



UNIVERSITÀ DI PISA

Scuola di Specializzazione in  
Chirurgia Toracica

*Facoltà di Medicina e Farmacia  
Dipartimento di patologia Chirurgica, Medica,  
Molecolare e dell'Area Critica*

---

Tesi di Specializzazione

**LA CHEMIOTERAPIA IPERTERMICA INTRA-OPERATORIA NEL  
TRATTAMENTO DEL MESOTELIOMA PLEURICO MALIGNO:  
ESPERIENZA DI UN SINGOLO CENTRO**

Relatore

Prof. Alfredo Mussi

---

Specializzando

Dott. Stylianos Korasidis

Matricola: 463055

---

Anno Accademico 2014-2015

## **INDICE**

1. Introduzione.....	4
1.1 Cenni Storici.....	4
1.2 Fibre di Asbesto e non, esposizione e epidemiologia.....	6
1.3 Radiazioni Ionizzanti e Mesotelioma.....	9
1.4 Vaccino anti-Polio, SV40 e Mesotelioma.....	9
2. Fisiopatologia.....	10
2.1 Fisiologia della pleura e Clearance delle Fibre.....	10
2.2 Origine e sede delle cellule del Mesotelioma.....	11
2.3 Cancerogenesi nel mesotelioma e profilo molecolare.....	12
2.4 Suscettibilità per il Mesotelioma e la S. BAP1.....	16
3. Marcatori Biologici.....	17
3.1 Mesotelina sierica.....	17
3.2 Proteina 13 sierica.....	19
3.3 Fibulina-3 plasmatica.....	19
3.4 mRNA Plamatici.....	20
4. Artificiali tubuli di carbonio (CNT's) .....	20
5. Diagnosi.....	21
6. Stadiazione.....	24
7. Terapia.....	25
7.1 Chemioterapia.....	25
7.2 Resezione Chirurgica.....	25
7.3 Radioterapia.....	26
7.4 Trattamento multidisciplinare.....	26

8. Prognosi.....	27
9. HITHOC.....	27
9.1 Background.....	27
9.2 Materiali e Metodi.....	27
9.3 Scopo del Lavoro.....	28
9.4 Accertamenti pre-operatori.....	28
9.5 Tecnica Chirurgica.....	29
9.6 Dispositivi.....	30
9.7 Tecnica di Perfusione.....	31
9.8 Trattamento post-operatorio.....	32
9.9 Follow-up.....	32
9.10 Risultati.....	32
10. Conclusioni.....	34
Bibliografia.....	36

# LA CHEMIOTEAPIA IPERTERMICA INTRA-OPERATORIA NEL TRATTAMENTO DEL MESOTELIOMA PLEURICO MALIGNO: ESPERIENZA DI UN SINGOLO CENTRO

## *1. Introduzione*

### *1.1 Cenni Storici*

*Asbestos* (dalla parola Greca che significa “indelebile”) è il termine utilizzato per una famiglia di minerali con la proprietà naturale di disgregarsi in piccole fibre spontaneamente e ampia diffusione in tutto il mondo. Il termine *amiantos* (dalla parola Greca che significa “colui che non si macchia”) è stato utilizzato da Plinio il Vecchio (23-79 DC, per descrivere il materiale minato dalle montagne dell’Arcadia, il quale poteva essere filato in materiali e tessuti ed era anche resistente al fuoco. Il geografo Greco Strabo (63/64 BC-ca. 24 DC) ha descritto nel suo libro *De Materia Medica* l’uso della cosiddetta “Pietra di Karisto”, ricavata dall’antica cava sull’isola di Evvia in Grecia e Dioscoride (ca. 40-90 DC), per la tessitura di tovaglioli che potrebbero essere puliti e sbiancati dal fuoco [1]. In Finlandia e in Norvegia, l’amianto è stato utilizzato in ceramiche 4500 anni fa; nel periodo Romano più recente e nel periodo delle migrazioni, l’amianto schiacciato è stato utilizzato in ceramica per dei contenitori di immagazzinamento e preparazione dei cibi (ca. 350–475 DC) [2]. Anche Marco Polo (1254–1324 DC) descrisse una miniera di amianto in Cina, per cui vi è una chiara evidenza sull’uso dello stesso tra le varie culture, fin dai tempi antichi [3]. Tuttavia, l’estrazione mineraria di massa e l’utilizzo non è stato diffuso fino al 20° secolo quando è stato diffuso l’utilizzo dell’amianto come isolante termico, ignifugo, anticorrosivo, e per la sua resistenza alla trazione. L’amianto è stato ampiamente utilizzato per l’isolamento di tubi d’acqua e di combustione; è stato inoltre utilizzato in materiali per la costruzione e la cantieristica navale, freni d’auto, guarnizioni, persino giocattoli, gioielli e filtri di sigarette; al suo picco contava 3000 prodotti registrati [4].

La prima evidenza di correlazione tra l'amianto ed una neoplasia pleurica è nel 1767 ad opera di Joseph Lieutand; tuttavia Klemperer e Rabin sono stati i primi a caratterizzare come entità il mesotelioma nel 1931 [5]. Ci sono voluti altri 30 anni per riconoscere come entità neoplastica maligna separata. La correlazione epidemiologica col' amianto è arrivata da uno studio effettuato in Sud Africa e pubblicato nel 1960 da JC Wagner, CA Sleggs e P. Marchand , dimostrando che il mesotelioma era molto diffuso tra le persone che vivevano e/o lavoravano nelle zone limitrofe alla miniera dove veniva estratta la variante crocidolite dell'amianto [6]. In seguito, diversi studi provenienti dagli Stati Uniti, l'Europa, l'Australia ed il Giappone hanno dimostrato il rapporto causa/effetto tra amianto e mesotelioma [5, 7-11]. 'E stato inoltre descritto il ruolo dell'amianto come cancerogeno nell'eziopatogenesi del carcinoma polmonare da solo, o in associazione con il tabagismo; in quest'ultimo caso incrementando il rischio di carcinoma polmonare da 10 a 100 volte rispetto alla popolazione non esposta all'amianto [12]. L'inalazione di fibre d'amianto può inoltre contribuire all'eziopatogenesi di: mesotelioma peritoneale maligno (circa il 30 % di tutti i mesoteliomi); placche pleuriche (lesioni benigne, non necessariamente precancerose); ed asbestosi, una pneumoconiosi che potrebbe risultare fatale e che sembra aumentare il rischio di cancro della faringe, dello stomaco, del colon e dell'ovaio com'è stato descritto anche nel *IARC Monograph del 2012* [10].

**Figura 1.** Contenitori in ceramica dall'età del bronzo al periodo romano ( 400-575 dC ) utilizzati per la cottura e la conservazione degli alimenti, con un contenuto di amianto stimato di 65-80 %.



## ***1.2 Fibre di Asbesto e non, esposizione e epidemiologia***

L'amianto è suddiviso in due grandi gruppi di fibre, serpentine ed anfibole. Le serpentine sono composte da un singolo tipo, il crisotile, con caratteristiche fibre corte, con forma elicoidale soprannominate "*l'asbesto bianco*" a causa del loro colore; questo tipo rappresenta circa il 95 % dell'amianto ad uso commerciale. Le anfibole, con fibre rette e lunghe, comprendono il crocidolite o "*asbesto blu*", l'amosite, il tremolite, l'actinolite e l'antofillite; recentemente è stata pubblicata una revisione delle loro proprietà fisiche e biologiche [10].

Il rischio d'insorgenza del mesotelioma era precedentemente associato al tipo di fibre, ritenendo quelle più corte meno cancerogene. Questo è successo principalmente a causa di alcune ricerche in cui risultavano elevati i livelli di fibre lunghe (anfibole) nei polmoni dei pazienti deceduti e dagli esperimenti sugli animali da Stanton e Wrench [13] che portavano all "*Ipotesi delle fibre di Stanton*". Inoltre certi ricercatori sostenevano che il crisotile fosse in grado di indurre la cancerogenesi mesoteliale qualora fosse contaminato da fibre anfibole, "*ipotesi della contaminazione da tremoliti*"[14]. Nonostante questi diversi studi, comprendenti quello di Wagner e col.[15] del 1974, abbiano portato alla conclusione che il crisotile è un importante cancerogeno ed un fattore di rischio, non solo per il mesotelioma, ma anche per il carcinoma polmonare, l'attuale posizione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) e dell'International Agency for Research on Cancer (IARC) è che tutti i tipi di amianto siano classificati come cancerogeni di Classe I [10], e che l'esposizione all'amianto sia il principale fattore di rischio per l'insorgenza di mesotelioma pleurico e peritoneale [16]. Questi risultati e affermazioni hanno portato al divieto della produzione e dell'importazione di amianto in diversi paesi Europei dal 1970, fino al divieto definitivo dal 2005 [10,17].

È nota la correlazione tra dose/esposizione e rischio d'insorgenza del mesotelioma e del carcinoma polmonare, ma non è stata mai riconosciuta una sicura soglia minima di esposizione, com'è stato constatato anche dall'OMS e dall'IARC. Inoltre, Bernstein e col. [18] hanno

dimostrato che non sono a rischio solo i lavoratori dell'amianto ma anche le loro famiglie (pulizia delle divise di lavoro contaminate) come anche gli abitanti delle zone limitrofe alle miniere ed ai posti di lavorazione dell'amianto. In Italia, a Casal Monferrato (Eternit), Broni e Bari (Fibronit), il mesotelioma risultava epidemico tra gli abitanti che non fossero mai stati esposti alle fabbriche di amianto locali, dove il 25% e il 33% dei casi, rispettivamente, avevano un solo fattore di rischio: vivere vicino a una fabbrica di cemento d'amianto. Il rischio calcolato era molto elevato (OR 10,5 e 5,25, rispettivamente) per coloro che vivevano a meno di 500 m dalla fabbrica e il quantitativo di fibre nei polmoni dei pazienti deceduti era 10 volte superiore che in quelli di altre zone [19].

Nella maggiore parte degli studi epidemiologici, il mesotelioma è più comune tra i pazienti di sesso maschile (M/F: 5/1) con un'apparente suscettibilità sesso-correlata. Tuttavia, altri studi dimostrano che questo potrebbe essere correlato all'esposizione e, in genere, vi è una bassa esposizione all'amianto nelle donne per il fatto che le mansioni che conferiscono un'esposizione superiore sono tradizionalmente occupate da lavoratori maschi. Si è visto che in occupazioni dove l'esposizione si eguagliava, la maggior parte dei pazienti erano donne[15].

L'estensione dell'importazione e dell'uso di amianto in un paese è strettamente correlata alla incidenza del mesotelioma. In Norvegia per esempio è stato visto che il picco d'importazione di amianto è stato nel 1970-1975 ed il picco di casi di mesotelioma è oggi, 40 anni dopo. Indagini epidemiologiche hanno stimato che il picco di incidenza in Europa sarà raggiunto intorno al 2020 [20].

