

INDICE

- 1. MESOTELIOMA MALIGNO DELLA PLEURA**
- 2. EZIOPATOGENESI**
- 3. ESPOSIZIONE ALL'ASBESTO: PASSATO, PRESENTE, FUTURO**
- 4. BIOMARCATORI DI DIAGNOSI PRECOCE**
- 5. RAZIONALE DELLO STUDIO**
- 6. SCOPO DELLO STUDIO**
- 7. MATERIALI E METODI**
 - 7.1 popolazione di studio
 - 7.2 Analisi del HMGB1, ATG5 and SMRP
 - 7.3 analisi dei miRNA
 - 7.4 analisi statistica
- 8. RISULTATI**
- 9. DISCUSSIONE**

1. MESOTELIOMA MALIGNO DELLA PLEURA

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un tumore maligno che ha origine nella pleura, causato prevalentemente da una precedente esposizione all'amianto (asbesto).

Il mesotelioma maligno (MM) è una neoplasia che colpisce le membrane sierose in particolare il mesotelio pleurico, ovvero la membrana sierosa che riveste i nostri polmoni. Il cancro del mesotelio della pleura si diffonde nei tessuti limitrofi e porta alla morte per asfissia. Tra tutte le forme di mesotelioma maligno quello pleurico è il più frequente, rappresentando da solo circa l'80% di tutti i mesoteliomi.

Dal momento dell'esposizione all'asbesto a quello di diagnosi clinica del MM trascorre un lungo periodo di latenza, tale condizione suggerisce che potrebbero essere necessarie più modifiche genetiche somatiche per la conversione delle cellule mesoteliali in cellule tumorali. L'evidenza di una complessa eterogeneità della struttura delle aberrazioni cromosomiche nel MM sembra riflettere una predisposizione intrinseca delle cellule ad accumulare danno genomico.

La chirurgia radicale tramite la pneumonectomia extra pleurica e i trattamenti adiuvanti è diventata l'opzione preferita per trattare la malattia in stadio precoce e produrre effetti benefici a lungo termine. Nei casi non trattabili con chirurgia radicale, la chemioterapia è la prima scelta oltre alle cure di supporto, mentre la terapia di combinazione a base di platino con pemetrexed (Alimta®) rimane la terapia di riferimento.

La gestione dei pazienti con MM risulta essere ostica poiché il tumore è notoriamente difficile da diagnosticare. La difficoltà nella diagnosi e nella stadiazione, in particolare della malattia precoce, ha ostacolato lo sviluppo di un approccio terapeutico universalmente accettato. Il MM è notoriamente refrattario alle diverse modalità di trattamento disponibili. Opzioni terapeutiche usate da sole o combinate sono state ampiamente testate nella gestione del MM.

L'introduzione in clinica degli inibitori del checkpoint immunitario (ICI) ha segnato una svolta nel trattamento del mesotelioma maligno dopo due decenni di scarsi progressi (Nowak et al., 2021). Anticorpi monoclonali diretti contro PD-1, il ligando PD-L1, e contro CTLA4 erano efficienti nel contrastare la malattia. Nivolumab da solo e nivolumab più ipilimumab hanno mostrato una chiara attività nei pazienti con recidiva di mesotelioma

maligno e lo studio CheckMate 743 ha dimostrato che la sopravvivenza con nivolumab più ipilimumab era migliore rispetto a nivolumab da solo o alla chemioterapia standard nel trattamento di prima linea (Baas et al., 2021).

Diversi altri studi hanno riscontrato un migliore controllo della malattia in pazienti che ricevevano gli ICI singolarmente o in combinazione.

Nonostante questi risultati incoraggianti, una percentuale sostanziale di pazienti con MPM continua a non rispondere agli inibitori del checkpoint immunitario. L'importanza dell'istopatologia nella prognosi del mesotelioma maligno è stata a lungo riconosciuta. I pazienti con il sottotipo epitelioide hanno la prognosi migliore, quelli con il sottotipo sarcomatoide la peggiore e quelli con il sottotipo bifasico hanno una prognosi intermedia. Pertanto, il processo di transizione epiteliale-mesenchimale, mediante il quale le cellule epiteliali perdono la loro polarità e acquisiscono marcatori mesenchimali, è considerato una forma di progressione della malattia. Inoltre, la sovra-regolazione di PD-L1 va di pari passo con la transizione al sottotipo non epitelioide e la sotto-regolazione dei microRNA oncosoppressori. Pertanto, la regolazione epigenetica potrebbe contribuire al microambiente altamente immunosoppressivo presente nel MPM (Lofiego et al., 2021; Tomasetti et al., 2019).

Probabilmente sarà necessario ripristinare più vie immunitarie prima che l'immunoterapia possa mostrare un potenziale curativo nel mesotelioma maligno. Più positivamente, un portafoglio di nuovi trattamenti a base immunitaria sta attualmente entrando negli studi clinici, con la terapia cellulare CAR-T diretta alla mesotelina (NCT03054298 e NCT04577326) un esempio importante.

L'esordio dei sintomi è spesso insidioso e non specifico. Pertanto, una diagnosi accurata e precoce è importante al fine di scegliere un intervento terapeutico appropriato e garantire una corretta documentazione epidemiologica. Siccome il mesotelioma è ben associato all'esposizione ad asbesto e questa solitamente avviene sul posto di lavoro, si ipotizza che il monitoraggio di una popolazione ad alto rischio possa rilevare pazienti in uno stadio più precoce e più trattabile e determinare l'aumento dell'aspettativa di vita oltre la mediana attuale di 12 mesi dall'inizio della terapia. Pertanto, l'attenzione si è concentrata sulla ricerca di marcatori tumorali nel sangue e altri fluidi biologici che possono essere utilizzati in associazione alla radiografia per la rilevazione non invasiva di MM.

Sebbene l'incidenza complessiva di MPM nella popolazione generale sia solo di circa 2,5/100.000 (Carbone M 2019), la prognosi è estremamente sfavorevole e la maggior parte dei pazienti muore entro un anno dalla conferma del MPM a causa della mancanza di specifiche linee di trattamento sicure ed efficaci e del fatto che alcuni pazienti si trovano già nelle fasi avanzate di malattia al momento della diagnosi. La diagnosi precoce è associata all'istologia, all'età, allo stadio e all'approccio terapeutico ed è per questo che la diagnosi precoce è fondamentale per migliorare la prognosi dei pazienti affetti da MPM.

La maggior parte dei pazienti affetti da MPM svilupperà versamenti pleurici associati a dolore toracico e dispnea, durante il decorso della malattia. Pertanto, la citologia pleurica del versamento è il modo più semplice per confermare la presenza di MPM. Tuttavia, una recente revisione sistematica ha mostrato che la citologia aveva solo una sensibilità del 28,9 % per il MPM (Kassirian S, Thorax 2022).

La biopsia pleurica è il riferimento aureo per la diagnosi di MPM, ma è un metodo invasivo che può causare complicazioni legate all'operazione come sanguinamento e infezione. Inoltre, la citologia e la biopsia pleurica sono esami soggettivi e la loro accuratezza dipende fortemente dall'esperienza del patologo. I biomarcatori sierici, con i vantaggi della mininvasività, del breve tempo di risposta e dell'obiettività, rappresentano uno strumento diagnostico promettente per il MPM.

2. EZIOPATOGENESI

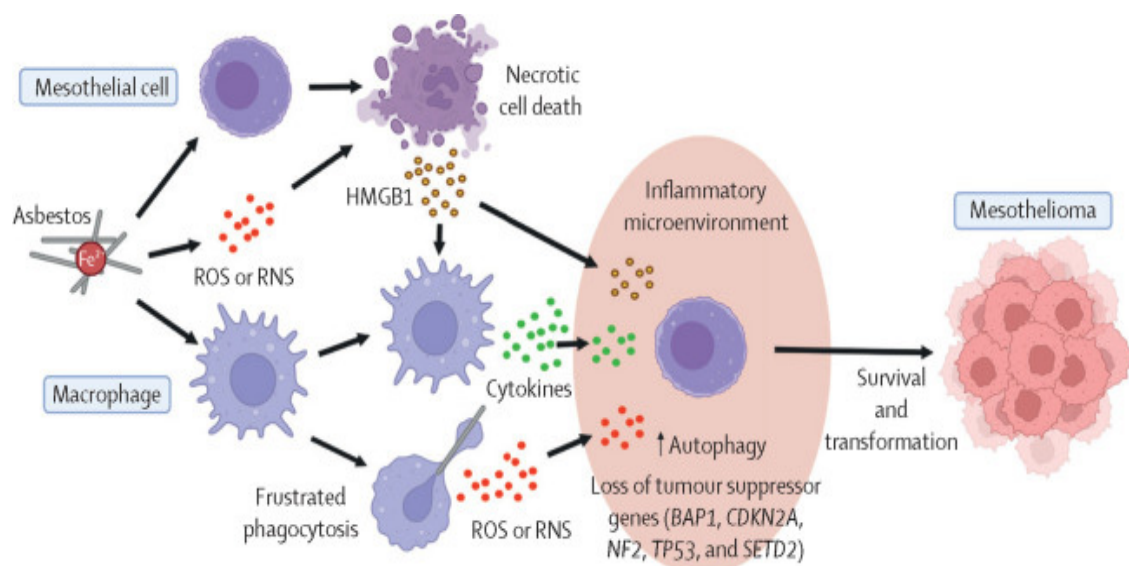
Dopo l'inalazione delle fibre circa il 70% delle fibre inalate viene eliminata attraverso l'espettorato mentre il restante 30% attraversa l'epitelio alveolare penetrando nell'interstizio polmonare. Successivamente avviene attivazione dei macrofagi alveolari con produzione di citochine che porta a deregolazioni di protooncogeni, con conseguente crescita mesoteliale

La cancerogenesi è il risultato di una complessa serie di interazioni tra fattori esogeni (ambientali o occupazionali) e processi endogeni, modulati dal corredo genetico. L'esposizione cronica ad agenti mutageni esogeni può determinare conseguenze sulla salute a lungo termine compreso lo sviluppo del cancro.

L'infiammazione cronica è un primo passo cruciale nella carcinogenesi dell'asbesto (**Figura 1**). Una volta intrappolate nel polmone, le fibre di amianto generano specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), attraverso una combinazione di fagocitosi frustrata delle fibre di amianto e reazioni di Fenton catalizzate dal ferro. Le specie radicaliche ROS e RNS formate a loro volta portano a danni al DNA, perossidazione lipidica, morte cellulare tramite ferroptosi e rilascio di citochine pro-infiammatorie.

Le cellule mesoteliali sono particolarmente suscettibili ai danni causati dalle fibre di amianto. L'asbesto induce necrosi delle cellule mesoteliali che rilasciando un fattore infiammatorio HMGB1 (High Mobility Group Box 1), contribuendo ulteriormente a favorire un microambiente infiammatorio. L'infiammazione, di conseguenza, induce sia processi autofagici che porta alla sopravvivenza delle cellule mesoteliali danneggiate, sia a morte cellulare per ferroptosi in seguito ad un aumento del danno al DNA. Inoltre, le citochine rilasciate in risposta all'asbesto inducono anche la transizione dall'epitelio al mesenchimale e attivano la proteina attivatore 1 (AP-1), un mediatore dell'infiammazione coinvolto nella proliferazione cellulare. Anche le cellule immunitarie sono colpite dal processo infiammatorio cronico, che a sua volta porta a una ridotta immunità tumorale. Tutti questi fattori portano alla perdita dell'attività oncosoppressore, all'alterazione dello stato epigenetico e alla proliferazione cellulare, con conseguente trasformazione oncogenica. In **Figura 1** sono riassunti i processi coinvolti nella carcinogenesi del MPM.

Figura 1. Schema che illustra la patogenesi del mesotelioma maligno



3. ESPOSIZIONE ALL'ASBESTO: PASSATO, PRESENTE E FUTURO

L'asbesto si riferisce a due gruppi di fibre minerali di silicato presenti in natura. Uno è caratterizzato da fibre dritte, aghiformi (anfibioli) e l'altro da fibre serpentiformi e ricce (serpentine). Il crisotilo è la forma a serpentina singola e costituisce il 90-95% di tutto l'amianto utilizzato in tutto il mondo. Il gruppo degli anfibioli è suddiviso in crocidolite (amianto blu), amosite (amianto bruno), tremolite, antofillite e actinolite. Tutte le forme di asbesto sono agenti cancerogeni del gruppo 1 (IARC).

L'asbesto è stato a lungo considerato un materiale miracoloso per la sua leggerezza, elevata resistenza alla trazione, resistenza alla degradazione chimica e conduttività elettrica. Queste caratteristiche hanno contribuito al drammatico aumento dell'uso dell'amianto nel XX secolo. L'asbesto è stato largamente prodotto e usato in diversi settori lavorativi. L'uso industriale su larga scala dell'asbesto comprende in particolare la costruzione e riparazione navale, fabbricazione e produzione di cemento-amianto, ferrovie, edilizia, chimica industria e molti altri settori industriali.

Attualmente, l'asbesto è stato vietato in 67 paesi, la maggior parte con economie ad alto reddito (**Tabella 1, Figura 2**).

