. *J Cell Physiol*. 2020;235(12):9457-9463. doi: 10.1002/jcp.29750.
- Janes S.M., Alrifai D., Fennell D.A. Perspectives on the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma. *N. Engl. J. Med.* 2021;
- Jenkins, R. W. et al. Ex vivo profiling of PD-1 blockade using organotypic tumor spheroids. *Cancer Discov.* 8, 196–215 (2018).
- Jensen C., Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front. Mol. Biosci.* 2020.
- Koganti S, Hui-Yuen J, McAllister S, Gardner B, Grasser F, Palendira U, Tangye SG, Freeman AF, Bhaduri-McIntosh S. STAT3 interrupts ATR-Chk1 signaling to allow

- oncovirus-mediated cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Apr 1;111(13):4946-51. doi: 10.1073/pnas.1400683111.
- Lawek Berzenji , Paul E Van Schil , Laurens Carp The eighth TNM classification for malignant pleural mesothelioma 2018.
  - LE MALATTIE ASBESTO CORRELATE. *Analisi statistica*, Pubblicazione Inail, 2022
  - Luo Y, Lu Y, Long B, Lin Y, Yang Y, Xu Y, Zhang X, Zhang J. Blocking DNA Damage Repair May Be Involved in Static (STAT3 Inhibitor)-Induced FLT3-ITD AML Cell Apoptosis. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Mar 16;9:637064. doi: 10.3389/fcell.2021.637064.
  - Mahesh Devarasetty†, Andrea R Mazzocchi,†, Aleksander Skardal Applications of bioengineered 3D tissue and tumor organoids in drug development and precision medicine: current and future 2018.
  - Mary Beth Beasley , Françoise Galateau-Salle , Sanja Dacic Pleural mesothelioma classification-update and challenges 2022.
  - Mazzocchi A. R., Rajan S. A. P., Votanopoulos K. I., Hall A. R., Skardal A. 2018.
  - Meyerhoff RR, Yang C-FJ, Speicher PJ, et al.. Impact of mesothelioma histologic subtype on outcomes in the surveillance, epidemiology, and end results database. *J Surg Res* 2015.
  - Mirzayans R, Severin D, Murray D. Relationship between DNA double-strand break rejoining and cell survival after exposure to ionizing radiation in human fibroblast strains with differing ATM/p53 status: implications for evaluation of clinical radiosensitivity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2006; 66:1498–1505.
  - Monaco F, De Conti L, Vodret S, Zanotta N, Comar M, Manzotti S, Rubini C, Graciotti L, Fulgenzi G, Bovenzi M, Baralle M, Tomasetti M, Santarelli L. Force-feeding

- malignant mesothelioma stem-cell like with exosome-delivered miR-126 induces tumour cell killing. *Transl Oncol.* 2022;20:101400. doi: 10.1016/j.tranon.2022.101400.
- Monaco F, Gaetani S, Alessandrini F, Tagliabracci A, Bracci M, Valentino M, Neuzil J, Amati M, Bovenzi M, Tomasetti M, Santarelli L. Exosomal transfer of miR-126 promotes the anti-tumour response in malignant mesothelioma: Role of miR-126 in cancer-stroma communication. *Cancer Lett.* 2019;463:27-36. doi: 10.1016/j.canlet.2019.08.001.
  - Nakajima EC, Vellanki PJ, Larkins E, Chatterjee S, Mishra-Kalyani PS, Bi Y, et al. FDA approval summary: nivolumab in combination with ipilimumab for the treatment of unresectable malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2022hang W., Zhao X. Advances in the diagnosis, Alley EW, Lopez J, Santoro A, Morosky A, Saraf S, Piperdi B, van Brummelen E. 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;18:623–630.
  - Nakajima EC, Vellanki PJ, Larkins E, Chatterjee S, Mishra-Kalyani PS, Bi Y, et al. FDA approval summary: nivolumab in combination with ipilimumab for the treatment of unresectable malignant pleural mesothelioma. *Clin Cancer Res.* 2022
  - Napolitano A., Carbone M. Malignant Mesothelioma: Time to Translate? *Trends Cancer.* 2016.
  - Noushin Nabavi, Jingchao Wei, Dong Lin, Colin C. Collins, Peter W. Gout, and Yuzhuo Wang Pre-clinical Models for Malignant Mesothelioma Research: From Chemical-Induced to Patient-Derived Cancer Xenografts 2018.
  - OPEN DATA INAIL, disponibili sul sito [www.inail.it](http://www.inail.it).