L'amianto può inoltre contribuire all'eziopatogenesi del carcinoma polmonare; si stima che circa 20.000 tumori polmonari e 10 000 mesoteliomi in Europa occidentale, Scandinavia, Nord America, Giappone e Australia [21], siano dovuti all'esposizione all'amianto; mentre non sono disponibili i dati relativi, dalle aree che ancora utilizzano l'amianto (Est Europa, Sud America, Africa, e il resto dell'Asia, compresa la Cina). L'OMS riporta che circa 125 milioni persone

vengano a contatto con l'amianto sul luogo di lavoro. Nel 2004, il cancro del polmone amianto-correlato, il mesotelioma e l'asbestosi da esposizione professionale hanno provocato circa 107.000 morti e 1.523.000 anni di vita di disabilità relative. Inoltre, diverse migliaia di morti possono essere attribuiti ad altre malattie legate all'amianto [22]. Attualmente, l'incidenza del mesotelioma è ancora in aumento nella maggior parte dei paesi del mondo. Solo nei paesi in cui sono state prese misure di controllo e sicurezza per l'amianto dal 1970, come la Svezia e il Regno Unito, è arrivata ad un plateau [23]. L'epidemia mondiale è apparentemente al suo inizio [24, 25]. Nei paesi che producono e / o utilizzano ancora l'amianto, come Cina, India, Russia, Zambia, Colombia e Kazakhstan, ci si dovrebbe aspettare un forte aumento dell'incidenza [26, 29].

L'esposizione ambientale alle fibre cancerogene presenti sulla superficie terrestre è un altro fattore di rischio meno quantificabile. Una vecchia tradizione di imbiancare le case con tremolite in Metsovo (Grecia), aveva come conseguenza un aumento dell'incidenza tra le giovani donne del posto, in quanto addette a questa mansione [30]. Un altro studio importante di Luo e col. [26], documentava che i contadini esposti a terreni contenenti Crocidolite in Da Yao, nella provincia Cinese, presentavano un'incidenza del mesotelioma di 365 casi per milione. Erionite, un minerale asbesto-simile contenuto nel terreno è stato identificato come il fattore di rischio più importante per il mesotelioma in giovani pazienti in alcuni villaggi in Cappadocia (Turchia), dove più del 50% degli abitanti muore per mesotelioma [31]. Lo studio genetico degli alberi genealogici in questi villaggi ha dimostrato una maggior incidenza di tale malattia in certe famiglie del posto, indicando una suscettibilità genetica, con apparente trasmissione autosomica dominante [32]. Recentemente, una novità nello studio della suscettibilità per il mesotelioma ha dimostrato che mutazioni nel gene BAP1 (BRCA1 – associated protein 1) sono state fortemente associate al mesotelioma [ 33 ] .



### ***1.3 Radiazioni Ionizzanti e Mesotelioma***

Gli effetti a lungo termine delle radiazioni ionizzanti sono stati eziologicamente legati al mesotelioma, sebbene in un numero minore di individui rispetto a quelli esposti all'amianto. Il rischio di sviluppare mesotelioma era significativamente superiore nei casi precedentemente esposti ad agenti emittenti alfa particelle, come il mezzo di contrasto radioattivo Thorotrast. È stato inoltre documentato che il mesotelioma si riscontra con elevata incidenza in pazienti con pregressi tumori testicolari e linfomi di Hodgkin, perchè sottoposti a radioterapia [17,34-36].

### ***1.4 Vaccino anti-Polio, SV40 e Mesotelioma***

Un'interessante, ma anche molto preoccupante, ipotesi formulata nel 1994 sostiene che verso la fine degli anni '70 è stato accidentalmente somministrato a milioni di pazienti un virus cancerogeno che potrebbe essere correlato con l'insorgenza del mesotelioma [37].

Il primo vaccino anti-Polio con il virus inattivo (*inactivated poliovirus vaccine-IPV*) ed il vaccino anti-Polio orale, erano entrambi preparati in colture cellulari primarie derivanti dai reni di Scimmie Rh. Lo studio di questi vaccini ha portato alla scoperta, nel 1959 [38], di un nuovo DNA virale chiamato SV40 (*simian virus-40*) virus endemico tra le scimmie Rh. SV40 non provoca malattie clinicamente significative agli animali, ma crea vacuolizzazione nelle colture cellulari della scimmia verde, e sembra essere un forte oncogene per i roditori, provocando mesoteliomi, ependimomi, osteosarcoma e linfomi non-Hodgkin [39]. La preparazione dei vaccini anti-Polio con formaldeide portava ad un'inattività incompleta dei SV40; creando dei lotti di vaccini con SV40 infettante. Come conseguenza, si stimano tra 30 e 100 milioni negli Stati Uniti e tanti altri globalmente, le persone che hanno assunto i vaccini potenzialmente contaminati tra il 1955 ed il 1963 [40].

Il primo effetto biologico del SV40 osservato era la formazione di numerosi tumori (poliomi) sui criceti, ma anche la trasformazione di diverse linee cellulari di origine umana. Sembra

influenzare diverse funzioni fondamentali delle cellule eucariotiche, come la replicazione, trascrizione e trasformazione [38]. La forte correlazione tra l'infezione da SV40 e lo sviluppo di neoplasie nei roditori ha motivato l'indagine del suo potere cancerogeno sugli umani. Sequenze di DNA-SV40 sono state ripetutamente riscontrate in casi di neoplasie dell'uomo, ed erano spesso uguali a quelle osservate ai roditori [37, 41, 42]. In una meta-analisi comprendente 528 casi di mesotelioma e 468 casi controllo da 15 studi diversi, la combinazione delle odds ratio era molto alto (OR17, 95 % CI 10-28) per la presenza di sequenze di DNA-SV40 nelle cellule di mesotelioma [43]. Altri studi invece contestano questi risultati, sostenendo che tali reperti potrebbero essere conseguenza della contaminazione o da altri artefatti di laboratorio [44, 45]. Nonostante l'infezione dell'uomo dal SV40 sia relativamente recente e conseguente alla vaccinazione anti-Polio, gli studi epidemiologici non hanno dimostrato una chiara correlazione con le neoplasie [46].

Il riscontro ripetuto di DNA-SV40 in neoplasie dell'uomo è ancora argomento di dibattito. Tuttavia studi recenti hanno dimostrato che gli animali infetti da SV40 o trans-infettati con antigene T del SV40 (Tag) erano fortemente suscettibili alla cancerogenesi dell'amianto; questo pertanto è stato utilizzato come modello *in vivo* per l'effetto co-cocancerogeno del SV40 nello sviluppo di mesotelioma [47,48]. Ulteriori studi di tipo epidemiologico-molecolare sono necessari per dimostrare il ruolo co-cancerogeno del SV40 nell'eziopatogenesi del mesotelioma [49].

## ***2. Fisiopatologia***

### ***2.1 Fisiologia della pleura e Clearance delle Fibre***

La pleura è una membrana sottile elastica che copre l'intera superficie interna della cavità toracica. È quasi continua, in modo da costituire una sacca espandibile con una piccola quantità di liquido lubrificante per regolare il movimento della gabbia toracica, polmoni, cuore e gli

organi interni. La pleura parietale riveste la parete toracica, il mediastino ed il diaframma, mentre la pleura viscerale riveste i polmoni [50].

La pleura è di origine mesodermica, è presente già alla settima settimana di gestazione e si compone di cinque strati: 1) un singolo strato di cellule mesoteliali; 2) uno strato di tessuto connettivo sottile con una lamina basale; 3) un sottile strato elastico superficiale; 4) uno strato di tessuto connettivo che contiene tessuto adiposo, fibrociti, fibroblasti, mastociti e altre cellule mononucleari chiamati telociti [51], vasi sanguigni, nervi e vasi linfatici; e 5) uno strato fibroelastico profondo che aderisce saldamente alle strutture sottostanti (polmone, muscolo toracico, etc.). Le cellule mesoteliali possono svolgere diverse funzioni, tra cui contribuire alla risposta infiammatoria e alla fagocitosi delle fibre di amianto. La pleura parietale e viscerale sono simili ma presentano sostanziali differenze strutturali e funzionali [50, 52].

Il motivo per cui le malattie legate all'asbesto interessano la pleura parietale è spiegato dal fatto che le fibre inalate arrivano alla pleura viscerale, allo spazio pleurico ed alla pleura parietale attraversando il parenchima polmonare o tramite il sistema linfatico [54]. Le fibre di calibro e lunghezza superiore (Crocidolite, Amfibole) vengono riscontrate principalmente nel parenchima polmonare [56, 57], mentre quelle più corte e di calibro inferiore (Crisotile) si riscontrano alla pleura parietale e principalmente a livello basale [56, 57], dove si depositano plausibilmente per gravità. Inoltre, la reazione infiammatoria cronica che precede il mesotelioma è in gran parte intorno a delle isole linfatiche, chiamati foci di Kampmeier situati nella parte basale della pleura parietale, che è il luogo più comune di mesotelioma.

## ***2.2 Origine e sede delle cellule del Mesotelioma***

La sierosa mesoteliale è presente a livello della pleura, del peritoneo, del pericardio e della tonaca albuginea. La maggior parte di casi di mesotelioma sono presenti a livello pleurico (circa

70%) [58]. Ci sono quattro istotipi di mesotelioma: epiteliomorfo (più comune), sarcomatoide, spinocellulare e bifasico.

Fino ai tempi più recenti era diffusamente accettato che i progenitori delle cellule del mesotelioma fossero le cellule mesoteliali. Tuttavia, quando le cellule mesoteliali vengono danneggiate, la rigenerazione cellulare viene garantita sia dalle cellule mesoteliali che dalle cellule staminali totipotenti presenti allo strato submesoteliale [59, 60]. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che gli adipociti, come anche i fibrociti multipotenti circolanti e le cellule staminali del midollo possano differenziarsi sia in cellule epiteliali che mesenchimali [61-63]. È interessante notare inoltre che le cellule mesoteliali siano in grado di differenziarsi in fibrocellule muscolari lisce, in fibroblasti quando iniettati in diversi organi; quindi le cellule mesoteliali normali sono apparentemente delle cellule totipotenti come quelle staminali [64].

Un altro quesito che rimane finora irrisolto è il motivo per cui sia le placche di asbestosi che il mesotelioma insorgono a livello della pleura parietale [65]. L'evidenza clinica supporta questa tesi, in quanto i pazienti con solo interessamento della pleura parietale (T1a) presentano una migliore sopravvivenza rispetto ai pazienti con malattia interessante entrambe le pleure (T1b), si tratta quindi di un evento antecedente [65]. Ulteriore evidenza a sostenere questa tesi è l'assenza, finora di casi descritti con interessamento della sola pleura viscerale [66]. L'attuale conoscenza permette di supporre che la malattia nasca a livello della pleura parietale, si diffonda sulla pleura viscerale e successivamente invada le strutture limitrofe.