Tabella 1. Paesi che hanno vietato la produzione e uso dell'asbesto

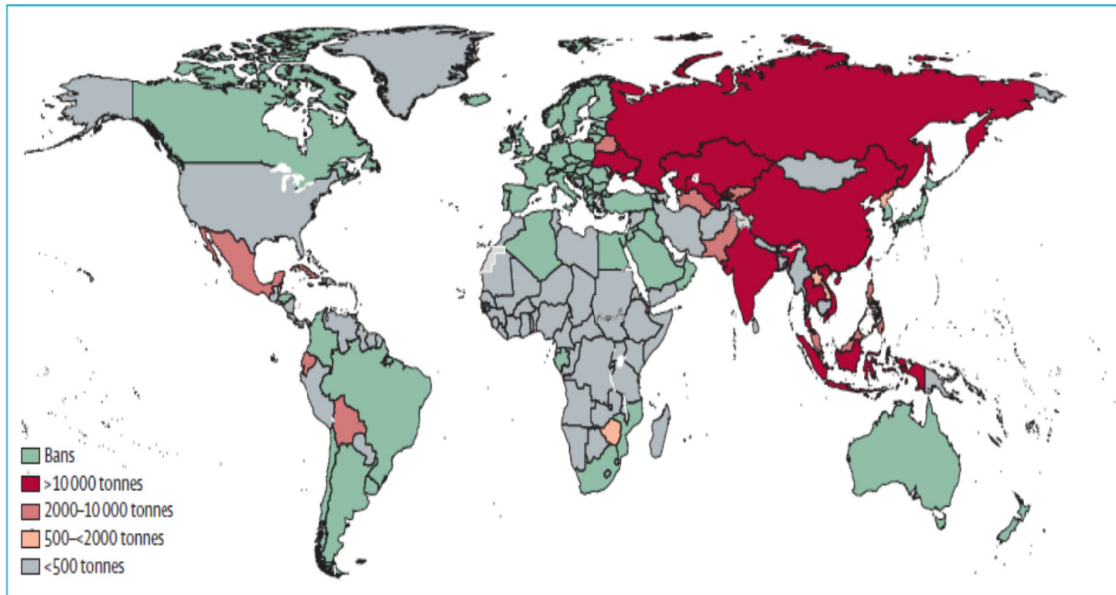
Algeria	Egypt	Israel	Mozambique	Slovakia
Argentina	Estonia	Italy	The Netherlands	Slovenia
Australia	Finland	Japan	New Caledonia	South Africa
Austria	France	Jordan	New Zealand	Spain
Bahrain	Gabon	Korea (South)	Norway	Sweden
Belgium	Germany	Kuwait	Oman	Switzerland
Brunei	Gibraltar	Latvia	Poland	Turkey
Bulgaria	Greece	Lithuania	Portugal	UK
Chile	The republic of Honduras	Luxembourg	Qatar	Uruguay
Croatia	Hungary	Macedonia	Romania	
Cyprus	Iceland	Malta	Saudi Arabia	
The Czech Republic	Iraq	The Republic of Mauritius	Serbia	
Denmark	Ireland	The Principality of Monaco	The Republic of Seychelles	

Figura 2. Cronologia dei paesi che hanno vietato l'asbesto



Attualmente, la maggior parte del consumo e della produzione di amianto si concentra nei paesi a basso e medio reddito (Figura 3).

Figura 3. Produzione e uso dell'asbesto a livello mondiale



Il divieto di produzione e uso dell'asbesto ha notevolmente contribuito a limitare le patologie asbesto-correlate. Tuttavia, anche nei paesi che hanno vietato l'asbesto il MPM rappresenta ancora un serio problema. A livello globale, i pazienti con mesotelioma di nuova diagnosi stimati sono aumentati da 19.072 (95%UI: 17055, 21157) nel 1990 a 34.511 (95% UI: 31.199, 37.771) nel 2019, con un tasso di incidenza standardizzato per età (age-standardized incidence rate, ASIR) leggermente diminuito da 0,49 (95%UI: 0,44, 0,54) a 0,43 (95%UI:0,38, 0,47) casi per 100.000 abitanti/anno negli ultimi 30 anni (**Tabella 2**).

Tabella 2. Incidenza del MPM nel periodo 1990-2019

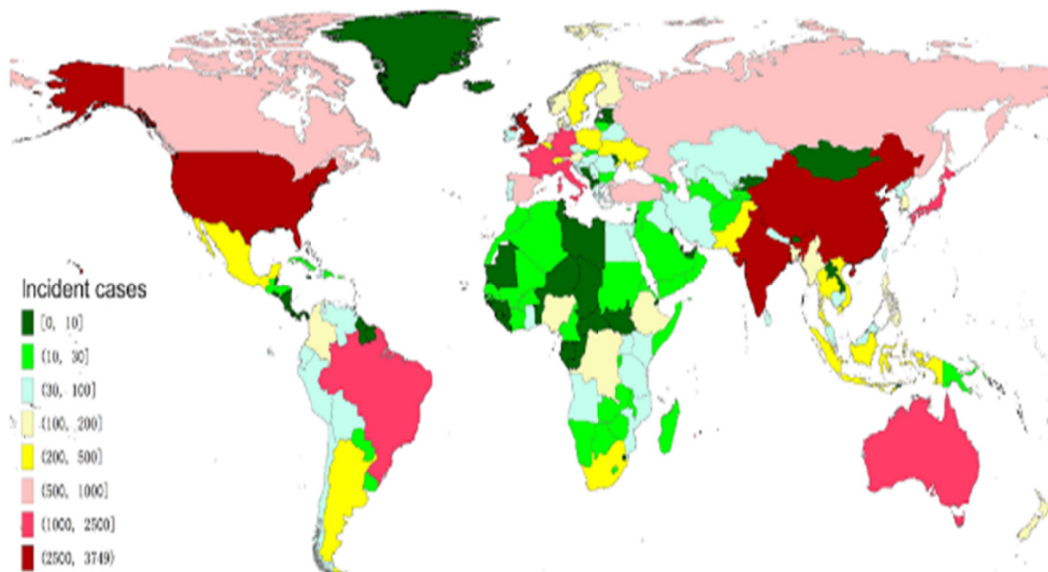
Incidence and age-standardized incidence rate per 100,000 people of mesothelioma in 1990 and 2019, and its average annual percentage change from 1990 to 2019.

Characteristics	1990		2019		AAPC of ASIR (95%CI) from 1990 to 2019
	ASIR/100,000 (95%UI)	Incident cases (95%UI)	ASIR/100,000 (95%UI)	Incident cases (95%UI)	
Global	0.49 (0.44, 0.54)	19,072 (17,055, 21,157)	0.43 (0.38, 0.47)	34,511 (31,199, 37,771)	-0.36 (-0.41, -0.3)
Male	0.76 (0.71, 0.84)	12,899 (12,107, 14,391)	0.69 (0.62, 0.75)	25,170 (22,936, 27,562)	-0.15 (-0.24, -0.07)
Female	0.29 (0.21, 0.36)	6173 (4401, 7981)	0.22 (0.16, 0.25)	9341 (6843, 10,655)	-1.02 (-1.06, -0.97)
SDI region					
High SDI	1.01 (0.94, 1.10)	10,596 (9890, 11,548)	0.91 (0.81, 1.02)	17,548 (15,610, 19,554)	-0.22 (-0.28, -0.17)
High-middle SDI	0.41 (0.35, 0.49)	4426 (3817, 5338)	0.36 (0.32, 0.40)	7234 (6385, 8000)	-0.45 (-0.55, -0.34)
Middle SDI	0.19 (0.16, 0.23)	2139 (1761, 2625)	0.19 (0.17, 0.21)	4797 (4312, 5267)	0.08 (-0.01, 0.18)
Low-middle SDI	0.21 (0.14, 0.29)	1331 (901, 1936)	0.25 (0.20, 0.31)	3505 (2852, 4346)	0.84 (0.74, 0.93)
Low SDI	0.22 (0.11, 0.47)	570 (262, 1165)	0.21 (0.13, 0.38)	1151 (681, 2029)	0.13 (-0.26, 0.00)
GBD Region					
High-income Asia Pacific	0.40 (0.36, 0.45)	796 (728, 905)	0.47 (0.39, 0.55)	2102 (1747, 2468)	1.18 (0.93, 1.44)
High-income North America	0.06 (0.01, 0.92)	3073 (2885, 3321)	0.70 (0.59, 0.81)	4487 (3822, 5210)	-0.93 (-1.05, -0.81)
Western Europe	1.34 (1.22, 1.47)	7732 (7069, 8474)	1.33 (1.16, 1.52)	12,080 (10,554, 13,696)	0.16 (0.09, 0.24)
Australasia	2.49 (2.16, 3.05)	593 (513, 728)	2.20 (1.75, 2.76)	1131 (897, 1414)	-0.36 (-0.46, -0.26)
Southern Latin America	0.37 (0.33, 0.44)	170 (154, 204)	0.46 (0.36, 0.59)	380 (296, 482)	1.43 (1.15, 1.71)
Andean Latin America	0.50 (0.30, 0.67)	107 (64, 146)	0.25 (0.19, 0.32)	144 (107, 185)	-3.47 (-4.02, -2.92)
Tropical Latin America	0.52 (0.42, 0.62)	511 (409, 650)	0.49 (0.42, 0.55)	1195 (1021, 1350)	-0.05 (-0.17, 0.07)
Central Latin America	0.24 (0.21, 0.27)	221 (191, 245)	0.27 (0.23, 0.31)	654 (551, 756)	0.63 (0.46, 0.81)
Caribbean	0.25 (0.21, 0.31)	68 (57, 85)	0.23 (0.18, 0.28)	117 (95, 147)	-0.51 (-0.65, -0.37)
Eastern Europe	0.34 (0.23, 0.64)	934 (637, 1733)	0.35 (0.27, 0.46)	1115 (884, 1396)	-0.61 (-1.00, -0.22)
Central Europe	0.22 (0.20, 0.27)	330 (300, 406)	0.33 (0.28, 0.37)	665 (574, 754)	1.78 (1.62, 1.95)
Central Asia	0.29 (0.16, 0.61)	150 (80, 340)	0.27 (0.19, 0.37)	211 (151, 297)	-1.04 (-1.38, -0.7)
North Africa and Middle East	0.33 (0.24, 0.47)	599 (442, 895)	0.26 (0.21, 0.34)	1184 (946, 1520)	-0.83 (-0.96, -0.69)
South Asia	0.20 (0.14, 0.31)	1211 (802, 1911)	0.24 (0.19, 0.31)	3468 (2745, 4515)	0.62 (0.51, 0.73)
Southeast Asia	0.19 (0.15, 0.24)	604 (468, 781)	0.19 (0.15, 0.22)	1238 (994, 1483)	-0.40 (-0.59, -0.22)
East Asia	0.14 (0.11, 0.19)	1272 (969, 1789)	0.14 (0.12, 0.17)	2968 (2433, 3508)	0.84 (0.52, 1.16)
Oceania	0.24 (0.17, 0.33)	8 (6, 11)	0.30 (0.21, 0.43)	24 (16, 35)	1.19 (1.03, 1.34)
Western Sub-Saharan Africa	0.16 (0.09, 0.27)	158 (85, 261)	0.12 (0.08, 0.19)	272 (183, 419)	1.32 (-1.58, -1.06)
Eastern Sub-Saharan Africa	0.30 (0.10, 0.88)	241 (80, 670)	0.28 (0.11, 0.80)	475 (193, 1322)	-0.41 (-0.54, -0.29)
Central Sub-Saharan Africa	0.31 (0.11, 0.85)	75 (26, 195)	0.28 (0.11, 0.73)	159 (65, 416)	-0.47 (-0.59, -0.35)
Southern Sub-Saharan Africa	0.78 (0.50, 1.00)	216 (163, 275)	0.80 (0.65, 0.90)	441 (362, 495)	-0.19 (-0.74, 0.36)

ASIR, age-standardized incidence rate; UI, uncertainty interval; AAPC, average annual percentage change; CI, confidential interval; SDI, socio-demographic index; GBD, Global Burden of Disease, Injuries, and Risk Factors Study.

La distribuzione dell'incidenza del MPM nel 2019 è mostrata in **Figura 4**.

Figura 4. Distribuzione mondiale dell'incidenza del MPM nel 2019



Comunque, quando si fa un'ipotesi sugli effetti futuri dell'asbesto, occorre innanzitutto definire a quale effetto ci si riferisce, se a breve o lungo termine, e a quale tipo di esposizione.

Per i paesi che hanno vietato l'asbesto, lo scenario riguarda principalmente tre aspetti:

- (I) gli effetti residui di una precedente esposizione professionale all'asbesto quando il suo uso non era ancora stato vietato;
- (II) gli effetti dei restanti prodotti in amianto, il cosiddetto "amianto in situ" e le sue ripercussioni sull'ambiente generale.
- (III) i paesi che non hanno vietato la produzione e l'uso dell'asbesto. In questi paesi sono da prendere in considerazione tutte le possibili patologie associate all'esposizione. L'unica differenza rispetto al passato è la disponibilità di misure preventive più avanzate, che, se associate al know-how della gravità delle patologie asbesto-correlate, dovrebbe, in teoria, contenere il fenomeno a una certa misura.

Pertanto, si stima che l'esposizione all'asbesto, sia in ambito lavorativo che ambientale, causi ogni anno circa 255.000 morti in tutto il mondo con una quantità impressionante di costi sociali e sofferenze umane (Han et al., 2022). L'esposizione professionale è considerata il principale determinante dell'insorgenza di MPM negli uomini, mentre nelle donne anche le esposizioni para-professionali o ambientali giocano un ruolo importante (Marinaccio et al., 2018).

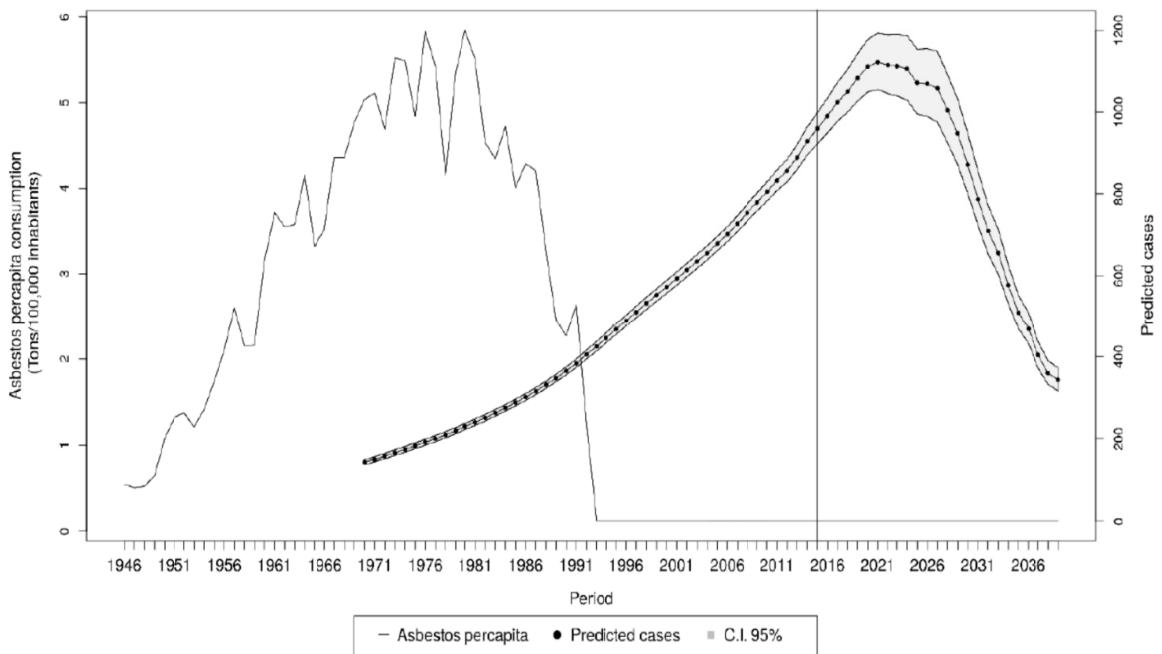
In Italia, dalla fine della Seconda guerra mondiale, il consumo pro capite di asbesto è aumentato in modo esponenziale fino alla fine degli anni '70, raggiungendo il suo picco di quasi 6 tonnellate/100.000 abitanti. In seguito, il consumo è fortemente diminuito, azzerandosi dopo il 1992, quando la produzione e il consumo di asbesto sono stati vietati in tutto il paese. Nel periodo 1970-2014 è stato segnalato un aumento costante dei decessi per MPM (da 152 a 960 casi all'anno).