- Pietro Apostoli, Paolo Boffetta, Massimo Bovenzi, Pier Luigi Cocco, Dario Consonni, Alfonso Cristaudo, Gianluigi Discalzi, Andrea Farioli, Maurizio Manno, Stefano Mattioli, Enrico Pira, Leonardo Soleo, Giuseppe Taino, Francesco Saverio Violante, corresponding author and Carlo Zocchetti: Società Italiana di Medicina del Lavoro Position Paper Amianto 2019.
- Politi K., Herbst R.S. Lung cancer in the era of precision medicine. *Clin. Cancer Res.* 2015.
- 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 2006.
- Scagliotti G.V., Bironzo P., Magnani C., Rossi G., Veltri A., Trisolini R., Rocco G., Ramella S., Grosso F., Marsico V.A. *Mesotelioma Pleurico*. Associazione Italiana di Oncologia Medica; Milano, Italy: 2018.
- Scherpereel A, Mazieres J, Greillier L, Lantuejoul S, Dô P, Bylicki O, Monnet I, Corre R, Audigier-Valette C, Locatelli-Sanchez M 290 et al. Nivolumab or nivolumab plus ipilimumab in patients with relapsed malignant pleural mesothelioma (IFCT-1501 MAPS2): a multicentre, open-label, randomised, non-comparative, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2019;20(2):239-253.
- Scherpereel A, Mazieres J, Greillier L, Lantuejoul S, Dô P, Bylicki O, Monnet I, Corre R, Audigier-Valette C, Locatelli-Sanchez M 290 et al. Nivolumab or nivolumab plus ipilimumab in patients with relapsed malignant pleural mesothelioma (IFCT-1501 MAPS2): a multicentre, open-label, randomised, non-comparative, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* 2019;20(2):239-253.
- Sekido Y. Molecular pathogenesis of malignant mesothelioma. *Carcinogenesis*. 2013;

- Shamseddin M, Obacz J, Garnett MJ, Rintoul RC, Francies HE, Marciniak SJ. Use of preclinical models for malignant pleural mesothelioma. *Thorax*. 2021;76(11):1154-1162. doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-216602.
- Shamseddin, Joanna Obacz, Mathew J Garnett, Robert Campbell Rintoul Hayley Elizabeth Francies, Stefan John Marciniak Use of preclinical models for malignant pleural mesothelioma Marie 2020.
- Skardal A, Devarasetty M, Rodman C, Atala A, Soker S, Liver-Tumor Hybrid Organoids for Modeling Tumor Growth and Drug Response In Vitro, *Ann Biomed Eng* 2015.
- Tomer Meirson†, Valerio Nardone† , Francesca Pentimall, Gal Markel, David Bomze, Maria D’Apolito , Pierpaolo Correale, Antonio Giordano, Luigi Pirtoli , Camillo Porta†, Steven G Gray† and Luciano Mutti† Analysis of new treatments proposed for malignant pleural mesothelioma raises concerns about the conduction of clinical trials in oncology 2022.
- Tsao A.S., Pass H.I., Rimmer A., Mansfield A.S. New Era for Malignant Pleural Mesothelioma: Updates on Therapeutic Options. *J. Clin. Oncol.* 2022.
- Van Zandwijk N., Clarke C., Henderson D., Musk A. W., Fong K., Nowak A., et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of malignant pleural mesothelioma 2013.
- Vogelzang N.J., Rusthoven J.J., Symanowski J., Denham C., Kaukel E., Ruffie P., Gatzemeier U., Boyer M., Emri S., Manegold C., et al. Phase III Study of Pemetrexed in Combination With Cisplatin Versus Cisplatin Alone in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* 2003.
- Wu L., Allo G., John T., Li M., Tagawa T., Opitz I., et al. Patient-derived xenograft establishment from human malignant pleural mesothelioma 2017.

- Yanyun Gao , Marianna Kruithof-de Julio Ren-Wang Peng and Patrick Dorn  
Organoids as a Model for Precision Medicine in Malignant Pleural Mesothelioma:  
Where Are We Today 2022.
- Zou S, Tong Q, Liu B, Huang W, Tian Y, Fu X. Targeting STAT3 in Cancer  
Immunotherapy. Mol Cancer. 2020;19(1):145. doi: 10.1186/s12943-020-01258-7.