### ***2.3 Cancerogenesi nel mesotelioma e profilo molecolare***

La conoscenza degli aspetti citogenetici e molecolari del mesotelioma è molto progredita negli ultimi anni. Nonostante ciò gli esatti meccanismi nella cancerogenesi dell'amianto non sono completamente conosciuti.

È attualmente accettato che le fibre di amianto vengano inalate e depositate a livello delle cellule mesoteliali; a questo livello agiscono inducendo citotossicità, deterioramento del DNA, stimolando la fagocitosi e l'infiammazione cronica [67,68]. Durante il suo periodo di latenza di 20-60 anni, sono diversi i meccanismi messi in azione, come aberrazioni cromosomiche e variazioni epigenetiche (es. Ipermetilazione di promotori in loci che esprimono soppressori tumorali), con conseguenti disturbi funzionali del genoma, dei micro-RNA e della traduzione [69-73]. Le fibre dell'amianto sono clastogeniche e citotossiche *in vitro*, ed inducono mitosi anormali. Queste sue attività sia *in vivo* che *in vitro* sono dipendenti dalle dimensioni, la durezza e dalla forma delle fibre [12]. Secondo i dati epidemiologici, le fibre lunghe amfibole (crocidolite ed amosite) vengono considerate le più cancerogene, mentre le corte e serpentiformi (crisotile) sono considerate meno dannose ma sicuramente cancerogene anche quelle. Secondo i più recenti dati viene smentita questa tesi in quanto le fibre di crisotile sembrano essere ugualmente cancerogene [74-76].

Studi citogenetici mostrano che le cellule del mesotelioma hanno delle aberrazioni cromosomiche altamente complesse e variabili [77] e solo poche sono comuni tra i diversi pazienti. L'analisi della perdita dell'eterozigosi ha mostrato frequenti delezioni di siti specifici nei bracci cromosomici 1p, 3p, 6q, 9p, 13q, 15q e 22q. Due di queste sono più frequentemente alterate: gli oncosoppressori CDKN2A-ARF al 9p21, e NF2 al 22q12. Delezione omozigote sembra essere il meccanismo che principalmente interessa il CDKN2A-ARF, mentre mutazioni disattivanti sono quelle che interessano principalmente il locus NF2 [78]. A differenza di altre neoplasie il mesotelioma raramente presenta mutazioni del p53, ma perdita del ARF (p14) può portare a disattivazione del p53 [79,80]. Ulteriormente pRB (retinoblastoma protein) e p53 possono essere disattivati dal SV40 Tag, meccanismo suggerito per la progressione del mesotelioma [81]. NF- $\kappa$ B (nuclear factor,  $\kappa$ light chain enhancer dei linfociti B attivati) è stato dimostrato essere un fattore di sopravvivenza per le cellule mesoteliali umane trasformate, le cellule mesoteliali

esposte all'amianto e le cellule da mesotelioma umano [82]. I geni che codificano i proteasomi sembrano essere iper-espresi nelle cellule del mesotelioma umano; i proteasomi a loro volta inibiscono l'attività dell' $\text{NF-}\kappa\text{B}$  nelle cellule mesoteliali maligne, bloccano la sintesi cellulare ed inducono l'apoptosi *in vitro*, come anche la crescita tumorale *in vivo* [83]. Recentemente, è stato visto che mutazioni missense del K-RAS e del TP53 inducono anche mesoteliomi aggressivi nel topo [84]. L'espressione di glicosaminoglicani (GAG) sulla superficie delle cellule di mesotelioma (specialmente i Sindecani) sembra favorire l'interazione con fattori di crescita e componenti della matrice cellulare e di conseguenza la transizione da mesotelioma epiteliomorfo a sarcomatoide [85].

Le chinasi dipendenti da segnali extra-cellulari (Extracellular Signal-regulated Kinases-ERK's) sono una famiglia di molecole con ruolo ben definito alla riparazione, differenziazione e cancerogenesi. Si è visto, in linee cellulari e in modelli animali, che queste chinasi hanno un ruolo sulla trasformazione e l'omeostasi di cellule di mesotelioma dell'uomo, variante epiteliomorfa [86]. La proteina-1 fattore di attivazione la trascrizione, che è un bersaglio delle vie di trasduzione del segnale amianto-indotte, è stato dimostrato, anch'esso a sua volta, di essere fondamentale per la trasformazione delle cellule mesoteliali attraverso l'attivazione di antigeni Fos-correlati-1(FrAg) ed ERK-dipendente [87]. Il fattore di crescita degli epatociti (HGF)/fattore di diffusione ed il suo recettore TyrK, c-Met, sono fortemente espressi sulla maggior parte di cellule di mesotelioma umano e recentemente è stato visto che l'attivazione di tale via porta ad una proliferazione di tali cellule [88]. Inoltre è stato dimostrato che c-Met potrebbe essere un potenziale bersaglio per il trattamento come anche la sua iperespressione un fattore prognostico negativo [89, 90]. Le cosiddette "vie di sopravvivenza", come PI3K/Akt/mammalia target of rapamycin (mTOR), sono coinvolte nella crescita cellulare e nella resistenza all'apoptosi e sono spesso espresse dalle cellule di mesotelioma. L'mTOR sembra favorire la resistenza in diversi mesoteliomi e la sua inibizione è stata proposta come terapia, non

tossica, in aggiunta a quella tradizionale per la cura del mesotelioma [91]. Un ruolo è stato inoltre dato alla risposta infiammatoria ed è stato recentemente dimostrato che precede la formazione di mesotelioma. Inoltre, è stato visto che le vie di trasduzione del segnale amianto-indotte (nucleotide-binding domain, leucine repeat containing, NLPR3) attivano un feedback autocrino agendo sul recettore del IL-1 delle cellule mesoteliali, abitualmente attivo in caso di infezioni, fibrosi e cancerogenesi [92, 93]. Un simile meccanismo è stato assegnato per i nanotubi di carbonio (CNT).

Diverse ricerche sugli assetti di mRNA hanno evidenziato delle scoperte interessanti, anche se non concordanti. Questo può essere dovuto a diversi fattori: utilizzo di assetti di mRNA differenti; l'utilizzo di linee cellulari piuttosto che tessuti umani o tessuto pleurico in pazienti con o senza tumore del polmone [50, 94-101].

Diversi geni chiave codificano delle proteine note per essere bersaglio per la chemioterapia, ma anche per conferire resistenza a essa (es NQO1 [NADPH deidrogenasi, quinone 1], TOP2A [topoisomerasi II $\alpha$ ], TYMS [timidilato sintetasi], BIRC5 [survivina] e geni che codificano per i componenti del proteasoma); resistenza alle radiazioni da diversi geni di riparazione e danno del DNA checkpoints (es BRCA2 [tumore al seno 2], FANCD2 [Gene dell'Anemia di Fanconi, gruppo di complementazione D2], RAD21 e RAD50), sono stati trovati spesso iper-espresi nei tumori. Un nuovo gene angiogenico, AGGF1, è spesso iper-espreso [50, 71]. Diversi geni che codificano enzimi antiossidanti, tra i quali il gene per la resistenza multifarmaco ABCB1 (ATP-binding), sono stati ipo-espresi, così come i geni per la migrazione e per le vie di trasduzione del segnale.

Recentemente, la decodificazione di tutto il genoma ha permesso di scoprire l'enorme danno genomico delle cellule di mesotelioma rispetto a quelle di tessuto normale. Questo si traduce in aneuploidie significative, e in delezioni, inversioni e traslocazioni su ampia scala, inter- e intracromosomica. Quasi tutti i siti candidati di mutazioni sembrano essere precedentemente

sconosciuti. Tre mutazioni puntiformi sono state osservate nelle regioni di NKX6-2 (un regolatore di trascrizione) e NFKB (una proteina di legame al DNA coinvolta nella modulazione del NF- $\kappa$ B), e l'amplificazione di geni come PCBD2 (pterina-4 $\alpha$ -carbinolamine deidratasi / dimerizzazione cofattore di epatociti fattore 1 $\alpha$  nucleare) e DHFR (diidrofolato reductasi) sono coinvolti nella regolazione di fattori di crescita e in sintesi dei nucleotidi [102].

#### ***2.4 Suscettibilità per il Mesotelioma e la S. BAP1***

Il mesotelioma si sviluppa solo in una minoranza della popolazione esposta all'amianto. Questo implica una sorta di suscettibilità alla cancerogenesi delle fibre d'amianto. Precedenti studi sull'associazione genomica hanno fallito nell'individuazione di un singolo gene o di un complesso di geni responsabili [103]. Tuttavia, alcuni polimorfismi genomici hanno mostrato un aumento del rischio di mesotelioma in alcuni studi, come la mancata espressione della glutatione-S-transferasi  $\mu$ 1 (GSTM1), e due varianti alleliche dei geni di riparazione del DNA (XRCC1 E XRCC3) [103]. La GSTM1 ha un importante ruolo antiossidante dei componenti elettrofilici come: cancerogeni, farmaci, tossine ambientali e prodotti delle catene da stress ossidativo. La sua ipo-espressione è associata con formazione di diversi tumori [104].

L'alta concentrazione di casi di mesotelioma in certe famiglie è stata osservata in diversi studi [105]. Una proteina nucleare, BAP1, si è visto avere diverse funzioni: regolazione della trascrizione, regolazione della cromatina, formazione di complessi multiproteici che regolano la differenziazione cellulare, la gluconeogenesi la trascrizione e l'apoptosi [106]. Il gene che codifica per la BAP1 è localizzato al cromosoma 3p21, una regione frequentemente deleta in numerosi tumori maligni, comprendente il 30-60% dei mesoteliomi. Nella famiglia di mutazioni del BAP1, c'è un' aumentata incidenza di tumori maligni e spesso in giovane età rispetto alla popolazione generale [106]. È stata già proposta una Sindrome BAP1 comprendente il mesotelioma, il melanoma uveale, il melanoma cutaneo ed eventuali altri tumori [107].



Mutazioni del BAP1 nelle cellule germinali sono state descritte in famiglie con incidenza estremamente elevata di mesotelioma [107] e nel 25% dei mesoteliomi sporadici [108], collocando il gene BAP1 al primo posto come fattore predisponente a sviluppare il mesotelioma; ma il suo ruolo nella cancerogenesi delle fibre minerali non è stato stabilito. Inoltre, esistono studi che indicano che le mutazioni del BAP1 sono più comuni nella variante epiteliomorfa piuttosto che in sarcomatoide o bifasica del mesotelioma [109,110]. La scoperta di una suscettibilità gene-correlata, avrà importanza nella valutazione dei gruppi di popolazione ad alto e basso rischio di sviluppare mesotelioma tra quelli esposti all'amianto.