Ad esempio, considerando la quantità di asbesto utilizzata nella fabbrica di amianto cemento di Casale Monferrato, è stato stimato che l'epidemia di MPM durerà fino al 2028-2031. Poco si sa circa l'entità dell'esposizione all'amianto dopo l'entrata in vigore del bando nazionale nel 1992. Da un lato, la produzione e l'uso dell'asbesto sono di fatto cessati,

completando un processo iniziato alcuni anni prima, traducendosi in una forte riduzione in esposizione attiva e astante. D'altra parte, una grande quantità di materiale contenente amianto è rimasta in loco dopo il divieto.

In Figura 5 sono riportati i Casi di MPM reali e previsti (dopo il 2014) con relativo 95% IC. A sinistra, consumo pro capite di amianto nel periodo 1946–1992 in Italia (Oddone et al., 2021).

Figura 5. Consumo di asbesto e casi di MPM reali e previsti fino al 2040



Uno studio riporta che tutte le esposizioni che si verificano tra 20 e 40 anni prima dello sviluppo di MPM sono associate a un aumento del rischio. Il rischio era massimo per le esposizioni avvenute 30 anni prima e diminuito successivamente (Oddone et al., 2021). Questo risultato è in contrasto con l'ipotesi classica che il rischio di MPM aumenti indefinitamente con il tempo dell'esposizione all'amianto (Health Effect Institute-HEI, 1991). D'altra parte, questi risultati erano coerenti con studi più recenti che hanno dimostrato che il rischio di MPM si riduce molti anni dopo la prima esposizione all'amianto, il che implica che le esposizioni remote potrebbero avere un ruolo minore nello sviluppo di MPM rispetto a quanto ipotizzato in precedenza.

Sebbene l'asbesto sia stato vietato in numerosi paesi, si stima che circa 125 milioni di persone in tutto il mondo sono a rischio di esposizione professionale all'asbesto. Negli Stati Uniti, circa 1.3 milioni di lavoratori nel settore delle costruzioni e dell'industria in generale sono oggi a rischio di esposizione.

Nel 1980, quando i nati nel 1965 stavano iniziando a lavorare, i settori lavorativi ad alto rischio di esposizione all'asbesto erano il settore delle costruzioni di legname e la costruzione navale erano scomparse. Nonostante la cessazione di certe attività associate all'esposizione dell'asbesto, si è osservato che i nati dal 1965 avevano patologie polmonari più elevate rispetto alla popolazione generale e le professioni maggiormente colpite erano per il 43% gli idraulici, elettricisti e decoratori, il 17% operai edili e il 14% occupazioni a medio rischio.

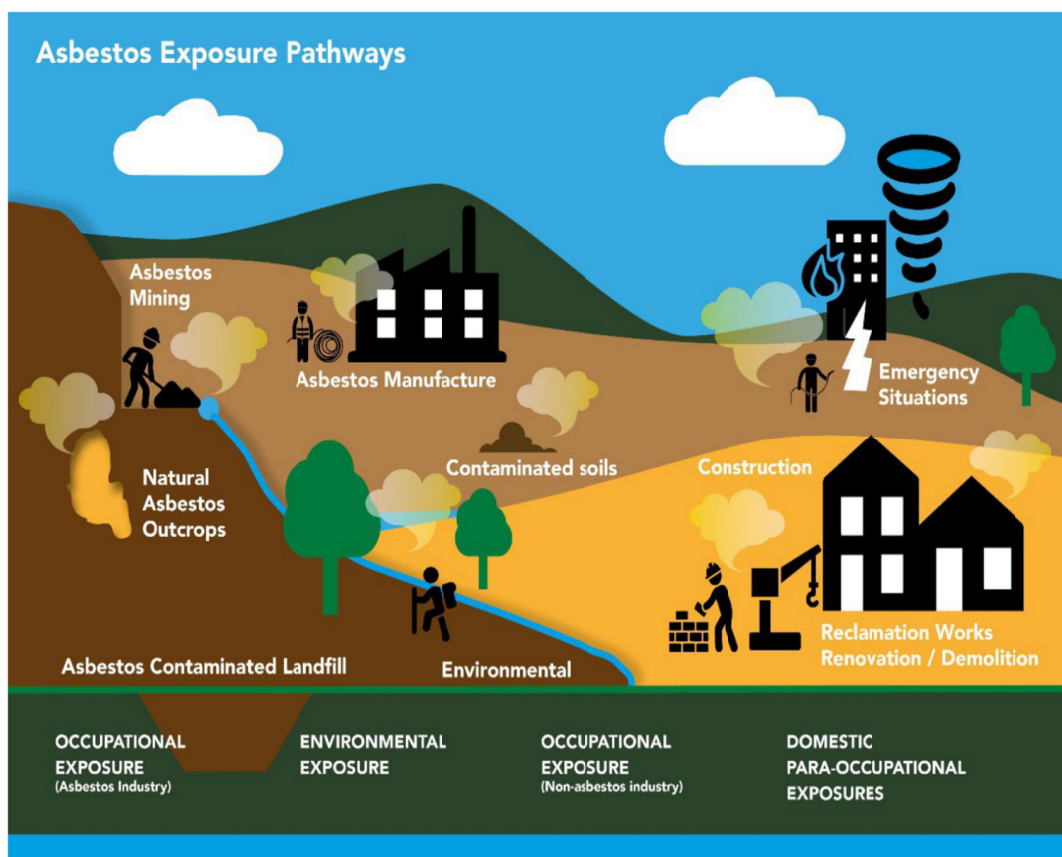
Inoltre, bisogna considerare che la maggior parte dell'asbesto è entrata nell'ambiente durante o subito dopo l'installazione di nuovi materiali di amianto. Gli attuali rilasci ambientali possono verificarsi principalmente durante i lavori di costruzione o demolizione di edifici contenenti amianto (lavoratori addetti alla rimozione dell'amianto). La rimozione e la demolizione possono contribuire in modo sostanziale all'esposizione sia occupazionale che ambientale. Le fibre di amianto disperse nell'aria rilasciate da anche gli agenti atmosferici e l'occupazione quotidiana degli edifici possono essere un'importante fonte di esposizione ambientale. L'identificazione dell'amianto negli edifici che giustifica il contenimento o la rimozione dovrebbe continuare a essere una priorità normativa, e la rimozione non necessaria dell'amianto contribuisce ad aumentare il numero di fibre rilasciate nell'ambiente (Gilham et al., 2018).

Dopo la prima ondata di esposizione derivante dalla produzione di asbesto nelle miniere, è seguita la seconda ondata relativa all'uso dell'asbesto in diversi settori lavorativi (meccanici, idraulici, elettricisti, manutentori, lavoratori nei cantieri navali, attualmente, siamo esposti alla terza ondata di asbesto derivante da manufatti ancora presenti (lamiere ondulate, tubi di cemento, pastiglie dei freni, piastrelle in vinile) e da attività ancora esposte (muratori, lavoratori in edilizia, settore tessile, cantieri navali, manutenzione), da esposizione domestica per la presenza di amianto delle abitazioni e scuole, ed infine da addetti coinvolti nei disastri naturali (**Figura 6**).

Tra le occupazioni a medio rischio, vengono inclusi gli addetti ai disastri naturali come le forze armate e i vigili del fuoco. I vigili del fuoco sono abitualmente esposti a un gran numero di sostanze tossiche, ad esempio monossido di carbonio, benzene, particolato, composti aromatici polinucleari, acido cloridrico e cianuro, nonché all'asbesto (Melius, 2001). Un aumento del rischio, principalmente nelle età di 70 anni e oltre, è stato osservato per cancro della pelle non melanoma (SIR=1,40, 95% CI 1.10-1.76), mieloma multiplo (SIR=1,69, 95% CI 1.08-2.51), adenocarcinoma del polmone (SIR=1,90, 95% CI 1.34-2.62) e mesotelioma (SIR=2.59, 95% CI 1.24-4.77), (Pukkala et al., 2014).

Le normative in materia di Protezione Civile (Legge 225/1992 e D.P.C.M. del 3 dicembre 2008) e quella in materia di attività a rischio di incidenti rilevanti (D.Lgs. 334/99 e s.m.i.) prevedono che le competenze di intervento di primo di livello in caso di situazioni di emergenza siano affidate ai soggetti del Corpo Nazionale dei Vigili del Fuoco. In caso di incendio a strutture contenenti manufatti in asbesto è possibile una dispersione di fibre di asbesto in aria, insieme ad altri prodotti della combustione.

Figura 6. Rischio di sviluppare le patologie asbesto-correlate



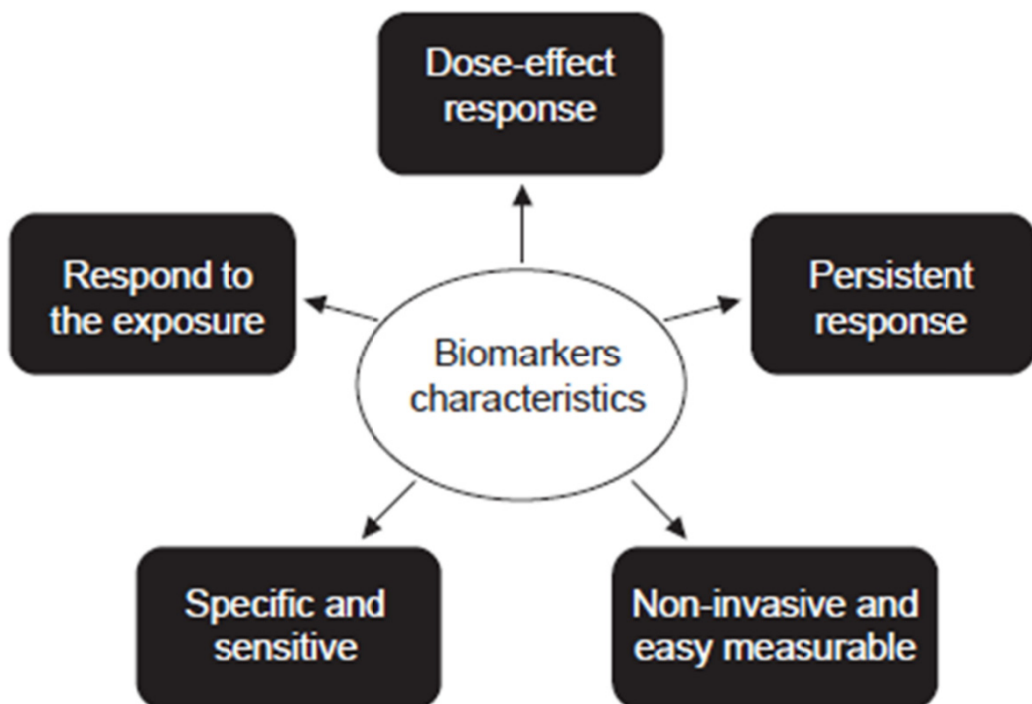
4. BIOMARCATORI DI DIAGNOSI PRECOCE

La diagnosi precoce rappresenta una strategia per migliorare la prognosi del MPM. Una diagnosi precoce, rapida e accurata permetterebbe un approccio terapeutico radicale che potrebbe avere un effetto positivo sul decorso della malattia.

Attualmente non sono previsti screening per il MPM, e la diagnosi si basa fondamentalmente su tecniche invasive, che non sono ben tollerate. I biomarcatori diagnostici non invasivi hanno mostrato potenzialità e potrebbero avere un enorme impatto clinico. Tuttavia, nonostante numerose ricerche, non c'è ancora consenso sul loro uso clinico, con molti articoli che riportano risultati contraddittori, limitandone l'applicazione clinica.

Un biomarcatore ideale per MPM dovrebbe identificare i pazienti con la patologia e differenziarli dai pazienti con altre neoplasie e soggetti ad alto rischio di sviluppare la malattia (soggetti esposti all'asbesto). Il biomarcatore dovrebbe essere misurabile in campioni biologici raccolti utilizzando metodi non o poco invasivi come il prelievo di sangue o liquido pleurico. Le caratteristiche ideali di un biomarcatore sono mostrate in **Figura 7**.

Figura 7. Caratteristiche dei biomarcatori per il mesotelioma pleurico maligno



Ad oggi sono stati proposti diversi biomarcatori per la diagnosi precoce del MPM e la loro performance (sensibilità e specificità) è stata valutata come capacità di discriminare pazienti con MM da soggetti senza neoplasia.

Sono stati valutati numerosi marcatori tumorali nel siero e nel liquido pleurico per distinguere i versamenti maligni da quelli benigni. Tra i biomarcatori convenzionali con un significato diagnostico abbiamo il frammento di citocheratina (CYFRA 21-1), l'antigene carcino-embrionale (CEA), l'antigene carboidrato 15-3 (CA 15-3), antigene carboidrato 15-9 (CA 15-9), l'antigene polipeptidico tissutale (TPA) e l'acido ialuronico (HA) (Grigoriu et al., 2009).