### ***3. Marcatori Biologici***

#### ***3.1 Mesotelina sierica***

Il mesotelioma ha una lunga latenza: possono trascorrere fino 20-60 anni tra l'esposizione all'amianto, altri cancerogeni e la manifestazione clinica della malattia, con diagnosi in stadi di solito avanzati. Finora non esistono metodi non-invasivi e biomarcatori che permettano una diagnosi precoce o follow-up nei pazienti a rischio.

Il primo potenziale marker proposto per il mesotelioma è stata la SMRP (soluble mesothelin-related protein), chiamata anche mesotelina [111, 112]. La mesotelina appartiene ad una famiglia di proteine generalmente legate alla membrana cellulare ed espressa dalle cellule mesoteliali come anche a diversi tumori come quello del pancreas e dell'ovaio. L'SMRP presenta tre diverse varianti; la Variante 1 [113] è quella predominante nel siero ed è spesso aumentata nella variante epiteliomorfa di mesotelioma [114]. Robinson e col. [115] hanno riscontrato elevati livelli sierici di SMRP-V1, 1-5 anni prima della manifestazione clinica della malattia, in alcuni soggetti esposti all'amianto, rinforzando il suo ruolo come test di screening. Inoltre recentemente gli elevati livelli sierici di SMRP sono stati suggeriti come fattore prognostico negativo, in pazienti con mesotelioma [115]. Pass e col. [116] non solo hanno

dimostrato gli elevati livelli di SMRP nei pazienti affetti da mesotelioma rispetto a quelli affetti da carcinoma polmonare, ma anche tra gli stadi I ed II-IV di mesotelioma, e tra i pazienti di stadio I rispetto ai pazienti con lesioni pleuriche non carcinomatose, amianto-correlate. La funzione della mesotelina è sconosciuta ma sembra giocare un ruolo nell'adesione tra cellule. Sembra essere inoltre coinvolta nella diffusione peritoneale del carcinoma ovarico in quanto, espressa sulle cellule mesoteliali peritoneali, sembra avere affinità per il CA-125 [117], iper-espresso a sua volta sulle cellule da carcinoma ovarico. Allo stesso modo potrebbe essere in parte spiegata la diffusione del mesotelioma dalla pleura parietale a quella viscerale in quanto le sue cellule co-esprimono CA-125 e mesotelina [118].

Secondo lo studio di Robinson e col. la mesotelina sierica sembra essere un valido marker per la diagnosi di mesotelioma rispetto alle lesioni pleuriche benigne, con una specificità del 100% ed una sensibilità del 84%. Mentre presenta una specificità del 95 e 100 % nella diagnosi differenziale con le neoplasie polmonari e le persone sane rispettivamente [16]. Tuttavia, in un altro studio, la migliore combinazione tra sensibilità e specificità nel confronto con i gruppi controllo è del 66% e 70,9 %, rispettivamente [119]. 'E stata ulteriormente proposta come marker per la risposta alla terapia e la ricerca di eventuali recidive in quanto il valore sierico è direttamente proporzionale alla quantità di tessuto tumorale presente [119]. Nonostante ciò il suo utilizzo come marcatore diagnostico precoce è decaduto perchè non sono state riscontrate differenze significative negli stati preclinici tra i pazienti affetti ed i casi controllo[120]. Ci sono però diversi studi in atto con farmaci che hanno come bersaglio la mesotelina, in pazienti affetti da carcinoma ovarico, pancreatico e mesotelioma in quanto assente nelle cellule e tessuti di organi vitali [95].

### **3.2 Proteina 13 sierica**

La tecnologia proteomica sta evolvendo rapidamente ed un nuovo assetto di aptameri (*slow off-rate modified aptamers*-SOMAmers) viene utilizzato per la rilevazione di proteine altamente selettive identificate come biomarcatori [121]. I SOMAmers sono corte sequenze deossinucleotidiche con la capacità di legarsi a diversi target molecolari. Il loro utilizzo ha portato diversi vantaggi rispetto alle tradizionali analisi basate sugli anticorpi, come la maggior specificità e sensibilità, il range dinamico, l'accurata analisi quantitativa e la riproducibilità. In poche parole hanno la capacità di rilevare dal punto di vista qualitativo e quantitativo migliaia di proteine umane in un piccolo volume di materiale biologico. Recentemente una coesistenza di tredici proteine (13-protein) è stata scoperta in pazienti con mesotelioma e in soggetti con esposizione all'amianto ma in assenza di mesotelioma. Questo complesso proteico utilizzato come biomarcatore presentava una Sensibilità/Specificità: 91%/94%, per il mesotelioma; superiore quindi rispetto alla mesotelina (66%/88%). Tuttavia non ci sono studi prospettici ancora che permettano di valutare il valore diagnostico di tale marker [122].

### **3.3 Fibulina-3 plasmatica**

Un recente studio ha messo in evidenza la fibulina-3 plasmatica, proteina poco studiata in precedenza, come biomarcatore nella diagnosi precoce tra i soggetti esposti all'amianto ed affetti da mesotelioma e tra quelli in assenza di mesotelioma, con una Sensibilità/Specificità: 100%/94%. Inoltre si è visto che le concentrazioni plasmatiche di fibulina-3 erano molto diverse tra i pazienti affetti da versamenti dovuti al mesotelioma rispetto ai pazienti con versamenti benigni o dovuti ad altre neoplasie [123]. Questo sarebbe apparentemente, ad oggi, il marker diagnostico più promettente per il mesotelioma, ma la sua validità dev'essere ancora per i pazienti affetti da mesoteliomi, in assenza di versamento pleurico, così come nei campioni di screening. Questo è un punto fondamentale, in quanto l'espressione di proteine può variare molto tra i stadi precoci e quelli avanzati di mesotelioma, e soprattutto in fasi pre-cliniche [124].

### ***3.4 mRNA Plamatici***

I microRNA sono una nuova classe di RNA non codificante con diverse funzioni di controllo e regolazione e con elevate stabilità nel siero e nel plasma. Il loro dosaggio plasmatico sembra offrire un valore diagnostico ai pazienti affetti da diverse neoplasie. Recenti studi hanno individuato miR-625-3p come potenziale biomarker per la diagnosi in pazienti affetti da mesotelioma [125].

### ***4. Artificiali tubuli di carbonio (CNT's)***

Nel 1985 il chimico statunitense Richard E. Smalley ha scoperto che, in particolari situazioni, gli atomi di carbonio compongono delle strutture ordinate di forma sferica, i fullereni. La struttura, dopo un successivo rilassamento, tende ad arrotolarsi su se stessa, ottenendo la tipica struttura cilindrica: questi sono i nanotubi di carbonio.

I nanotubuli possono essere visti, analogamente al fullerene, come una delle forme allotropiche del carbonio.

La tossicità dei nanotubuli di carbonio è un' importante questione in nanotecnologia. Le ricerche sono iniziate ancora da poco ma attualmente sono in corso numerosi studi per verificare la possibilità di rischi per la salute dovute all'ingestione o all'inalazione di nanotubi. I risultati preliminari evidenziano le difficoltà nella valutazione della tossicità di questo materiale eterogeneo. Parametri come struttura, la distribuzione dimensionale, area, chimica di superficie, carica superficiale e lo stato di agglomerazione e purezza dei campioni, hanno un notevole impatto sulla reattività di nanotubuli di carbonio. Si è dimostrato che i nanotubuli di carbonio possono attraversare le naturali difese dell'organismo, raggiungendo gli organi e scatenando reazioni infiammatorie e fibrotiche. Mentre in altre condizioni i nanotubuli di carbonio possono penetrare all'interno del citoplasma ed indurre l'apoptosi.

Studi sui roditori hanno dimostrato che indipendentemente dalla modalità di sintesi dei nanotubi di carbonio, dal tipo e dalla quantità di metalli contenuti, i CNT possono causare infiammazione, granulomi epitelioidi, fibrosi e cambiamenti dal punto di vista del funzionamento biochimico/tossicologico dei polmoni.

La forma aghiforme dei nanotubi di carbonio sono simili alle fibre dell'amianto. Questo conduce all'ipotesi che, proprio come l'amianto, anche i CNT possono causare mesotelioma, sia a livello del rivestimento pleurico che al livello del rivestimento della cavità peritoneale. Uno studio pilota rafforza questa previsione: gli scienziati che espongono la cavità peritoneale a CNT osservano tumori molto simili a quelli causati dall'amianto con andamento patologico che include infiammazione e formazione di granulomi. Gli autori dello studio concludono: *“Questo è di notevole importanza, perché le comunità di ricerca e le imprese continuano ad investire pesantemente in nanotubi di carbonio per una vasta gamma di prodotti in base al presupposto che essi non sono più pericolosi di grafite. I nostri risultati suggeriscono la necessità di ulteriori ricerche e grande cautela prima di introdurre tali prodotti sul mercato, così che possano essere evitate conseguenze nel caso in cui queste molecole inizino a creare problemi a lungo termine”*. Considerata la novità di queste tecnologie, si tratta naturalmente di studi da approfondire e deve essere ancora verificato se tali effetti evolvano poi in forme cancerose [126-132].

## **5. Diagnosi**

La diagnosi del mesotelioma pleurico maligno non è semplice in quanto richiede l'analisi istologica della pleura ottenuta solo tramite prelievi biotici della stessa e non sempre la diagnosi differenziale con un'infiammazione cronica è così facile. Pertanto in pazienti con una precisa sintomatologia clinica (Tabella 1) ed esposizione professionale e/o ambientale all'amianto bisogna sospettare tale eventualità ed approfondire le indagini. In prima istanza l'analisi citologica del versamento pleurico può permettere una diagnosi, nonostante l'elevata probabilità

di falsi positivi o negativi. Pertanto il gold-standard per la diagnosi di MPM sono i prelievi bioptici in videotoracoscopia o con biopsia a “cielo aperto” che permettono una caratterizzazione istologica esatta (Tabella 2). La prima permette una visualizzazione diretta della pleura interessata e di conseguenza prelievi mirati ed in più punti della pleura. Inoltre permette una valutazione accurata dell'estensione della malattia (pleura parietale e/o mediastinica e/o viscerale), permette quindi di valutare l'eventuale adeguatezza del paziente per un trattamento multidisciplinare comprendente la chirurgia. La biopsia chirurgica a “cielo aperto” permette una diagnosi accurata ma viene riservata solo ai pazienti con impossibilità di accedere allo spazio pleurico.

**Tabella 1.**

Sintomi	%
Dispnea e/o Dolore Toracico	90
Perdita di Peso	29
Tosse, Stanchezza, Febbre, Perdita dell'Appetito	3
Disfagia, Emoftoe	>1
Versamento Pleurico	83
Asintomatico	3

**Tabella 2.**

<i>Classificazione</i>			<i>Prevalenza</i>
<i>Morfologia</i>	<i>Clinica</i>	<i>Istologia</i>	
Localizzato	Benigno	Tumore Adenomatario	Raro
		Tumore Fibroso Solitario	Raro
Diffuso	Border-Line	Multicistico	Raro
		Papillare Ben Differenziato	Raro
	Maligno	Epiteliomorfo	75%
		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubulo-Papillare</li> <li>• Solido</li> </ul>	
		Bifasico	6%
		Sarcomatoide	13%
Indifferenziato	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desmoplastico</li> <li>• Linfo-istiocitoide</li> <li>• A piccolo cellule</li> <li>• Deciduoide</li> </ul>	6%	

## 6. Stadiazione

Dopo la diagnosi, l'associazione della stadiazione Chirurgica (VATS) e quella Clinica (TC-Torace e PET-Total Body) è di primaria importanza in quanto permette di indirizzare il paziente all'iter terapeutico più adatto da seguire. Qui sotto si riporta la stadiazione:

### Sistema di stadiazione del mesotelioma proposto dall'IMIG

---

T1a	tumore limitato alla pleura parietale, mediastinica o diaframmatica ipsilaterale
T1b	tumore coinvolgente la pleura parietale, mediastinica o diaframmatica ipsilaterale, con isolati foci tumorali a livello della superficie della pleura viscerale
T2	tumore coinvolgente tutte le superfici pleuriche ipsilaterali, associato ad invasione del diaframma, foci tumorali confluenti a livello della pleura viscerale, o estensione nel sottostante parenchima polmonare
T3	tumore coinvolgente tutte le superfici pleuriche ipsilaterali, associato ad interessamento della fascia endotoracica, estensione nel grasso mediastinico, isolati foci tumorali (resecabili) a livello della parete toracica, o invasione pericardica non transmurale
T4	tumore coinvolgente tutte le superfici pleuriche ipsilaterali con diffusa estensione alla parete toracica, diretta estensione al peritoneo, alla colonna, agli organi mediastinici, alla pleura controlaterale, alla superficie interna del pericardio, o al miocardio vero e proprio

---

N0	assenza di interessamento linfonodale
N1	metastasi ai linfonodi broncopolmonari ipsilaterali, o ai linfonodi ilari
N2	metastasi ai linfonodi subcarenali, o mediastinici ipsilaterali
N3	metastasi ai linfonodi mediastinici controlaterali, o ai linfonodi della catena mammaria interna, o a qualsiasi linfonodo sopraclaveare

---

Mx	presenza di metastasi non valutabile
M1	assenza di metastasi a distanza
M2	presenza di metastasi a distanza

---

#### Raggruppamento per stadi

---

Stadio I	
Ia	T1a, N0, M0
Ib	T1b, N0, M0
Stadio II	T2, N0, M0
Stadio III	qualsiasi T3, M0; qualsiasi N1, M0; qualsiasi N2, M0
Stadio IV	qualsiasi T4; qualsiasi N3; qualsiasi M1

---



## ***7. Terapia***

Attualmente non esiste un iter terapeutico o un singolo tipo di trattamento che possa portare alla guarigione completa dalla malattia e che sia inserito in delle linee guida. L'approccio terapeutico multidisciplinare è quello più diffuso e comprende l'associazione con varie modalità e schemi di: chemioterapia locale e sistemica, chirurgia, radioterapia ed immunomodulazione. Successivamente sono brevemente elencati i vari tipi di terapia.

### ***7.1 Chemioterapia***

Lo studio di Vogelzang e col. [133] è stato il punto di riferimento per la standardizzazione della chemioterapia nei pazienti affetti da mesotelioma e non candidati alla chirurgia, dimostrando l'efficacia dell'associazione di premetrexed e cisplatino. In questo trial di Fase III sono stati analizzati 456 pazienti dimostrando un incremento della sopravvivenza di circa 3 mesi ed una sopravvivenza media di 12,1 mesi, a differenza dei 9,3 mesi dei pazienti trattati con il solo cisplatino. La risposta tumorale è stata osservata nel 41,3 % dei 226 pazienti trattati con pemetrexed e cisplatino rispetto al 16,7 % dei 222 pazienti trattati con cisplatino da solo.

### ***7.2 Resezione Chirurgica***

L'obiettivo della chirurgia è di ottenere una resezione completa (R0) della malattia, ma nel caso del mesotelioma questa evenienza appare inverosimile. L'obiettivo diventa quindi una resezione che garantisca una rimozione macroscopica del tessuto tumorale (R1). Lo studio MARS (Mesothelioma And Radical Surgery) ha dimostrato che solo pochi pazienti sono idonei per la chirurgia e che la pleuropneumonectomia extrapleurica (EPP) non offre risultati promettenti [134]. Conclude inoltre che solo quando la chirurgia del mesotelioma è riservata ai grandi centri di Chirurgia Toracica, altamente specializzati in questa patologia, può essere ottenuto un vantaggio nella sopravvivenza. Si pensava che l'EPP offrisse una sopravvivenza migliore

rispetto alla pleurectomia/decorticazione (P/D); attualmente però c'è una maggior evidenza scientifica a favore della seconda [135, 136]. A favore della chirurgia ci sono anche dati indiretti come lo studio di Flores e col. che hanno osservato una sopravvivenza globale di soli 10,2 mesi in pazienti non sottoposti a chirurgia e di 14-15,8 mesi in quelli sottoposti a resezione chirurgica [135].

### ***7.3 Radioterapia***

La radioterapia (RT) viene utilizzata sia per il trattamento dei sintomi (es. dolore) che per il controllo locale della malattia. La RT post-EPP non è scevra però da complicanze, in quanto può conferire tossicità alle strutture toraciche (polmone controlaterale, cuore, spina dorsale, fegato ed esofago); si è visto che la probabilità di sviluppare polmonite attinica e/o batterica nel polmone controlaterale è del 20 % [134]. Diversi gruppi di studio hanno dimostrato che la RT può essere utilizzata, dopo chirurgia preservante il polmone omolaterale (P/D), con tossicità accettabile. Tuttavia nuove tecniche, come la tomoterapia [137,138], sono in grado di applicare un campo di radiazione concentrata sulla parete toracica preservando il parenchima polmonare in caso di P/D, permettendo l'utilizzo di dosi uguali a quelle utilizzate dopo l'EPP (45-50 cGy) [139-142].

### ***7.4 Trattamento multidisciplinare***

Attualmente I centri specializzati al trattamento del mesotelioma pleurico maligno utilizzano un approccio terapeutico multidisciplinare, che comprende la chirurgia citoreducente, la chemioipertermia intracavitaria-intraoperatoria, la chemio- e radioterapia di consolidamento. I risultati del STS (Society of Thoracic Surgeons) e dell'EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) suggeriscono che l'approccio multidisciplinare eseguito in centri altamente specializzati è associato a una morbilità e mortalità inferiore.

## **8. Prognosi**

Nonostante il mesotelioma pleurico maligno è una neoplasia difficile da curare, con una mediana di sopravvivenza tra i 9 e i 17 mesi a seconda dello stadio [143], ci sono stati progressi significativi negli ultimi anni che hanno permesso dei miglioramenti in termini di sopravvivenza e di qualità della vita nei pazienti affetti.

## **9. HITHOC**

### **9.1 Background**

Diversi studi hanno dimostrato che la chemioipertermia endoperitoneale sia un valido trattamento anti-tumorale, intraoperatorio, per alcune malattie neoplastiche di organi addominali [144]. In effetti l'associazione di blanda ipertermia ed alcuni agenti chemioterapici (antracicline, cisplatino, etc.) sembra offrire un sinergismo nella azione citotossica dei secondi [145, 146]. È ampiamente dimostrato che l'ipertermia contribuisca non solo intensificando il loro effetto citotossico ma anche inducendo l'apoptosi. Questa tecnica permette inoltre una concentrazione locale elevata dei chemioterapici, mentre quella sierica si mantiene a livelli bassi, tale da evitare gli effetti indesiderati sistemici [147, 148]. È stato inoltre dimostrato che la diffusione nei tessuti degli agenti chemioterapici è superiore in caso di una perfusione locale ipertermica piuttosto che normotermica [149]. Più recentemente, l'utilizzo dell'HITHOC è stato descritto anche per le neoplasie primitive e secondarie della pleura come il MPM e i reimpianti da timomi [150, 151].

### **9.2 Materiali e Metodi**

Da Aprile 2005 a Dicembre 2013, 130 pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno sono giunti alla nostra osservazione. Di questi 51 sono stati arruolati per il trattamento multidisciplinare comprendente la Chemioterapia Intra-operatoria Ipertermica (HITHOC). Infine

solo 40 sono stati compresi in questo studio. I principali criteri d'inclusione sono stati: età 18-75, PS 0-2, istologia epitelioromorfo, stadio I-III (Tabella 3). Abbiamo retrospettivamente analizzato I dati raccolti in modo prospettico di questi 40 pazienti. Tutti I dati sono stati acquisiti da una banca-dati prospettica ed il follow-up è stato seguito per via telefonica ed ambulatoriale.

**Tabella 3.**

<i>Criteria di Inclusione</i>	<i>Criteria di Esclusione</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno (Epitelioromorfo, Stadi I - III)</li> <li>• Età tra 18 e 75 anni</li> <li>• Performance status &lt; 2 (ECOG)</li> <li>• Attesa di vita superiore a 3 mesi</li> <li>• Adeguata riserva midollare</li> <li>• Non controindicazioni cliniche ad un trattamento chirurgico e chemioterapico</li> <li>• Consenso informato scritto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infezioni in atto</li> <li>• Cardiopatie in atto</li> <li>• Malattie neurologiche in atto</li> <li>• Insufficienza epatica e/o renale</li> <li>• Gravidanza</li> <li>• Altre gravi malattie sistemiche incompatibili con lo studio</li> </ul>

### **9.3 Scopo dello studio**

Lo scopo principale di questo lavoro è stato verificare la sicurezza e la fattibilità di questa tecnica. Lo scopo secondario è invece stato valutare gli outcome oncologici ed il controllo locale della malattia.

### **9.4 Accertamenti Pre-operatori**

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad accertamenti pre-operatori standard per un intervento maggiore di chirurgia toracica: storia clinica ed esame obiettivo, Rx Torace in 2P, TC-Torace con mezzo di contrasto, esami ematochimici completi (emocromo, elettroliti, funzionalità renale

ed epatica), prove di funzionalità respiratoria e valutazione cardiologica completa. Inoltre sono ulteriormente sottoposti a valutazione specifica per HITHOC: ECO-color-doppler cardiaco (potenziale cardiotossicità della doxorubicina), D-dimero ed ECO-color-doppler del sistema venoso degli arti-inferiori per escludere precedente trombosi venosa profonda.