La mesotelina è di gran lunga il biomarcatore diagnostico più studiato per MPM. La mesotelina è una glicoproteina di superficie cellulare normalmente poco espressa dalle cellule mesoteliali. La proteina precursore della mesotelina può essere scissa dalle proteasi in una forma solubile che può essere rilevata nel sangue. Nonostante i numerosi studi, non c'è ancora consenso sulla sua effettiva utilità clinica. Una meta-analisi che ha coinvolto 4000 pazienti ha evidenziato che la mesotelina era in grado di rilevare la malattia con una sensibilità del 47% e specificità del 95% (Hollevoet et al., 2012). Sebbene promettente, la mesotelina manca chiaramente della sensibilità necessaria per essere utilizzata come biomarcatore diagnostico singolo. Allo scopo di aumentare la performance diagnostica, la mesotelina è stata combinata con altri biomarcatori molecolari.

Tra i marcatori di natura proteica, l'osteopontina (OPN) è la proteina plasmatica più studiata (Cristaudo et al., 2011; Grigoriu et al., 2007; Paleari et al., 2009; Creaney et al., 2011). Tuttavia, con valori AUC-ROC compresi tra 0,568 e 0,795, sembra non essere un ottimale biomarcatore per la diagnosi differenziale in quanto manca di specificità.

Risultati contraddittori sono stati osservati anche per la fibulina-3, una glicoproteina secreta dal MPM che è coinvolta nella crescita e invasione del tumore tramite fosforilazione del recettore del fattore di crescita epidermico e attivazione dell'AKT (Creaney et al., 2014). Pass e Jiang hanno entrambi riportato che la fibulina-3 differenziava significativamente i pazienti affetti da asbestosi dai con valori AUC-ROC che vanno da 0,81 a 0,92 (Pass et al., 2012; Jiang et al., 2017). Tuttavia, il valore diagnostico veniva

perso quando si discriminava i pazienti con MPM dal gruppo di controllo compresi i pazienti con malattia benigna correlata all'amianto (AUC=0,671) (Creaney et al., 2014).

Un altro biomarcatore per la diagnosi precoce del MPM è l'HMGB1 (High-mobility group box protein 1) è una proteina associata ad un danno cellulare ed è rilasciata nello spazio extracellulare durante la necrosi (Napolitano et al., 2016). Quando HMGB1 risiede nel nucleo è in forma non acetilato, mentre l'HMGB1 citoplasmatico iperacetilato viene secreto nello spazio extracellulare ed attraendo i macrofagi determina uno stato infiammatorio cronico. Pertanto, si ipotizza che la forma non iperacetilata è presente nei soggetti esposti all'asbesto, mentre la forma iperacetilata viene rilasciata durante la cancerogenesi. Nel complesso, l'HMGB1 è un biomarcatore molto promettente nella sua forma iperacetilata, anche se non sono state riscontrate differenze quando i pazienti con MPM sono stati confrontati con i pazienti con asbestosi.

Recentemente, i microRNA (miRNA) sono stati proposti come biomarcatori molecolari di diagnosi in diversi tumori (Lu et al., 2005). Il profilo di espressione dei miRNA può essere utilizzato per distinguere i tessuti normali da quelli maligni, per identificare l'origine tissutale in tumori scarsamente differenziati o tumori di origine sconosciuta e per distinguere i diversi sottotipi dello stesso tumore. precedenti studi hanno mostrato la presenza di profili tessuto-specifici dell'espressione di miRNA nel MPM. Utilizzando la tecnologia microarray, 723 miRNA sono stati analizzati in biopsie ottenute da 17 MPM e confrontate con il tessuto normale. Dall'analisi si è osservato che alcuni miRNA distinguevano chiaramente il tumore dal tessuto normale (Guled et al., 2009).

la ricerca dei miRNA nel sangue ha suggerito il loro potenziale diagnostico (Mitchell et al., 2008). È stato ipotizzato che i livelli dei miRNA circolanti possano essere utilizzati per rilevare e monitorare lo sviluppo del tumore associato ad esposizione all'asbesto. Valutando i livelli di miRNA nel siero di una popolazione di soggetti esposti all'amianto, pazienti affetti da MM e controlli sani di pari età, abbiamo osservato che bassi livelli di miRNA sono stati trovati nel sangue di pazienti affetti da MM e soggetti ad alto rischio (soggetti esposti all'amianto) rispetto ai controlli (Santarelli et al., 2011; Santarelli et al., 2015). i miRNA potrebbero essere un marker per la diagnosi precoce e la prognosi del MM e dell'esposizione all'amianto (Santarelli et al., 2019).

Studi incentrati sui miRNA hanno riportato un aumento dell'espressione di miR-197-3p, miR-1281, miR548-3p, miR-20a, miR-625-3p, has-1,3 miR-2053 e miR-34b/c. Solo il miR-126 è stato trovato sotto-espresso nel MPM, che potrebbe essere spiegato dalla sua potenziale funzione di oncosoppressore (Santarelli et al., 2011; Tomasetti et al., 2012). il miR-126 è uno dei marcatori sierici con le migliori prestazioni (AUC-ROC = 0,80). Tuttavia, la migliore performance è stata osservata confrontando i pazienti MPM con soggetti sani di controllo. Inoltre, la mancanza di specificità (54%) rispetto al gruppo esposto all'asbesto e al controllo sano rivela la sua bassa capacità discriminatoria quando gli esposti all'asbesto erano inclusi nel gruppo di controllo.

Tuttavia, l'associazione dei miRNA con la mesotelina ha notevolmente migliorato il valore diagnostico di quest'ultima. La combinazione di miR-103a-3p e mesotelina ha incrementato la sensibilità (86%) e specificità (85%) nell'individuare la patologia (Weber et al., 2014). Infine, sebbene miR132-3p (AUC-ROC = 0,76) sembri meno efficace nella diagnosi di MPM rispetto alla mesotelina (AUC-ROC = 0.81), la combinazione di entrambi è superiore alle loro capacità diagnostiche individuali, risultante in un AUC-ROC di 0,90 (Weber et al., 2014; Weber et al., 2017). Un effetto positivo simile è stato osservato per la combinazione con il miR-132-3p e miR-126 (Weber et al., 2017; Santarelli et al., 2011).

In **Tabella 3** è riportata la performance clinica dei biomarcatori nel distinguere il MPM dal gruppo di controllo.

Tabella 3. Valori di AUC (area under curve) delle curve ROC (Receiver Operating Characteristic) dei biomarcatori in base alla matrice analizzata.

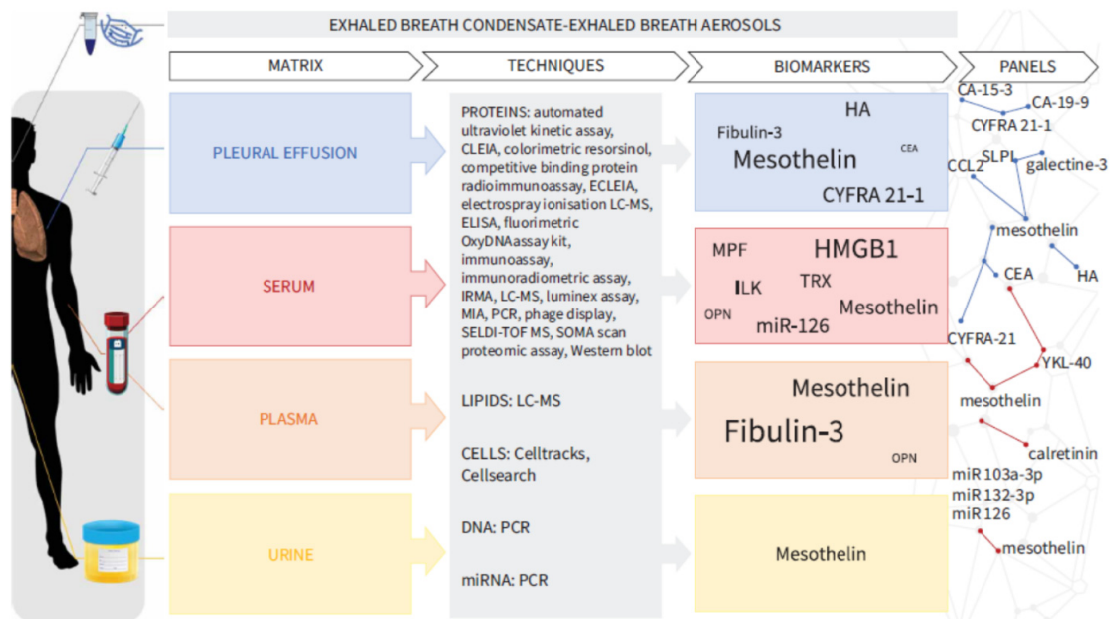
	Serum	Plasma	PE
Mesothelin	0.81 (0.79–0.83)	<u>0.86 (0.79–0.92)</u>	0.83 (0.81–0.85)
MPF	0.78 (0.73–0.83)		
HMGB1	0.88 (0.80–0.96)		
ILK	0.79 (0.59–0.99)		
OPN	0.66 (0.56–0.75)	<u>0.69 (0.63–0.75)</u>	
TRX	0.77 (0.68–0.87)		
Fibulin3		<u>0.91 (0.86–0.97)</u>	0.68 (0.50–0.87)
CEA			0.55 (0.21–0.89)
CYFRA 21–1			0.73 (0.67–0.78)
HA			0.78 (0.73–0.82)
miR 126	0.80 (0.68–0.91)		

MPF: megakaryocyte potentiating factor; HMGB1: high-mobility group box 1; ILK: integrin-linked kinase; OPN: osteopontin; PE: pleural effusion; TRX: thioredoxin; CEA: carcinoembryonic antigen; CYFRA 21-1: cytokeratin 19 fragments; HA: hyaluronan; miR: microRNA. The highest AUC_{ROC} per matrix are in bold, the highest AUC_{ROC} values per biomarker are underlined.

Tali biomarcatori sono stati studiati in diverse matrici (Schillebeeckx et al., 2021). Per la mesotelina, la massima accuratezza diagnostica è stata osservata nel plasma, seguito da vicino da liquido pleurico (Pleural Effusion, PE) e siero (**Figura 8**). I livelli di mesotelina sono significativamente più elevati nel liquido pleurico rispetto a quelli nel siero, il che potrebbe essere spiegato dal fatto che la mesotelina è prodotta localmente dalle cellule e rilasciata direttamente nella cavità pleurica (Ferro et al., 2013). Per OPN, la matrice preferita è il plasma, poiché le misurazioni si sono dimostrate più stabili e affidabili. Tuttavia, né la OPN plasmatica o sierica hanno mostrato una buona prestazione diagnostica (Cristaudo et al., 2010). Diversamente, la fibulina-3 ha un'ottima accuratezza diagnostica nel plasma rispetto al liquido pleurico.

È noto che è impossibile usare una sola matrice, poiché ogni marcatore ha una sua matrice (**Figura 8**).

Figura 8. Biomarcatori per la diagnosi del mesotelioma pleurico maligno (MPM).



La dimensione del carattere dei diversi biomarcatori è direttamente proporzionale all'area sotto la curva (AUC) delle caratteristiche operative del ricevitore (ROC). Il biomarcatore dosato in diverse matrici è stato messo in grassetto il biomarcatore in quella matrice quello con valori AUC-ROC più alti. Le combinazioni di biomarcatori (pannelli di biomarcatori) sono mostrati nella figura sotto il pannello della colonna. CEA: antigene carcino-

embrionale; CLEIA: immunodosaggio in chemiluminescenza; CYFRA-21-1: frammento di citocheratina 19; ECLEIA: saggio immunologico in elettrochemiluminescenza; ELISA: saggio immunosorbente; HA: acido ialuronico; HMGB1: proteina 1 della casella di gruppo ad alta mobilità; ILK: protein chinasi legata all'integrina; IRMA: immunoradiometrico saggio; LC-MS: cromatografia liquida-spettrometria di massa; MIA: immunodosaggio magnetico; miR: microRNA; MPF: fattore di potenziamento dei megacariociti; OPN: osteopontina; PCR: reazione a catena della polimerasi; SELDI-TOF MS: spettrometria di massa a tempo di volo di desorbimento/ionizzazione laser potenziata dalla superficie; SLPI: inibitore della proteasi leucocitaria secretoria; TRX: tioredossina; YKL: proteina simile alla chitinasi.

5. RAZIONALE DELLO STUDIO

Sebbene l'asbesto sia considerato l'agente cancerogeno maggiormente coinvolto nello sviluppo del MMP, solo il 5% dei soggetti esposti all'asbesto sviluppa la malattia (Xu et al., 2018). Oltre all'esposizione all'amianto, è stato osservato che i fattori genetici ed epigenetici sono associati alla cancerogenesi. Un piccolo numero di mesoteliomi (1%) è causato da mutazioni/delezioni germinali della proteina-1 associata a BRCA1 (BAP1) in famiglie che sviluppano anche altri tumori associati a BAP1 (Attanoos et al., 2018; Hathaway et al., 2023; Martínez-Fernández et al., 2023).

La capacità dell'asbesto di indurre la trasformazione maligna è stata collegata alla sua capacità di provocare il rilascio di TNF- α , citochine, fattori di crescita e di radicali mutageni dell'ossigeno dalle stesse cellule mesoteliali esposte e dai macrofagi vicini promuovendo la sopravvivenza delle cellule mesoteliali (Hillegass et al., 2010; Zolondick et al., 2021). Pertanto, cellule mesoteliali con un DNA danneggiato e con un riarrangiamento cromosomico (aberrazioni cromosomiche) sono in grado di sopravvivere, proliferare e in certe condizioni di trasformarsi in cellula neoplastica. Un processo coinvolto nel decidere tra la morte e la sopravvivenza della cellula danneggiata è rappresentato dall'autofagia che può essere di tipo costitutivo o indotto. L'autofagia costitutiva ricicla i componenti cellulari di organelli invecchiati e/o danneggiati. Mentre, l'autofagia indotta si verifica in risposta all'esposizione ambientale deputata a proteggere le cellule dalla morte per apoptosi o necrosi (Wang et al., 2023; Carinci et al., 2022).