Nessun dei pazienti presentava storia di malattie cardio-vascolari gravi, o di insufficienza epatica e/o renale. Il giorno precedente alla chirurgia i pazienti venivano sottoposti a terapia infusione con 1000 ml di Ringer Lattato e 1000 ml di Soluzione Fisiologica; in aggiunta i pazienti venivano pre-medicati con antiinfiammatori steroidei, inibitori della pompa protonica, diuretici ed eparina a basso peso molecolare per ridurre il rischio di effetti collaterali legati all'HITHOC.

### ***9.5 Tecnica Chirurgica***

Tutti i pazienti sono stati sottoposti ad anestesia generale ed intubazione bronchiale selettiva; per l'analgesia è stata utilizzato un catetere epidurale, il quale veniva rimosso in seconda giornata post-operatoria.

Il monitoraggio intra-operatorio comprendeva: l'elettrocardiogramma continuo, pulsossimetria e la pressione arteriosa tramite catetere dell'arteria radiale. La misurazione della temperatura centrale veniva garantita da un sensore posizionato a livello dell'esofago prossimale. Il bendaggio elasto-compressivo degli arti inferiori garantiva un'ulteriore riduzione del rischio di trombosi venosa profonda. Il paziente veniva, quindi, posto in decubito laterale e veniva eseguita una toracotomia postero-laterale. Successivamente i pazienti venivano sottoposti ad una pleurectomia/decorticazione e rimozione di tutte le lesioni neoplastiche macroscopicamente visibili. Quando neccessario veniva eseguita rimozione parziale del pericardio o del diaframma e successivamente venivano suturati e/o ricostruiti.

A fine intervento venivano posizionati due drenaggi pleurici (uno antero-apicale ed uno postero-basale) di 28 Ch ciascuno; la punta di quello anteriore raggiungeva la parte superiore del cavo

pleurico ed aveva la funzione di deflusso del liquido di perfusione; il drenaggio posteriore veniva posizionato a livello del recesso costo-frenico ed aveva la funzione di afflusso del liquido di perfusione. Un ulteriore trasduttore della temperatura veniva posizionato nella cavità pleurica. Successivamente veniva chiusa la toracotomia. Durante la perfusione dei farmaci tutti i pazienti hanno mantenuto il decubito laterale ed il polmone omolaterale rimaneva escluso dalla ventilazione. La pressione arteriosa, la frequenza cardiaca, la saturazione dell'ossigeno e la temperatura nella cavità toracica erano costantemente monitorate per tutto il periodo di perfusione. I tempi operatori sono stati misurati dall'incisione cutanea fino alla fine della perfusione.

### **9.6 Dispositivi**

L'HITHOC è resa possibile anche grazie all'ausilio di Performer LRT (Rand, Medolla, MO, Italia) un dispositivo dedicato per questo tipo di procedure, che permette un controllo e regolazione automatica della velocità, volume e temperatura di perfusione (figura 2).

**Figura 2.** *PERFORMER* ® LRT system Rand S.r.l., Medolla(MO)-Italy

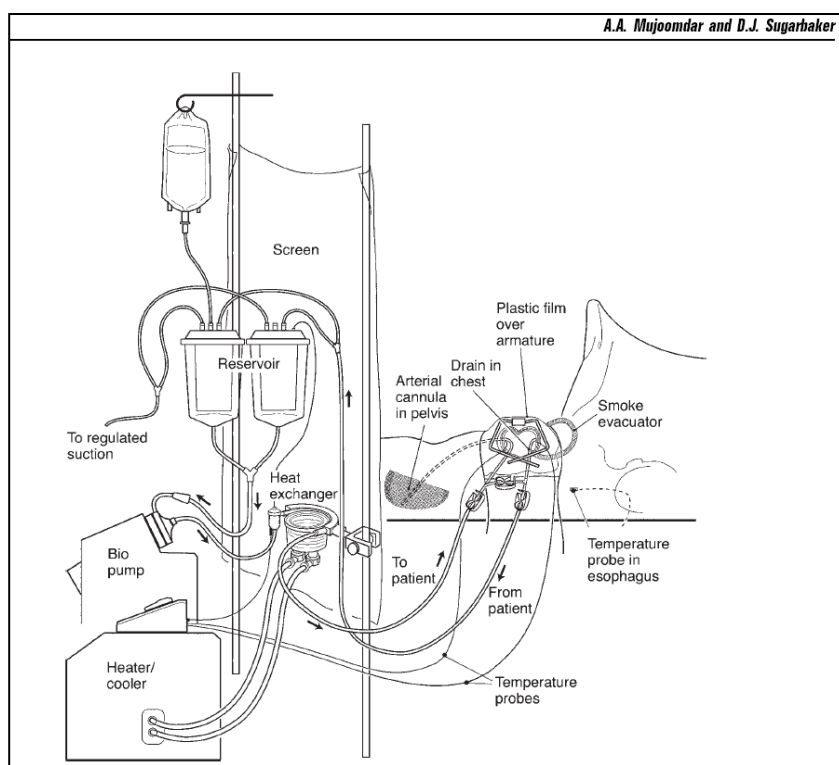


### 9.7 Tecnica di Perfusionione

Il volume di perfusione veniva pre-impostato e veniva ricavato dal calcolo *Superficie corporea* ( $cm/kg$ )  $\times 2 l$ . In questo modo ottenevamo una soluzione con la stessa proporzione di chemioterapici per ogni paziente. Per tutti i pazienti abbiamo utilizzato Cisplatino ( $80 mg/m^2$ ) e Doxorubicina ( $25 mg/m^2$ ).

Dopo il collegamento del dispositivo ai tubi di afflusso e deflusso, lo spazio pleurico veniva gradualmente riempito con la soluzione salina isotonica ad una temperatura iniziale di  $38\text{ }^\circ\text{C}$  e progressivamente portata a  $42,5\text{ }^\circ\text{C}$  (temperatura intracavitaria). Una volta raggiunti i  $42,5\text{ }^\circ\text{C}$  venivano iniettati nel circuito gli agenti chemioterapici e la perfusione continuava per 60 minuti. A fine di questi sessanta minuti i cateteri venivano invertiti per lo svuotamento dell'intero quantitativo della soluzione di perfusione (figura 3).

**Figura 3.**



### ***9.8 Trattamento post-operatorio***

Dopo la procedura i pazienti riprendevano il respiro spontaneo e per i primi cinque giorni post-operatori veniva somministrata loro terapia antibiotica ad ampio spettro, profilassi antitrombotica, idratazione con cristalloidi, antinfiammatori non steroidei ed inibitori della pompa protonica. Durante lo stesso periodo i pazienti venivano sottoposti a valutazione giornaliera dell'emocromo e della funzionalità renale ed epatica. Due volte al giorno venivano dosati i livelli sierici del D-Dimero.

### ***9.9 Follow-up***

I pazienti sono stati sistematicamente rivalutati a 15 giorni, 1 e 3 mesi dalla dimissione. A circa 1 mese dalla dimissione tutti i pazienti hanno eseguito un TC Torace di ristadiazione e successivamente posti all'attenzione dell'oncologo di riferimento per proseguire l'iter terapeutico con Chemioterapia sistemica e Radioterapia locale di consolidamento.

### ***9.10 Risultati***

Da Aprile 2005 a Giugno 2013, abbiamo arruolato e trattato 51 pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno. Successivamente 11 pazienti sono stati esclusi: 3 per istologia definitiva di bifasico e 8 perché persi al follow-up. Dei restanti 40 il rapporto maschi/femmine era 34/6 con età media di 65,7 aa (DS : 8,45). Nessun paziente presentava anamnesi patologica positiva per malattie cardio-vascolari gravi ed insufficienza epatica e/o renale. Tutti i pazienti sono stati sottoposti a chemioipertermia intraoperatoria intracavitaria per mesotelioma pleurico maligno, variante epiteliomorfa, stadi I-III. La diagnosi pre-operatoria è sempre stata istologica ed ottenuta tramite biopsia pleurica in videotoracosopia (tabella 4); mentre per la stadiazione ci siamo avvalsi anche della PET-TC.



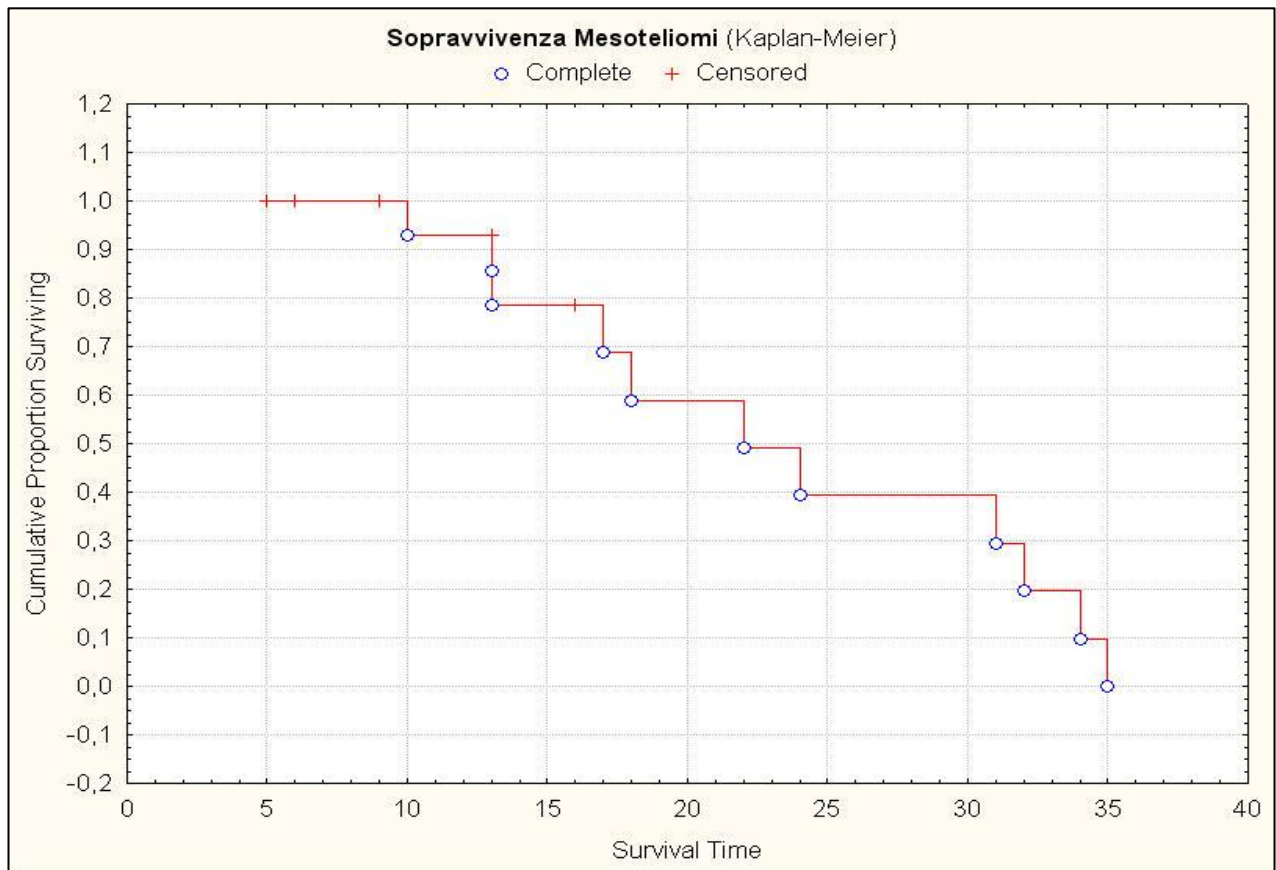
La durata media della procedura (chirurgia + chemioipertermia) è stata di 225 min (range 160-335). Non abbiamo registrato eventi avversi correlati all'HITHOC e non vi è stata mortalità perioperatoria. La morbidità è consistita in 9 casi di prolungata perdita aerea (22,5%), 5 casi di sanguinamento post-operatorio che hanno richiesto trattamento con emoderivati (12,5%), 1 caso di embolia polmonare (2,5%) ed 1 di deiscenza della ferita toracotomica (2,5%). La degenza media è stata di 9 giorni (range di 5-24).

Ad un follow-up medio di 59 mesi (range di 6 – 104), la sopravvivenza mediana attuariale è di 24,5 mesi. Diciotto pazienti sono ancora in vita (45%), di cui uno solo libero da malattia.

**Tabella 4.**

Numero pazienti	40
Maschi/Femmine	34/6
Età media	65,7 aa (35 -76)
Durata	225 min (160-335)
Degenza	9 giorni (5-24)
Morbidità HITHOC Correlata	0 %
Morbidità	
-Prolungata perdita aerea	9
-Sanguinamento	5
-Deiscenza ferita	1
-Embolia polmonare	1

**Grafico 1.**



## ***10. Conclusioni***

Dall'analisi dei dati ottenuti dalla nostra ricerca possiamo concludere che dal 2005 al 2013 abbiamo potuto valutare i seguenti aspetti dell'HITHOC:

- È una tecnica chirurgica di semplice esecuzione, facilmente riproducibile in centri specializzati al trattamento del MPM.
- La tossicità HITHOC correlata è scarsa o addirittura assente e la morbidità P/D correlata è decisamente inferiore rispetto all'EPP.
- Sia per la natura dell'intervento che per la scarsa/assente tossicità sistemica è una procedura da considerare parte integrante di un approccio multimodale.
- Gli outcome oncologici risultano promettenti in quanto si è riscontrato un prolungamento della sopravvivenza globale e quella libera da malattia, con un buon controllo locale della malattia.

Nel MPM, la citoreduzione chirurgica in associazione con la HITHOC può essere eseguita con bassa morbilità e mortalità in pazienti ben selezionati. All'interno di un trattamento multimodale, la HITHOC sembra contribuire ad incrementare il periodo di sopravvivenza nei pazienti con MPM epiteliomorfo.

In futuro per l'utilizzo dell'HITHOC bisognerà prendere in considerazione diversi aspetti:

- La ricerca di un dosaggio ottimale che permetta un ulteriore controllo locale della malattia senza aumentare il rischio di effetti avversi sistemici
- La ricerca del/i farmaco/i ideale/i per questo tipo di procedure
- Valutare un tempo di applicazione della durata ottimale che possa permettere un'azione efficace dei chemioterapici in assenza di effetti collaterali.
- La temperatura ottimale che renda allo stesso tempo i chemioterapici più efficienti, le cellule neoplastiche più vulnerabili e quelle normali meno sensibili.

Per quanto riguarda invece il successo del trattamento del MPM in generale dipenderà dalla migliore comprensione della sua biologia. Diversi Trials Clinici (Fasi I - III) in tutto il mondo valutano più approcci terapeutici in una varietà di trattamenti [152]. Gran parte di questi studi si concentra su nuovi agenti terapeutici, derivanti principalmente dalla nostra estesa conoscenza delle vie del segnale intracellulare e della risposta immunitaria. Diverse classi di terapie mirate sono emersi dal lavoro preclinico e sono in corso di valutazione. Questi sono:

- inibitori della tirosina chinasi
- anticorpo coniugato a tossine
- inibitori checkpoint immunitario
- La terapia genica
- vaccini tumorali.

## ***Bibliografia***

1. Dilek Y, Newcomb S, eds. *Ophiolite Concept and the Evolution of Geological Thought*. Boulder, Geological Society of America, 2003.
2. Engevik A Jr. *Bucket-Shaped Pots: Style, Chronology and Regional Diversity in Norway in the Late Roman and Migration Periods*. Oxford, Archaeopress, 2008.
3. Rapp GR. *Archaeomineralogy*. Berlin, Springer, 2009.
4. National Toxicology Program. NTP 11th report on carcinogens. *Rep Carcinog* 2004; 11: A1 A32.
5. Ribak J, Lilis R, Suzuki Y, et al. Malignant mesothelioma in a cohort of asbestos insulation workers: clinical presentation, diagnosis, and causes of death. *Br J Ind Med* 2008; 45: 182–187.
6. Wagner JC, Sleggs CA, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med* 1960; 17: 260–271.
7. Armstrong BK, Musk AW, Baker JE, et al. Epidemiology of malignant mesothelioma in Western Australia. *Med J Aust* 1984; 141: 86–88.
8. Gennaro V, Ceppi M, Boffetta P, et al. Pleural mesothelioma and asbestos exposure among Italian oil refinery workers. *Scand J Work Environ Health* 1994; 20: 213–215.
9. Musk AW, de Klerk NH. Epidemiology of malignant mesothelioma in Australia. *Lung Cancer* 2004; 45: Suppl. 1, S21–S23.
10. International Agency for Research on Cancer. Asbestos (Chrysolite, Amosite, Crocidolite, Tremolite, Actinolite, and Anthophyllite). In: *IARC Monographs. Arsenic, Metals, Fibres and Dusts*. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2009; pp. 147–167.
11. Morinaga K, Kishimoto T, Sakatani M, et al. Asbestos-related lung cancer and mesothelioma in Japan. *Ind Health* 2001; 39: 65–74.
12. Barrett JC, Lamb PW, Wiseman RW. Multiple mechanisms for the carcinogenic effects of asbestos and other mineral fibers. *Environ Health Perspect* 1989; 81: 81–89.

13. Stanton MF, Wrench C. Mechanisms of mesothelioma induction with asbestos and fibrous glass. *J Natl Cancer Inst* 1972; 48: 797–821.
14. Lippmann M. Deposition and retention of inhaled fibres: effects on incidence of lung cancer and mesothelioma. *Occup Environ Med* 1994; 51: 793–798.
15. Wagner JC, Berry G, Skidmore JW, et al. The effects of the inhalation of asbestos in rats. *Br J Cancer* 1974; 29: 252–269.
16. Robinson BW, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet* 2005; 366: 397–408.
17. European Union. Commission Directive 1999/77/EC of 26 July 1999. *Off J Eur Comm* 1999; L207: 18–20.
18. Bernstein DM, Rogers RA, Sepulveda R, et al. The pathological response and fate in the lung and pleura of chrysotile in combination with fine particles compared to amosite asbestos following short-term inhalation exposure: interim results. *Inhal Toxicol* 2010; 22: 937–962.
19. Ferrante D, Bertolotti M, Todisco A, et al. Cancer mortality and incidence of mesothelioma in a cohort of wives of asbestos workers in Casale Monferrato, Italy. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 1401–1405.
20. Peto J, Decarli A, La Vecchia C, et al. The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer* 1999; 79: 666–672.
21. Tossavainen A. Global use of asbestos and the incidence of mesothelioma. *Int J Occup Environ Health* 2004; 10: 22–22.
22. World Health Organization. *Elimination of Asbestos-Related Diseases*. Geneva, WHO, 2006.
23. Bianchi C, Bianchi T. Malignant mesothelioma: global incidence and relationship with asbestos. *Ind Health* 2007; 45: 379–387.
24. Gaafar RM, Eldin NH. Epidemic of mesothelioma in Egypt. *Lung Cancer* 2005; 49: Suppl. 1, S17–S20.

25. Takahashi K, Karjalainen A. A cross-country comparative overview of the asbestos situation in ten Asian countries. *Int J Occup Environ Health* 2003; 9: 244–248.
26. Luo S, Liu X, Mu S, et al. Asbestos related diseases from environmental exposure to crocidolite in Da-yao, China. I. Review of exposure and epidemiological data. *Occup Environ Med* 2003; 60: 35–41.
27. Joshi TK, Bhuvu UB, Katoch P. Asbestos ban in India: challenges ahead. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1076: 292–308.
28. Baris YI, Sahin AA, Ozesmi M, et al. An outbreak of pleural mesothelioma and chronic fibrosing pleurisy in the village of Karain/Urgup in Anatolia. *Thorax* 1978; 33: 181–119.
29. Virta RL. US Geological Survey: Mineral Commodity Summaries – Asbestos. <http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/asbestos/mcs-2013-asbes.pdf> Date last updated: January 2013.
30. Sakellariou K, Malamou-Mitsi V, Haritou A, et al. Malignant pleural mesothelioma from nonoccupational asbestos exposure in Metsovo (north-west Greece): slow end of an epidemic? *Eur Respir J* 1996; 9: 1206–1210.
31. Roushdy-Hammady I, Siegel J, Emri S, et al. Genetic-susceptibility factor and malignant mesothelioma in the Cappadocian region of Turkey. *Lancet* 2001; 357: 444–445.
32. Metintas S, Metintas M, Ucgun I, et al. Malignant mesothelioma due to environmental exposure to asbestos: follow-up of a Turkish cohort living in a rural area. *Chest* 2002; 122: 2224–2229.
33. Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, et al. Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. *Cancer Sci* 2012; 103: 868–874.
34. Travis LB, Fossa SD, Schonfeld SJ, et al. Second cancers among 40,576 testicular cancer patients: focus on long-term survivors. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97: 1354–1365.