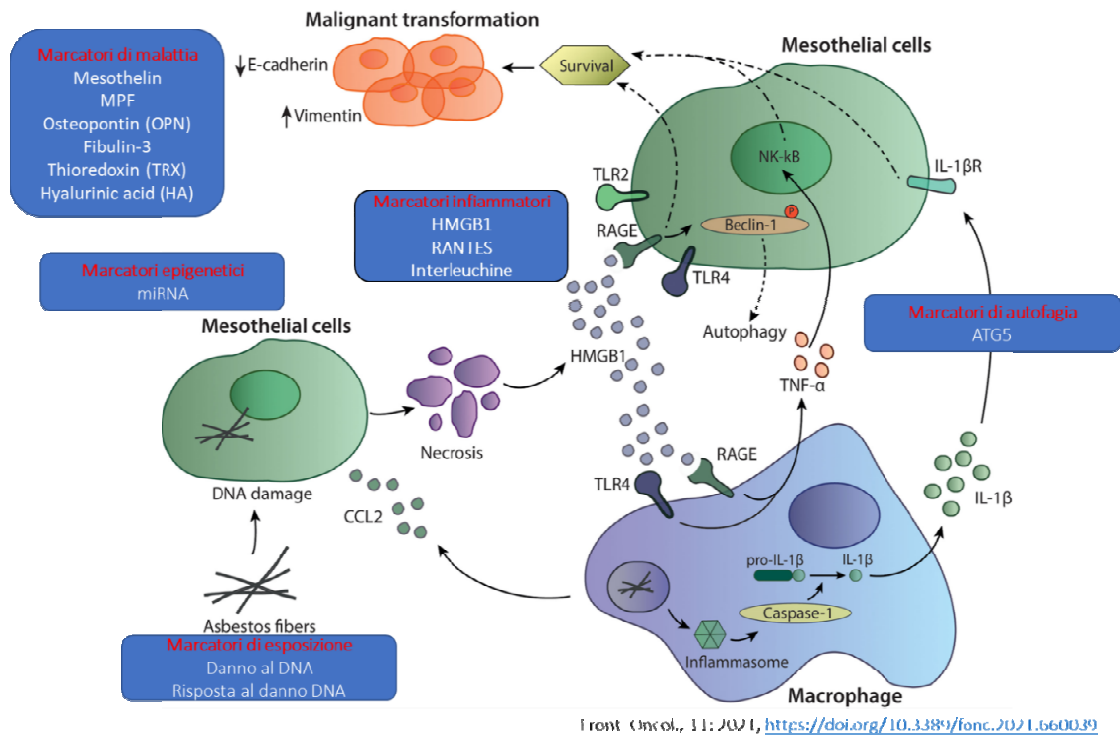
Un recente studio, ha evidenziato che l'attivazione del processo autofagico mediato dal fattore 'High-mobility group box 1 (HMGB1)' determinava la sopravvivenza della cellula danneggiata contribuendo quindi alla trasformazione maligna (Xue et al., 2020). Il fattore HMGB1 è una proteina nucleare ubiquitaria che promuove infiammazione quando viene rilasciata nel comparto extracellulare in seguito a stress, danno o morte cellulare (Andersson et al., 2018). Tale proteina è stata trovata nel siero d'individui esposti all'asbesto (Carbone and Yang, 2017; Novelli et al., 2021; Zolondick et al., 2021), in seguito, probabilmente, all'induzione autofagica: questi soggetti avevano anche alti livelli sierici del marcatore autofagico ATG5. Pertanto, i fattori ATG5 e HMGB1, potrebbero essere rilevati nel siero degli individui esposti all'asbesto prima che il tumore si sviluppi individuando i soggetti a rischio di sviluppare il tumore.

Recentemente, i miRNAs sono stati descritti come sensibili biomarcatori nell'individuare precocemente la patologia asbesto-correlata, ma presentano una bassa specificità. Diversamente, la mesotelina sierica è altamente specifica nel rilevare il MPM, ma perde di sensibilità. Una strategia per migliorare la performance dei biomarcatori è di combinare molecole di diversa origine. La combinazione della mesotelina sierica con un pannello-miRNA migliorava la performance dei biomarcatori presi singolarmente nel distinguere il gruppo esposti da quello dei malati (Santarelli et al., 2011; Santarelli et al., 2015). Comunque, quando questi marcatori venivano dosati in campioni pre-diagnostici (circa un anno prima della diagnosi di MPM), le alterazioni di espressione dei miRNAs non erano supportati da cambiamenti dei livelli sierici di mesotelina (Weber et al., 2019). Per spiegare la bassa performance di questi biomarcatori nell'individuare precocemente la patologia, bisogna considerare 1) che i livelli sierici dei miRNA variano non solo in presenza del tumore, ma anche in seguito ad altre patologie quali quelle metaboliche e cardiache, 2) non tutti i MPM secernano la mesotelina nel siero. Pertanto, altri biomarcatori sono necessari nel predire lo sviluppo dei tumori-asbesto correlati.

A differenza dei miRNA e della mesotelina sierica, i marcatori autofagici ATG5 e HMGB1 non sono biomarcatori di malattia, ma vengono rilasciati in circolo solo in certe condizioni che potrebbero portare allo sviluppo del tumore-asbesto correlato; quindi, sono definiti come biomarcatori di predizione e non di diagnosi precoce.

Come mostrato in **Figura 9**, i biomarcatori possono essere rilevati durante le varie fasi di carcinogenesi del MPM in seguito ad esposizione ad asbesto (Hiltbrunner et al., 2021).

Figura 9. Ricerca dei biomarcatori durante il processo di carcinogenesi del MPM



6. SCOPO DELLO STUDIO

Lo scopo dello studio è quello di identificare biomarcatori pre-diagnostici da soli o in combinazione capaci di identificare il MPM nelle prime fasi quando le comuni tecniche diagnostiche non rilevano la malattia. Pertanto, il fattore autofagico ATG5 da solo o in combinazione con HMGB1 sarà analizzato in sieri di una corte di soggetti precedentemente esposti all'asbesto e pazienti affetti da MMP che verranno confrontati con soggetti sani di controllo. I risultati saranno messi in relazione all'espressione di altri biomarcatori precedentemente proposti nella sorveglianza degli ex-esposti quali il pannello miRNA (miR-126 e miR-222) e mesotelina sierica.

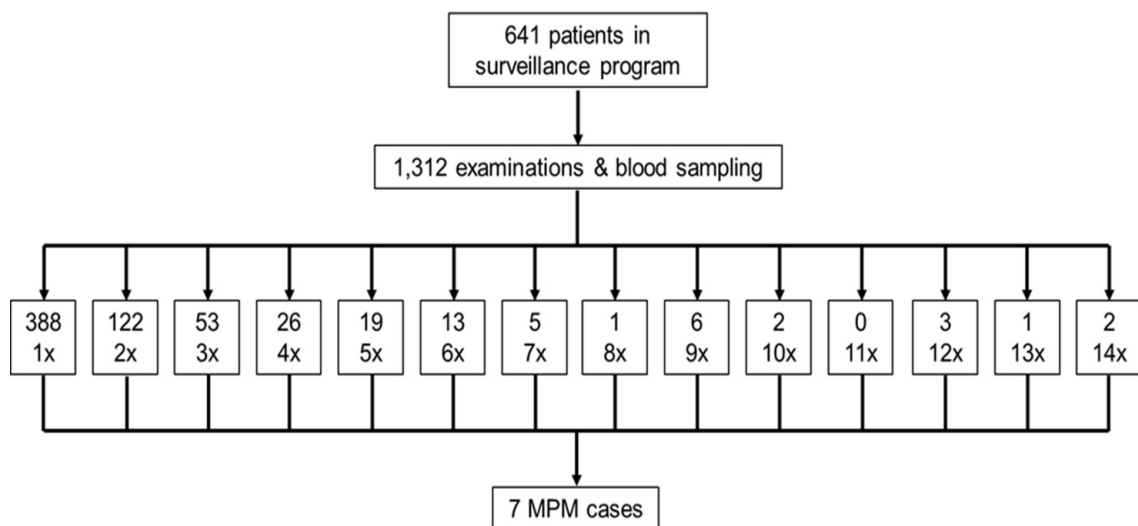
7. MATERIALI E METODI

Popolazione di studio

Tra novembre 2005 e gennaio 2019, una coorte di soggetti esposti all'amianto ($n = 641$) è stata reclutata e monitorata periodicamente presso la Clinica di Medicina del Lavoro, Università Politecnica delle Marche, Ancona. I soggetti esposti all'amianto sono stati sottoposti ad analisi della funzionalità polmonare, radiografia del torace e tomografia computerizzata ad alta risoluzione (HRTC). Nel follow-up di 15 anni, sette soggetti esposti all'amianto hanno sviluppato il MPM (**Figura 10**).

Figura 10. Follow-up dei soggetti esposti all'asbesto

I soggetti esposti all'asbesto che hanno sviluppato il MPM ($n = 7$) avevano un'età di $75.9 \pm$



4.7 anni, intervallo di tempo tra raccolta del sangue e tempo di diagnosi era di 22.4 ± 2.6 mesi. Una popolazione esposta all'asbesto ($n = 33$) è stata selezionata per l'analisi dei biomarcatori. Dei 33 soggetti esposti all'asbesto, 13 soggetti presentavano sia patologie benigne correlate all'asbesto (Asbestos-Related Diseases, ARDs), quali asbestosi, placche pleuriche, e ispessimenti pleurici sia altre patologie polmonari (Pulmonary Diseases, PD), quali BPCO ed enfisema, mentre 4 soggetti mostravano solo PD.

I pazienti con MPM ($n = 32$) sono stati arruolati tra 2008 e 2019 presso la Clinica di Pneumologia e Chirurgia Toracica dell'Ospedale regionale di Ancona. Lo stadio tumorale è

stato determinato in accordo con ‘VI Edition of American Joint Commission on Cancer tumor-nodemetastasis (TNM)’. Dall’esame delle cartelle cliniche di tutti i pazienti si sono raccolte le seguenti informazioni: età alla diagnosi, sesso, storia professionale, stadio della malattia, sopravvivenza globale (Overall Survival, OS) e il periodo del follow-up.

Il gruppo di controllo era costituito da soggetti sani (n = 16) arruolati da novembre 2015 a gennaio 2016 presso la Clinica di Medicina del Lavoro, Università Politecnica delle Marche, Ancona. I soggetti erano sottoposti a sorveglianza sanitaria e nessuno di loro erano mai stati esposti all'asbesto come documentato dall’anamnesi occupazionale. In accordo con Ferrante et al., (Ferrante et al., 2016) per ciascun individuo esposto all'asbesto sono state calcolate la concentrazione delle fibre annue assegnando ad ogni persona un coefficiente arbitrario di “inalato fibre (ff)” in base al rischio professionale.

Un campione di sangue intero è stato raccolto per ciascun soggetto al momento dell'arruolamento e periodicamente durante il follow-up. Il siero isolato dal sangue intero è stato conservato a -80 °C fino all'utilizzo.

Analisi del HMGB1, ATG5 and SMRP

HMGB1, ATG5 e mesotelina sono stati dosati mediante ELISA (My Bio-Fonte, MBS771887 per HMGB1 e MBS7209535 per ATG5; Mesomark per mesothelin) seguendo le istruzioni del produttore e i risultati sono stati espressi in ng/ml o nM.

Analisi dei miRNA

I miRNA sono stati isolati dai campioni di siero come in precedenza descritto (Tomasetti et al., 2012), e retrotrascritto in cDNA utilizzando il kit ‘TaqMan Advanced miRNA cDNA Kit’ (Applied Biosystems; Life Technologies) seguendo le istruzioni del produttore. Le reazioni di qRT-PCR sono state eseguite con la ‘TaqMan Fast Advanced Master gene expression’ (Applied Biosystems; Life Technologies) utilizzando la macchina RT-PCR ‘Realplex Mastercycler epgradient S (Eppendorf)’. Il gene di controllo Cel miR-39 è stato usato per la normalizzazione e i risultati sono stati espressi come $2^{-\Delta Ct}$.

Analisi statistica

I risultati sono stati espressi come media \pm DS. Confronti tra due o più gruppi sono stati eseguiti rispettivamente, utilizzando il test t di 'Student' a due code e test ANOVA con analisi post hoc di Tukey.

Le correlazioni sono state eseguite secondo il coefficiente di Pearson. Le curve ROC (Receiver Operating Characteristic) sono state effettuate per quantificare le prestazioni del biomarcatore nel distinguere i soggetti sani esposti e soggetti sani non esposti all'asbesto da soggetti con caratteristiche preneoplastiche.

L'area sottesa alla curva (AUC) indica la sensibilità media di un biomarcatore e il massimo indice Youden è stato utilizzato per calcolare la sensibilità e specificità. Il modello di regressione logistica con l'analisi statistica di Wald è stato utilizzato per selezionare i biomarcatori. La probabilità prevista di essere soggetto esposto all'amianto e soggetto esposto all'amianto con MPM è stata usata per costruire la curva ROC. L'analisi Kaplan-Meier di sopravvivenza con logrank test è stata usata per valutare le differenze nella sopravvivenza di Pazienti con MPM in base ai cut-off dei biomarcatori. Differenze con $p < 0,05$ sono stati considerati statisticamente significativi. Tutti i dati sono stati analizzati utilizzando il software SPSS.

8. RISULTATI

La popolazione di studio era composta principalmente da maschi (92%), con un'età media di 69.1 ± 10.6 anni, di cui l'86% non fumatori o ex fumatori. L'evidenza radiografica di asbestosi e/o placche pleuriche è stata riscontrata nel 67% dei soggetti esposti all'asbesto e nell'85.2% dei pazienti affetti da MPM. Il MPM era per lo più di istotipo epitelioide (62%) con OS media di $14.6 \pm 9,8$ mesi. Le caratteristiche demografiche, cliniche e patologiche della coorte di studio sono riassunte nella **Tabella 4**.

	Ctrl (n=16)	Exp (n=33)	MPM (n=32)	Pre-diagn (n=7)	Totale (n=88)	p-Value
Età (years)	60.8±17.8	70.2±7.7	70.7±6.7	75.9±4.7	69.1±10.6	p = 0.002
Genere (M/F)	13/3	32/1	29/3	7/0	81/7	p = 0.228
Fumo (n/%)						p = 0.025
Si	6 (38)	1 (4)	5 (16)	0 (0)	12 (14)	
No	5 (31)	16 (48)	11 (34)	5 (71)	37 (42)	
Ex-fumatore	5 (31)	16 (48)	16 (50)	2 (29)	39 (44)	
Esposizione asbesto						
Durata	-	25.9±10.	24.0±12.	19.0±1.8	25.0±11.	p = 0.215
lavorativa	-	3	5	3±8.4	4	p = 0.057
Cf (ff/l) × anno	-	3.5±5.8	5.8±7.6	7/0/0	4.5±6.7	p = 0.001
ARD	-	22/11/0	11/2/19	1/6/0	33/13/19	p = 0.0005
(Si/No/ND)		17/16/0	1/11/20		19/33/36	
PD (Si/No/ND)						
Istotipo (n/%)						
Epiteliale			19 (62)	4 (57)	23 (60)	
Bifasico			6 (19)	0 (0)	6 (16)	
Sarcomatoide			6 (19)	3 (43)	9 (24)	
Overall survival	-	-	14.6±9.8			

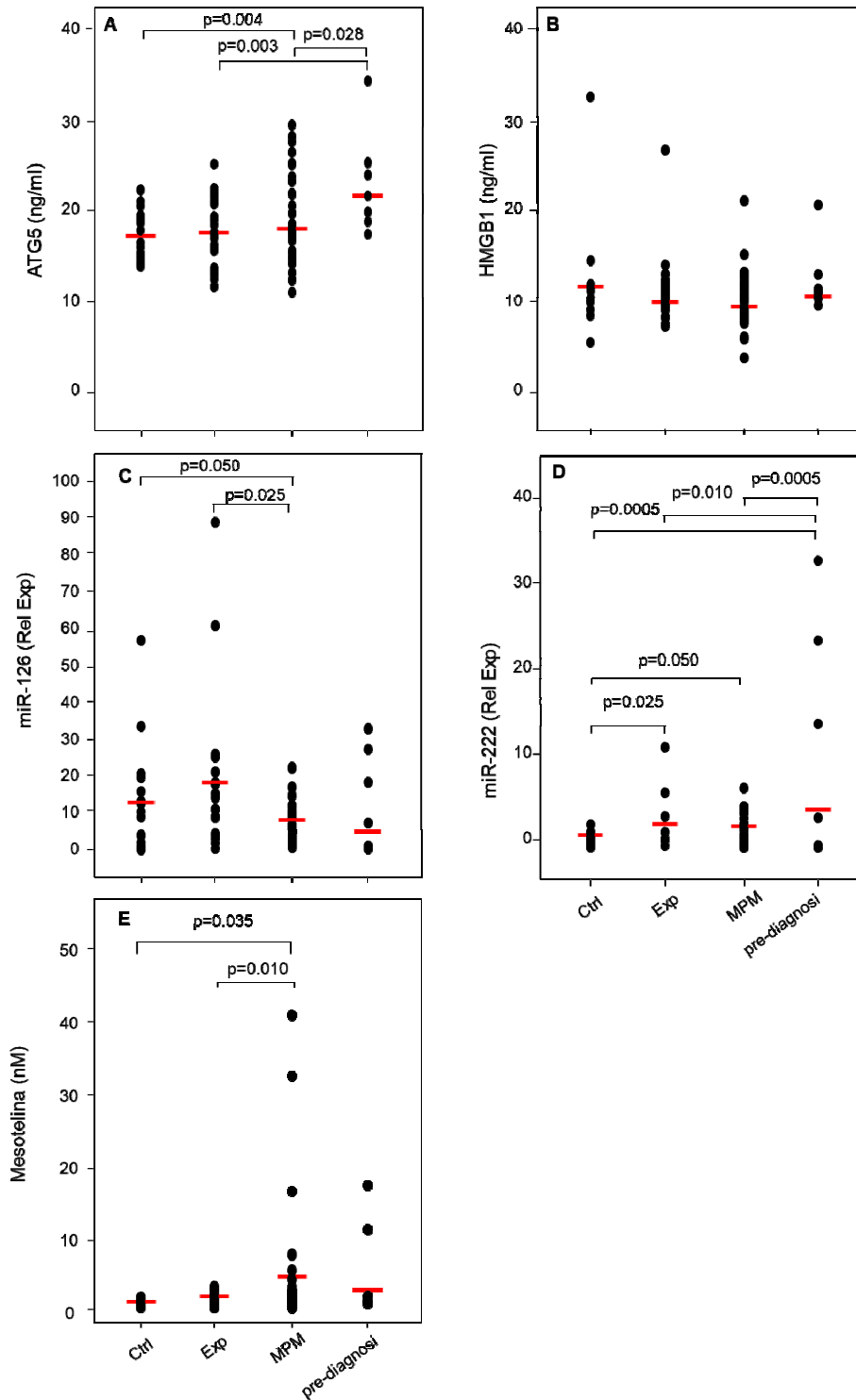
Tabella 4. Caratteristiche demografiche e clinico-patologiche della popolazione di studio

Come mostrato in Figura 11, i biomarcatori infiammatori e autofagici (HMGB1 e ATG5) non erano in grado di discriminare il gruppo esposto all'asbesto (Exp) e il gruppo MPM dal gruppo di controllo (Ctrl). Nessuna variazione del livello sierico di ATG5 (**Figura 11A**) e HMGB1 (**Figura 11B**) è stata osservata tra i gruppi. Diversamente, bassi livelli di miR-126 sono stati trovati in pazienti con MPM rispetto ai soggetti esposti all'asbesto e al gruppo di controllo (**Figura 11C**), mentre alti livelli di miR-222 sono stati rilevati nel siero di soggetti esposti all'asbesto e di pazienti con MPM rispetto ai controlli sani (**Figura 11D**), suggerendo un ruolo di biomarcatore di esposizione. Come riportato in precedenza, la mesotelina era altamente espressa nei pazienti con MPM (**Figura 11E**).

Allo scopo di studiare il ruolo clinico di questi biomarcatori nella diagnosi precoce del MPM, i loro livelli sono stati valutati in campioni pre-diagnosi, che consistevano nel siero raccolto prima della diagnosi clinica (intervallo di tempo tra la raccolta del sangue e il tempo di diagnosi, mediana 22 [20-28, minimo-massimo] mesi).

In particolare, livelli più elevati di ATG5 e miR-222 sono stati trovati nei campioni pre-diagnosi rispetto al gruppo esposti all'asbesto e quello di controllo (**Figura 11A, D**). Sebbene non significativi, i campioni pre-diagnosi hanno mostrato livelli elevati di mesotelina (**Figura 11E**), mentre non sono stati osservati cambiamenti per HMGB1 tra i gruppi (**Figura 11B**).

Figura 11. Distribuzione dei biomarcatori nei gruppi di studio



Livelli sierici di ATG5, HMGB1, miR-126, miR-222 e mesotelina nei controlli sani (Ctrl), soggetti esposti all'asbesto (Exp), campioni pre-diagnostici e pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno (MPM). I confronti tra i gruppi sono stati determinati eseguiti mediante test ANOVA con analisi post hoc Tukey. Le differenze con $p < 0,05$ sono state considerate statisticamente significative.

Alti livelli di ATG5, miR-222 e mesotelina sono stati associati alla presenza di patologie asbesto-correlate (Asbestos-Related Diseases, ARDs) benigne, come asbestosi e/o placche pleuriche (**Tabella 5**).

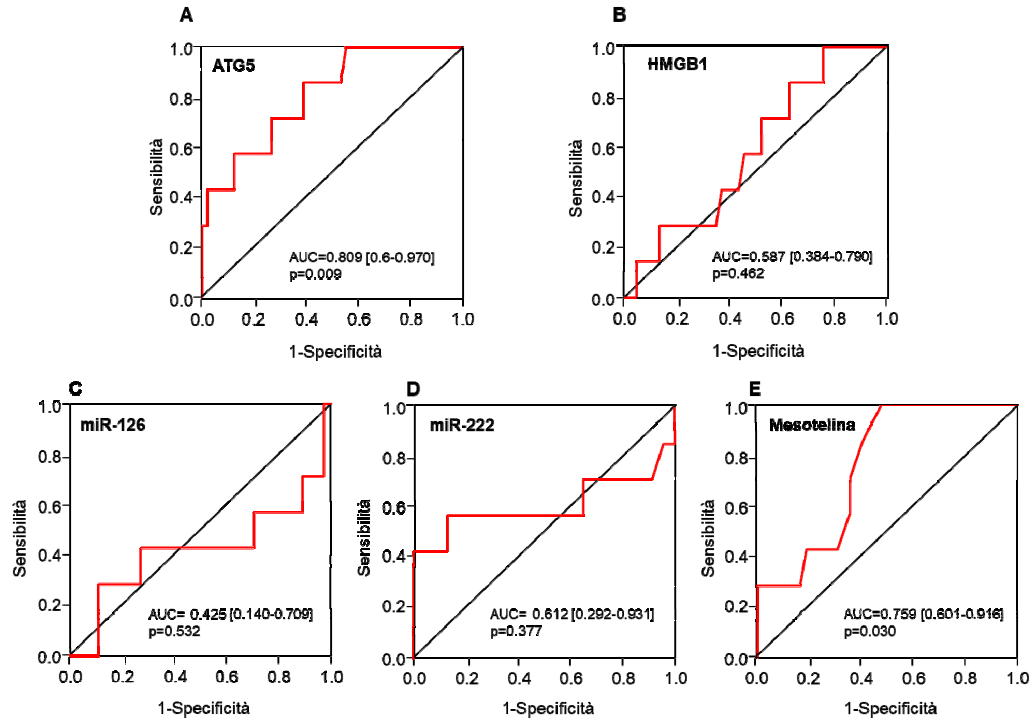
Tabella 5. Livelli di biomarcatori in base alle patologie correlate all'asbesto (ARD)

	non-ARDs	ARDs	p-value
ATG5 (ng/ml)	17.4 [11.9-23.3]	18.6 [12.6-34.2]	0.030
HMGB1 (ng/ml)	11.1 [3.9-32.5]	11.0 [7.3-20.7]	0.470
miR-126 (Rel Exp)	12.8 [0.04-98.2]	9.5 [0.08-60.9]	0.300
miR-222 (Rel Exp)	0.65 [0.01-6.3]	2.1 [0.002-33.1]	0.033
Mesotelina (nM)	0.3 [0.1-1.6]	1.1 [0.001-32.0]	0.050

L'analisi ROC dei biomarcatori ha rivelato che ATG5 e mesotelina erano in grado di discriminare tra campioni pre-diagnosi e soggetti esposti all'asbesto che producevano un'area sottesa alla curva (AUC), rispettivamente di 0.809 (IC 95%, 0.65-0.97) e 0.759 (IC 95%, 0.60-0.92), (Figura 12A-E). I cut-off dei biomarcatori, la sensibilità e la specificità sono stati mostrati in Figura 12F.

Successivamente, è stato applicato un modello di regressione logistica a ritroso con analisi statistica di Wald per stimare la probabilità di essere esposti all'asbesto e di sviluppare MPM utilizzando dati provenienti da biomarcatori significativi (ATG2 e Mesotelina) come valori di cut-off ricavati dalle curve ROC considerando l'età e il fumo come variabili confondenti. Il modello logit (P) di classificazione ottimale è stato ottenuto per discriminare i soggetti esposti all'asbesto dai soggetti esposti all'asbesto con MPM. La probabilità prevista dal modello logit basato su ATG5 ed età è stata utilizzata per costruire la curva ROC (**Figura 12G**).

Figura 12. Analisi curve ROC dei biomarcatori nel discriminare i soggetti esposti all'asbesto da soggetti esposti all'asbesto con tumore maligno

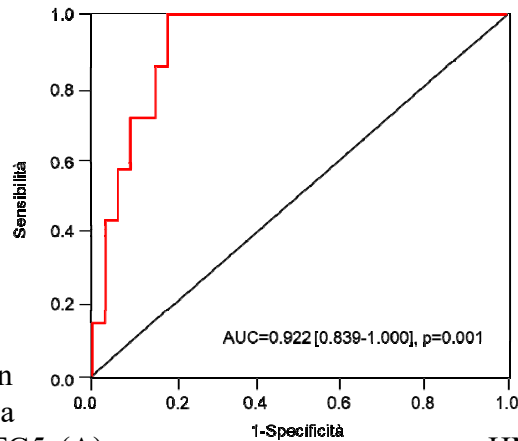


F

Biomarcator	Cut-off	Sens (%)	Spec (%)	p-value
ATG5 (ng/ml)	23	43	98	0.009
HMGB1 (ng/ml)	30	0	98	0.462
miR-126 (Rel Exp)	80	0	98	0.532
miR-222 (Rel Exp)	9	43	98	0.377
Mesotelina (nM)	3	30	98	0.030

G

Variabili	HR	95% CI (HR)	p-value
Age	1.21	0.98-1.48	0.048
Fumo	0.81	0.07-9.32	0.862
ATG5	1.44	1.04-2.00	0.028
Mesotelina	1.31	0.76-2.27	0.335



Curve ROC e area sotto la curva (AUC) con errore standard (SE), intervallo di confidenza (CI), cut-off, sensibilità e specificità di ATG5 (A), HMGB1 (B), miR-126 (C), miR-222 (D), mesotelina (E). Curva ROC e stima AUC del modello logit con ATG5 ed età utilizzando il set di dati per discriminare i soggetti esposti all'amianto da soggetti esposti all'amianto con tumore maligno (F). Le differenze con $p < 0,05$ sono statisticamente significative

L'affidabilità dell'analisi è stata ulteriormente confermata dalla valutazione della matrice di confusione (**Tabella 6**).

Tabella 6. Confusion matrix

Le matrici delle prestazioni, sensibilità, specificità, precisione, valore predittivo negativo,

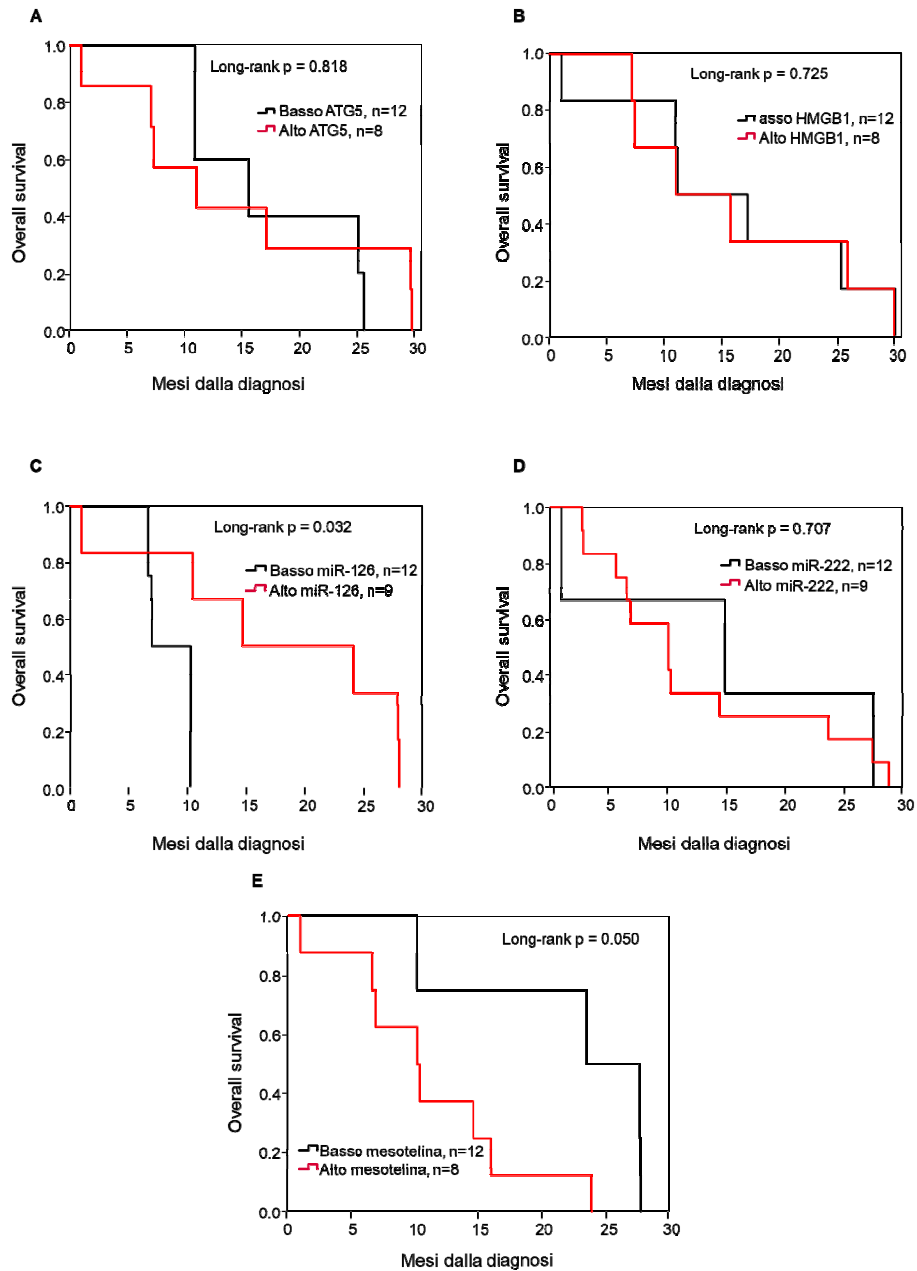
Misura	ATG5	HMGB1	miR-126	miR-222	Mesothelin
Sensibilità	0.833	0.571	0.571	0.571	0.714
Specificità	0.636	0.576	0.524	0.636	0.636
Precisione	0.294	0.222	0.286	0.333	0.294
Valore predittivo Neg	0.955	0.864	0.786	0.824	0.913
Tasso di falso Positivo	0.364	0.424	0.476	0.364	0.364
Tasso Falso Discovery	0.706	0.778	0.714	0.667	0.706
Tasso Falso Negativo	0.167	0.429	0.429	0.429	0.286
Accuratezza	0.667	0.575	0.536	0.621	0.650
F1 Score	0.435	0.320	0.381	0.421	0.417
Matthews Corr. Coeff.	0.342	0,112	0.083	0.181	0.270

tasso di falso positivo, negativo e di scoperta, accuratezza, punteggio F1 e Matthews Corr. Coeff. sono state utilizzati per comprendere meglio le prestazioni di classificazione dei modelli nella classificazione dei campioni di pre-diagnosi e del gruppo esposto all'asbesto

La prognosi di MPM è in gran parte determinata dall'istotipo, in quanto il sottotipo epitelioide è associato ad una più lunga sopravvivenza rispetto all'istotipo non-epitelioide (Murrone et al., 2021; Louw et al., 2022).

Pertanto, l'analisi di sopravvivenza di Kaplan-Meier è stata eseguita considerando solo l'istotipo epitelioide (e-MPM) che è stata stratificata in base ai valori di cut-off delle curve ROC dei diversi biomarcatori (ATG5, HMGB1, miR-126, miR-222 e mesotelina). Dall'analisi si è evidenziato che i livelli di miR-126 e mesotelina erano fortemente associati alla overall survival (OS). Pazienti con basso miR-126 e alto mesotelina avevano un OS significativamente peggiore (**Figura 13**).

Figura 13. Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier per e-MPM stratificate per i livelli dei biomarcatori



Bassi ed alti livelli di ATG5 (A), HMGB1 (B), miR-126 (C), miR-222 (D) e mesotelina (E) associati alla sopravvivenza globale (Overall Survival, OS). I confronti tra i gruppi sono stati effettuati utilizzando il log-rank test considerando valori di $p < 0,05$ statisticamente significante

9. DISCUSSIONE

Nonostante i nuovi approcci terapeutici, come l'immunoterapia nel trattamento in prima linea, la mortalità del MPM rimane elevata (Cantini et al., 2020; Cantini et al., 2022; Meirson et al., 2022; Messori et al., 2022; Kerrigan et al., 2022; Yang et al., 2022; Ye et al., 2022; Baas et al., 2021). Un approccio per migliorare la prognosi consiste nell'individuare la patologia nelle prime fasi. La diagnosi precoce, pertanto, permette di scegliere la terapia più efficace aumentando la risposta terapeutica. È noto che i biomarcatori possono essere utilizzati per individuare lo sviluppo della malattia in soggetti ad alto rischio o di prevedere la risposta al trattamento.

Entrambi HMGB1 e ATG5 sono stati proposti come biomarcatori precoci nella sorveglianza dei lavoratori con una storia di esposizione all'asbesto. Alti livelli di HMGB1 e ATG5 circolanti sono stati trovati in soggetti esposti all'asbesto come conseguenza di una attivazione autofagica (Ying et al., 2017). L'ATG5 svolge un ruolo centrale nell'autofagia, il quale è coinvolto nella formazione di autofagosomi e nella fusione con i lisosomi (Ye et al., 2018). Poiché l'ATG5 è un marcatore autofagico, la sua rilevazione nel sangue dei soggetti esposti ad asbesto può indicare un processo di trasformazione maligna. Un ruolo dell'ATG5 come potenziale biomarcatore precoce è stato valutato nel siero pre-diagnosi di individui che hanno sviluppato MPM durante il follow-up. Alti livelli di ATG5 sono stati rilevati nel siero pre-diagnostico di soggetti esposti all'asbesto che hanno sviluppato MPM (mediana 22 [20–28, minimo massimo] mesi dalla diagnosi) rispetto ai soggetti esposti all'asbesto e ai soggetti sani di controllo. Dall'analisi ROC si evidenzia che solo l'ATG5 significativamente era in grado di distinguere il gruppo pre-diagnosi dai soggetti esposti all'asbesto, suggerendo il suo potenziale ruolo di biomarcatore precoce.

Allo stesso modo, elevati livelli di miR-222 sono stati trovati nel gruppo dei campioni pre-diagnostici rispetto al gruppo esposto e di controllo. Mentre, il miR-126, trovato sotto-espresso nei tumori, non era in grado di discriminare i soggetti esposti all'asbesto dai campioni pre-diagnostici, confermando un precedente studio mirato alla valutazione di tre miRNA, incluso il miR-126, nel rilevare il MPM in campioni di siero pre-diagnostici (Weber et al., 2019).

Un ruolo predittivo di prognosi è stato trovato per la mesotelina, che è l'unico biomarcatore sierico convalidato con valore diagnostico e prognostico per MPM (Pass et al., 2020). Mentre, non è stato ancora chiarito il ruolo dell'HMGB1 come marcatore precoce. È stato riportato che la sua forma iperacetilata differenziava significativamente i pazienti con MPM da individui professionalmente esposti all'asbesto e dai controlli non esposti (Xue et al., 2020). Un ruolo di biomarcatore predittivo della risposta terapeutica è stato descritto per l'adenocarcinoma del polmone (NSCLC) (Handke et al., 2021), sebbene i livelli pre-terapeutici di HMGB1 non siano risultati predittivi o rilevanti per essere utilizzati per la prognosi.

Recentemente, è stato dimostrato che l'autofagia gioca un ruolo importante nella regolazione della morte cellulare e della resistenza alla terapia del MPM (Hegedüs et al., 2022; Xu et al., 2021). L'autofagia ha un duplice ruolo, quando è massiva può indurre a morte cellulare, mentre quando è blanda agisce proteggendo la cellula dall'insulto tossico, quindi la valutazione dei biomarcatori autofagici possono essere proposto per prevedere la risposta terapeutica.

Poiché la sopravvivenza (Overall Survival, OS) del MPM è associata dall'istotipo, il valore prognostico dei biomarcatori è stato valutato in pazienti con istotipo epitelioide, che è quello più frequente. Come anche riportato in precedenza, il miR-126 e la Mesotelina sono stati associati a OS nell'analisi univariata (Santarelli et al., 2015).

La diagnosi precoce e la risposta terapeutica sono cruciali per una prognosi migliore, e l'uso di biomarcatori circolanti nei campioni pre-diagnosi appare un approccio plausibile come riportato in precedenza (Johnen et al., 2018).

Limitazioni dello studio

La forza del nostro studio è data dall'utilizzo dei campioni prediagnosi. Tuttavia, il numero relativamente basso dei casi valutati limita notevolmente il potere statistico. La performance dei biomarcatori deve essere successivamente confermata in una coorte indipendente composta da un numero maggiore di soggetti utilizzando campioni pre-diagnostici seriali.

Bibliografia

Andersson U, Yang H, Harris H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2018;22(3):263-277. doi: 10.1080/14728222.2018.1439924.

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):753-760. doi: 10.5858/arpa.2017-0365-RA.

Baas P, Daumont MJ, Lacoïn L, Penrod JR, Carroll R, Venkatesan S et al. Treatment patterns and outcomes for patients with malignant pleural mesothelioma in England in 2013–2017: A nationwide CAS registry analysis from the I-O Optimise initiative. *Lung Cancer*. 2021;162:185–193. doi:0.1016/j.lungcan.2021.11.001.

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: 375-386.

Cantini L, Belderbos RA, Gooijer CJ, Dumoulin DW, Cornelissen R, Baart S, et al. Nivolumab in pre-treated malignant pleural mesothelioma: real-world data from the dutch expanded access program. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9:1169–79. <https://doi.org/10.21037/tlcr-19-686>.

Cantini L, Laniado I, Murthy V, Serman D, Aerts JGJV. Immunotherapy for mesothelioma: moving beyond single immune check point inhibition. *Lung Cancer*. 2022;165:91–101. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2022.01.016>.

Carbone M, Yang H. Mesothelioma: recent highlights. *Ann Transl Med*. 2017;5(11):238. doi: 10.21037/atm.2017.04.29.

Carinci M, Palumbo L, Pelliello G, Agyapong ED, Morciano G, Patergnani S, Giorgi C, Pinton P, Rimessi A. The Multifaceted Roles of Autophagy in Infectious, Obstructive, and Malignant Airway Diseases. *Biomedicines*. 2022;10(8):1944. doi: 10.3390/biomedicines10081944

Comments on the Health Effects Institute-Asbestos Research (HEI-AR) report: "Asbestos in public and commercial buildings," with emphasis on risk assessment methods used. Sterling TD, Collett CW, Rosenbaum WL, Weinkam JJ. *Am J Ind Med.* 1993 Dec;24(6):767-81. doi: 10.1002/ajim.4700240613.

Creaney J, Dick IM, Meniawy TM, et al. Comparison of fibulin-3 and mesothelin as markers in malignant mesothelioma. *Thorax* 2014; 69: 895–902.

Creaney J, Yeoman D, Musk AW, et al. Plasma versus serum levels of osteopontin and mesothelin in patients with malignant mesothelioma—which is best? *Lung Cancer* 2011; 74: 55–60.

Cristaudo A, Bonotti A, Simonini S, Vivaldi A, Guglielmi G, Ambrosino N, Chella A, Lucchi M, Mussi A, Foddìs R. Combined serum mesothelin and plasma osteopontin measurements in malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2011;6(9):1587-93. doi:10.1097/JTO.0b013e31821e1c08.

Cristaudo A, Foddìs R, Bonotti A, et al. Comparison between plasma and serum osteopontin levels: usefulness in diagnosis of epithelial malignant pleural mesothelioma. *Int J Biol Markers* 2010; 25: 164–170.

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(3):147-53. doi: 10.1136/oemed-2015-102803.

Ferro P, Canessa PA, Battolla E, et al. Mesothelin is more useful in pleural effusion than in serum in the diagnosis of pleural mesothelioma. *Anticancer Res* 2013; 33: 2707–2713.

Gilham C, Rake C, Hodgson J, Darnton A, Burdett G, Peto Wild J, Newton M, Nicholson AG, Davidson L, Shires M, Treasure T, Peto J; TIPS Collaboration. Past and current asbestos exposure and future mesothelioma risks in Britain: The Inhaled Particles Study (TIPS). *Int J Epidemiol.* 2018 Dec 1;47(6):1745-1756. doi: 10.1093/ije/dyx276

Grigoriu BD, Grigoriu C, Chahine B, Gey T, Scherpereel A. Clinical utility of diagnostic markers for malignant pleural mesothelioma. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 2009;71:31–38.

Grigoriu BD, Scherpereel A, Devos P, et al. Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2928–2935.

Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I, Nicholson AG, Knuutila S. CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma -A miRNA microarray analysis. *Gene. Chromosome. Canc.* 2009;48:615–623. doi: 10.1002/gcc.20669.

Han Y, Zhang T, Chen H, Yang X. Global magnitude and temporal trend of mesothelioma burden along with the contribution of occupational asbestos exposure in 204 countries and territories from 1990 to 2019: Results from the Global Burden of Disease Study 2019. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2022;179:103821. doi: 10.1016/j.critrevonc.2022.103821.

Handke NA, Rupp ABA, Trimpop N, von Pawel J, Holdenrieder S. Soluble high mobility group box 1 (HMGB1) is a promising biomarker for prediction of therapy response and prognosis in advanced lung cancer patients. *Diagnostics (Basel).* 2021;11:356. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11020356>.

Hathaway F, Martins R, Sorscher S, Bzura A, Dudbridge F, Fennell DA. Family Matters: Germline Testing in Thoracic Cancers. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2023;43:e389956. doi: 10.1200/EDBK_389956.

Hegedüs L, Szücs KD, Kudla M, Heidenreich J, Jendrossek V, Peña-Llopis S, et al. Nintedanib and dasatinib treatments induce protective autophagy as a potential resistance mechanism in MPM cells. *Front Cell Dev Biol.* 2022;10:852812. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.852812>.

Hillegass J.M 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.

Hiltbrunner S, Mannarino L, Kirschner MB, Opitz I, Rigutto A, Laure A, Lia M, Nozza P, Maconi A, Marchini S, D'Incalci M, Curioni-Fontecedro A, Grosso F. Tumor Immune Microenvironment and Genetic Alterations in Mesothelioma. *Front Oncol.* 2021;11:660039. doi:10.3389/fonc.2021.660039.

Hollevoet K, Reitsma JB, Creaney J, Grigoriu BD, Robinson BW, Scherpereel A, Cristaudo A, Pass HI, Nackaerts K, Rodríguez Portal JA, Schneider J, Muley T, Di Serio F, Baas P, Tomasetti M, Rai AJ, van Meerbeeck JP. Serum mesothelin for diagnosing malignant pleural mesothelioma: an individual patient data meta-analysis. *J Clin Oncol.* 2012;30(13):1541-9. doi: 10.1200/JCO.2011.39.6671.

Jiang ZQ, Ying SB, Shen W, et al. Plasma fibulin-3 as a potential biomarker for patients with asbestos-related diseases in the Han population. *Dis Markers* 2017; 8: 1725354.

Johnen G, Burek K, Raiko I, Wichert K, Pesch B, Weber DG, et al. MoMar Study Group. Prediagnostic detection of mesothelioma by circulating calretinin and mesothelin - a case-control comparison nested into a prospective cohort of asbestos-exposed workers. *Sci Rep.* 2018;8:14321. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32315-3>.

Kerrigan K, Jo Y, Chipman J, Haaland B, Puri S, Akerley W, Patel S. A real-world analysis of the use of systemic therapy in malignant pleural mesothelioma and the Differential Impacts on overall survival by practice pattern. *JTO Clin Res Rep.* 2022;3:100280. <https://doi.org/10.1016/j.jtocrr.2022.100280>.

Lofiego MF, Cannito S, Fazio C et al. Epigenetic immune remodeling of mesothelioma cells: a new strategy to improve the efficacy of immunotherapy. *Epigenomes.* 2021; 5: 27

Louw A, Panou V, Szejniuk WM, Meristoudis C, Chai SM, van Vliet C, et al. BAP1 loss by immunohistochemistry predicts improved survival to first line platinum/pemetrexed chemotherapy for pleural mesothelioma patients: a validation study. *J Thorac Oncol.* 2022;17:921–30. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.04.008>.

Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR., Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435:834–838. doi: 10.1038/nature03702.

Marinaccio, A.; Corfiati, M.; Binazzi, A.; Di Marzio, D.; Scarselli, A.; Ferrante, P.; Bonafede, M.; Verardo, M.; Mirabelli, D.; Gennaro, V.; et al. The Epidemiology of Malignant Mesothelioma in Women: Gender Differences and Modalities of Asbestos Exposure. *Occup. Environ. Med.* 2018, 75, 254–262.

Martínez-Fernández C, Jha S, Aliagas E, Holmberg CI, Nadal E, Cerón J. BAP1 Malignant Pleural Mesothelioma Mutations in *Caenorhabditis elegans* Reveal Synthetic Lethality between *ubh-4/BAP1* and the Proteasome Subunit *rpn-9/PSMD13*. *Cells*. 2023;12(6):929. doi: 10.3390/cells12060929

Meirson T, Pentimalli F, Cerza F, Baglio G, Gray SG, Correale P, et al. Comparison of 3 randomized clinical trials of Frontline Therapies for Malignant Pleural Mesothelioma. *JAMA Netw Open*. 2022;5:e221490. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.1490>.

Melius J. Occupational health for firefighters. *Occup Med*. 2001;16(1):101-8.

Messori A, Trippoli S. J Current treatments for inoperable mesothelioma: indirect comparisons based on individual patient data reconstructed retrospectively from 4 trials. *Chemother*. 2022;1–5. <https://doi.org/10.1080/1120009X.2022.2061183>.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008;105:10513–10518. doi: 10.1073/pnas.0804549105.

Murrone A, Cantini L, Pecci F, Cognigni V, Copparoni C, Rinaldi S, et al. BRCA associated protein 1 (BAP1) and miR-31 combination predicts outcomes in epithelioid malignant pleural Mesothelioma. *J Thorac Dis*. 2021;13:5741–51. <https://doi.org/10.21037/jtd-21-555>.

Napolitano A, Antoine DJ, Pellegrini L, et al. HMGB1 and its hyperacetylated isoform are sensitive and specific serum biomarkers to detect asbestos exposure and to identify mesothelioma patients. *Clin Cancer Res* 2016; 22: 3087–3096.

Novelli F, Bononi A, Wang Q, Bai F, Patergnani S, Kricek F, Haglund E, Suarez JS, Tanji M, Xu R, Takanishi Y, Minaai M, Pastorino S, Morris P, Sakamoto G, Pass HI, Barbour H, Gaudino G, Giorgi C, Pinton P, Onuchic JN, Yang H, Carbone M. BAP1 forms a trimer with HMGB1 and HDAC1 that modulates gene × environment interaction with asbestos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(48):e2111946118. doi: 10.1073/pnas.2111946118.

Nowak AK, Jackson A, Sidhu C. Management of advanced pleural mesothelioma—at the crossroads. *J Oncol Pract.* 2021; 18: 116-125

Oddone E, Bollon J, Nava CR, Consonni D, Marinaccio A, Magnani C, Gasparini A, Barone-Adesi F. Effect of Asbestos Consumption on Malignant Pleural Mesothelioma in Italy: Forecasts of Mortality up to 2040. *Cancers (Basel).* 2021;13(13):3338. doi: 10.3390/cancers13133338.

Paleari L, Rotolo N, Imperatori A, et al. Osteopontin is not a specific marker in malignant pleural mesothelioma. *Int J Biol Markers* 2009; 24: 112–117.

Pass HI, Alimi M, Carbone M, Yang H, Goparaju CM. Thorac Surg Clin Mesothelioma biomarkers: Discovery in search of validation. 2020;30:395–423. <https://doi.org/10.1016/j.thorsurg.2020.08.001>.

Pass HI, Levin SM, Harbut MR, et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N Engl J Med* 2012; 367: 1417–1427

Pukkala E, Martinsen JI, Weiderpass E, Kjaerheim K, Lynge E, Tryggvadottir L, Sparén P, Demers PA. Cancer incidence among firefighters: 45 years of follow-up in five Nordic countries. *Occup Environ Med.* 2014 Jun;71(6):398-404. doi: 10.1136/oemed-2013-101803.

Santarelli L, Gaetani S, Monaco F, Bracci M, Valentino M, Amati M, Rubini C, Sabbatini A, Pasquini E, Zanotta N, Comar M, Neuzil J, Tomasetti M, Bovenzi M. Four-miRNA Signature to Identify Asbestos-Related Lung Malignancies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2019;28(1):119-126. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-18-0453.

Santarelli L, Staffolani S, Strafella E, Nocchi L, Manzella N, Grossi P, Bracci M, Pignotti E, Alleva R, Borghi B, Pompili C, Sabbatini A, Rubini C, Zuccatosta L, Bichisecchi E, Valentino M, Horwood K, Comar M, Bovenzi M, Dong LF, Neuzil J, Amati M, Tomasetti M. Combined circulating epigenetic markers to improve mesothelin performance in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Lung Cancer.* 2015;90(3):457-64. doi: 10.1016/j.lungcan.2015.09.021.

Santarelli L, Staffolani S, Strafella E, Nocchi L, Manzella N, Grossi P, et al. Combined circulating epigenetic markers to improve mesothelin performance in the diagnosis of

malignant mesothelioma. Lung Cancer. 2015;90:457–64.
<https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.09.021>.

Santarelli L, Strafella E, Staffolani S, Amati M, Emanuelli M, Sartini D, Pozzi V, Carbonari D, Bracci M, Pignotti E, Mazzanti P, Sabbatini A, Ranaldi R, Gasparini S, Neuzil J, Tomasetti M. Association of MiR-126 with soluble mesothelin-related peptides, a marker for malignant mesothelioma. PLoS One. 2011;6(4):e18232. doi: 10.1371/journal.pone.0018232.

Schillebeeckx E, van Meerbeeck JP, Lamote K. Clinical utility of diagnostic biomarkers in malignant pleural mesothelioma: a systematic review and meta-analysis. Eur Respir Rev. 2021;30(162):210057. doi: 10.1183/16000617.0057-2021.

Tomasetti M, Gaetani S, Monaco F, Neuzil J, Santarelli L. Epigenetic Regulation of miRNA Expression in Malignant Mesothelioma: miRNAs as Biomarkers of Early Diagnosis and Therapy. Front Oncol. 2019;9:1293. doi: 10.3389/fonc.2019.01293.

Tomasetti M, Staffolani S, Nocchi L, et al. Clinical significance of circulating miR-126 quantification in malignant mesothelioma patients. Clin Biochem 2012; 45: 575–581.

Tomasetti M, Staffolani S, Nocchi L, Neuzil J, Strafella E, Manzella N, et al.

Clinical significance of circulating miR-126 quantification in malignant mesothelioma patients. Clin Biochem. 2012;45:575–81.
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.02.009>.

Wang Y, Wu W, Gong J. Live or death in cells: from micronutrition metabolism to cell fate. Front Cell Dev Biol. 2023;11:1185989. doi: 10.3389/fcell.2023.1185989.

Weber DG, Brik A, Casjens S, Burek K, Lehnert M, Pesch B, et al. Are circulating microRNAs suitable for the early detection of malignant mesothelioma? Results from a nested case-control study. BMC Res Notes. 2019;12:77. <https://doi.org/10.1186/s13104-019-4113-7>.

Weber DG, Brik A, Casjens S, Burek K, Lehnert M, Pesch B, Taeger D, Brüning T, Johnen G; MoMar study group. Are circulating microRNAs suitable for the early detection of malignant mesothelioma? Results from a nested case-control study. BMC Res Notes. 2019;12(1):77. doi: 10.1186/s13104-019-4113-7.

Weber DG, Casjens S, Johnen G, et al. Combination of MiR-103a-3p and mesothelin improves the biomarker performance of malignant mesothelioma diagnosis. *PLOS One* 2014; 9: 15.

Weber DG, Gawrych K, Casjens S, et al. Circulating miR-132-3p as a candidate diagnostic biomarker for malignant mesothelioma. *Dis Markers* 2017; 15: 9280170.

Xu D, Liang SQ, Yang Z, Yang H, Bruggmann R, Oberhaensli S, et al. Malignant pleural mesothelioma co-opts BCL-XL and autophagy to escape apoptosis. *Cell Death Dis.* 2021;12:406. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03668-x>.

Xu R, Barg FK, Emmett EA, Wiebe DJ, Hwang WT. Association between mesothelioma and non-occupational asbestos exposure: systematic review and meta-analysis. *Environ Health.* 2018;19:17(1):90. doi: 10.1186/s12940-018-0431-9.

Xue J, Patergnani S, Giorgi C, Suarez J, Goto K, Bononi A, Tanji M, Novelli F, Pastorino S, Xu R, Caroccia N, Dogan AU, Pass HI, Tognon M, Pinton P, Gaudino G, Mak TW, Carbone M, Yang H. Asbestos induces mesothelial cell transformation via HMGB1-driven autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(41):25543-25552. doi: 10.1073/pnas.2007622117.

Yang L, Cao X, Li N, Zheng B, Liu M, Cai H. Cost-effectiveness analysis of nivolumab plus ipilimumab versus chemotherapy as the first-line treatment for unresectable malignant pleural mesothelioma. *Ther Adv Med Oncol.*2022;14:17588359221116604. <https://doi.org/10.1177/17588359221116604>.

Ye X, Zhou XJ, Zhang H. Exploring the role of autophagy-related gene 5 (ATG5) yields important insights into autophagy in autoimmune/autoinflammatory diseases. *Front Immunol.* 2018;9:2334. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02334>.

Ye ZM, Tang ZQ, Xu Z, Zhou Q, Li H. Cost-effectiveness of nivolumab plus ipilimumab as first-line treatment for american patients with unresectable malignant pleural mesothelioma. *Front Public Health.* 2022;10:947375. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2022.947375>.

Ying S, Jiang Z, He X, Yu M, Chen R, Chen J, et al. Serum HMGB1 as a potential biomarker for patients with asbestos-related diseases. *Dis Markers*. 2017;2017:5756102. <https://doi.org/10.1155/2017/5756102>.

Zolondick AA, Gaudino G, Xue J, Pass HI, Carbone M, Yang H. Asbestos-induced chronic inflammation in malignant pleural mesothelioma and related therapeutic approaches-a narrative review. *Precis Cancer Med*. 2021;4:27. doi: 10.21037/pcm-21-12.

Zolondick AA, Gaudino G, Xue J, Pass HI, Carbone M, Yang H. Asbestos-induced chronic inflammation in malignant pleural mesothelioma and related therapeutic approaches-a narrative review. *Precis Cancer Med*. 2021;4:27. doi: 10.21037/pcm-21-12.