35. Goodman JE, Nascarella MA, Valberg PA. Ionizing radiation: a risk factor for mesothelioma. *Cancer Causes Control* 2009; 20: 1237–1254.
36. Hodgson DC, Gilbert ES, Dores GM, et al. Long-term solid cancer risk among 5-year survivors of Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1489–1497.
37. Carbone M, Pass HI, Rizzo P, et al. Simian virus 40-like DNA sequences in human pleural mesothelioma. *Oncogene* 1994; 9: 1781–1790.
38. Hilleman MR. Discovery of simian virus 40 (SV40) and its relationship to poliomyelitis virus vaccines. *Dev Biol Stand* 1998; 94: 183–190.
39. Carbone M, Stach R, Di Resta I, et al. Simian virus 40 oncogenesis in hamsters. *Dev Biol Stand* 1998; 94: 273–279.
40. Poulin DL, DeCaprio JA. Is there a role for SV40 in human cancer? *J Clin Oncol* 2006; 24: 4356–4365.
41. Bergsagel DJ, Finegold MJ, Butel JS, et al. DNA sequences similar to those of SV40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. *N Engl J Med* 1992; 326: 988–993.
42. Vilchez RA, Madden CR, Kozinetz CA, et al. Association between simian virus 40 and non-Hodgkin lymphoma. *Lancet* 2002; 359: 817–823.
43. Vilchez RA, Kozinetz CA, Arrington AS, et al. Simian virus 40 in human cancers. *Am J Med* 2003; 114: 675–684.
44. Strickler HD. A multicenter evaluation of assays for detection of SV40 DNA and results in masked mesothelioma specimens. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 523–532.
45. Manfredi JJ, Dong J, Liu WJ, et al. Evidence against a role for SV40 in human mesothelioma. *Cancer Res* 2005; 65: 2602–2609.
46. Stratton K, Almario DA, McCormik MC, eds. Institute of Medicine (US). Immunization Safety Review: SV40 Contamination of Polio Vaccine and Cancer. Washington, National Academies Press, 2002.

47. Robinson C, van Bruggen I, Segal A, et al. A novel SV40 TAg transgenic model of asbestos-induced mesothelioma: malignant transformation is dose dependent. *Cancer Res* 2006; 66: 10786–10794.
48. Kroczyńska B, Cutrone R, Bocchetta M, et al. Crocidolite asbestos and SV40 are cocarcinogens in human mesothelial cells and in causing mesothelioma in hamsters. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 14128–14133.
49. Cristaudo A, Foddìs R, Vivaldi A, et al. SV40 enhances the risk of malignant mesothelioma among people exposed to asbestos: a molecular epidemiologic case-control study. *Cancer Res* 2005; 65: 3049–3052.
50. Røe OD, Anderssen E, Helge E, et al. Genome-wide profile of pleural mesothelioma versus parietal and visceral pleura: the emerging gene portrait of the mesothelioma phenotype. *PLoS One* 2009; 4: e6554.
51. Hinescu ME, Gherghiceanu M, Suciú L, et al. Telocytes in pleura: two- and three-dimensional imaging by transmission electron microscopy. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 389–397.
52. Mutsaers SE. The mesothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 9–16.
53. Light RW, Lee YCG, eds. *Textbook of Pleural Diseases*. 1st Edn. London, Arnold, 2003.
54. Taskinen E, Ahlmann K, Wukeri M. A current hypothesis of the lymphatic transport of inspired dust to the parietal pleura. *Chest* 1973; 64: 193–196.
55. Sebastien P, Janson X, Gaudichet A, et al. Asbestos retention in human respiratory tissues: comparative measurements in lung parenchyma and in parietal pleura. *IARC Sci Publ* 1980; 30: 237–246.
56. Boulanger G, Andujar P, Pairon JC, et al. Quantification of short and long asbestos fibers to assess asbestos exposure: a review of fiber size toxicity. *Environ Health* 2014; 13: 59.
57. McDonald JC, Armstrong BG, Edwards CW, et al. Case-referent survey of young adults with mesothelioma: I. Lung fibre analyses. *Ann Occup Hyg* 2001; 45: 513–518.



58. Bridda A, Padoan I, Mencarelli R, et al. Peritoneal mesothelioma: a review. *MedGenMed* 2007; 9: 32.
59. Herrick SE, Mutsaers SE. Mesothelial progenitor cells and their potential in tissue engineering. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 621–642.
60. Bolen JW, Hammar SP, McNutt MA. Reactive and neoplastic serosal tissue. A light-microscopic, ultrastructural, and immunocytochemical study. *Am J Surg Pathol* 1986; 10: 34–47.
61. Kettunen E, Nissen AM, Ollikainen T, et al. Gene expression profiling of malignant mesothelioma cell lines: cDNA array study. *Int J Cancer* 2001; 91: 492–496.
62. Kim JC, Badano JL, Sibold S, et al. The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat Genet* 2004; 36: 462–470.
63. Kothmaier H, Quehenberger F, Halbwedl I, et al. EGFR and PDGFR differentially promote growth in malignant epithelioid mesothelioma of short and long term survivors. *Thorax* 2008; 63: 345–351.
64. Rinkevich Y, Mori T, Sahoo D, et al. Identification and prospective isolation of a mesothelial precursor lineage giving rise to smooth muscle cells and fibroblasts for mammalian internal organs, and their vasculature. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 1251–1260.
65. Boutin C, Schlessner M, Frenay C, et al. Malignant pleural mesothelioma. *Eur Respir J* 1998; 12: 972–981.
66. Acevedo-Duncan M, Patel R, Whelan S, et al. Human glioma PKC- $\iota$  and PKC- $\beta$ II phosphorylate cyclindependent kinase activating kinase during the cell cycle. *Cell Prolif* 2002; 35: 23–36.
67. Jaurand MC, Fleury-Feith J. Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma. *Respirology* 2005; 10: 2–8.

68. Jean D, Daubriac J, Le Pimpec-Barthes F, et al. Molecular changes in mesothelioma with an impact on prognosis and treatment. *Arch Pathol Lab Med* 2012; 136: 277–293.
- 69 Fennell DA. Genetics and molecular biology of mesothelioma. *Recent Results Cancer Res* 2011; 189: 149–167.
70. Christensen BC, Houseman EA, Godleski JJ, et al. Epigenetic profiles distinguish pleural mesothelioma from normal pleura and predict lung asbestos burden and clinical outcome. *Cancer Res* 2009; 69: 227–234.
71. Roe OD, Anderssen E, Sandeck H, et al. Malignant pleural mesothelioma: genome-wide expression patterns reflecting general resistance mechanisms and a proposal of novel targets. *Lung Cancer* 2010; 67: 57–68.
72. Gee GV, Koestler DC, Christensen BC, et al. Downregulated microRNAs in the differential diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Int J Cancer* 2010; 127: 2859–2869.
73. Hosako M, Muto T, Nakamura Y, et al. Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker. *J Proteomics* 2012; 75: 833–844.
74. Jaurand MC, Kheuang L, Magne L, et al. Chromosomal changes induced by chrysotile fibres or benzo-3,4-pyrenein rat pleural mesothelial cells. *Mutat Res* 1986; 169: 141–148.
75. Bignon J, Jaurand MC. Biological in vitro and in vivo responses of chrysotile versus amphiboles. *Environ Health Perspect* 1983; 51: 73–80.
76. Suzuki Y, Yuen SR, Ashley R. Short, thin asbestos fibers contribute to the development of human malignant mesothelioma: pathological evidence. *Int J Hyg Environ Health* 2005; 208: 201–210.
77. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; 25: 25–29.

78. Murthy SS, Testa JR. Asbestos, chromosomal deletions, and tumor suppressor gene alterations in human malignant mesothelioma. *J Cell Physiol* 1999; 180: 150–157.
79. Assoian RK, Yung Y. A reciprocal relationship between Rb and Skp2: implications for restriction point control, signal transduction to the cell cycle and cancer. *Cell Cycle* 2008; 7: 24–27.
80. Yang CT, You L, Yeh CC, et al. Adenovirus-mediated p14ARF gene transfer in human mesothelioma cells. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 636–641.
81. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene* 2006; 25: 5220–5227.
82. Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, et al. TNF- $\alpha$  inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF- $\kappa$ B-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 10397–10402.
83. Sartore-Bianchi A, Gasparri F, Galvani A, et al. Bortezomib inhibits nuclear factor- $\kappa$ B dependent survival and has potent in vivo activity in mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 5942–5951.
84. Altieri DC. The case for survivin as a regulator of microtubule dynamics and cell-death decisions. *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 609–615.
85. Dobra K, Nurminen M, Hjerpe A. Growth factors regulate the expression profile of their syndecan co-receptors and the differentiation of mesothelioma cells. *Anticancer Res* 2003; 23: 2435–2444.
86. Shukla A, Hillegass JM, MacPherson MB, et al. ERK2 is essential for the growth of human epithelioid malignant mesotheliomas. *Int J Cancer* 2011; 129: 1075–1086.
87. Ramos-Nino ME, Timblin CR, Mossman BT. Mesothelial cell transformation requires increased AP-1 binding activity and ERK-dependent Fra-1 expression. *Cancer Res* 2002; 62: 6065–6069.

88. Ramos-Nino ME, Blumen SR, Sabo-Attwood T, et al. HGF mediates cell proliferation of human mesothelioma cells through a PI3K/MEK5/Fra-1 pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008; 38: 209–217.
89. Jagadeeswaran R, Ma PC, Seiwert TY, et al. Functional analysis of c-Met/hepatocyte growth factor pathway in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res* 2006; 66: 352–361.
90. Levallet G, Vaisse-Lesteven M, Le Stang N, et al. Plasma cell membrane localization of c-MET predicts longer survival in patients with malignant mesothelioma: a series of 157 cases from the MESOPATH Group. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 599–606.
91. Wilson SM, Barbone D, Yang TM, et al. mTOR mediates survival signals in malignant mesothelioma grown as tumor fragment spheroids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 39: 576–583.
92. Hillegass JM, Miller JM, MacPherson MB, et al. Asbestos and erionite prime and activate the NLRP3 inflammasome that stimulates autocrine cytokine release in human mesothelial cells. *Part Fibre Toxicol* 2013; 10: 39.
93. Hillegass JM, Shukla A, Lathrop SA, et al. Inflammation precedes the development of human malignant mesotheliomas in a SCID mouse xenograft model. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1203: 7–14.
94. Hashimoto K, Araki K, Osaki M, et al. MCM2 and Ki-67 expression in human lung adenocarcinoma: prognostic implications. *Pathobiology* 2004; 71: 193–200.
95. Hassan R, Ho M. Mesothelin targeted cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 2008; 44: 46–53.
96. Hoang CD, D’Cunha J, Kratzke MG, et al. Gene expression profiling identifies matriptase overexpression in malignant mesothelioma. *Chest* 2004; 125: 1843–1852.
97. Jacquemont C, Taniguchi T. Proteasome function is required for DNA damage response and fanconi anemia pathway activation. *Cancer Res* 2007; 67: 7395–7405.
98. Jackson DE. The unfolding tale of PECAM-1. *FEBS Lett* 2003; 540: 7–14.

99. Huang H, Regan KM, Wang F, et al. Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 1649–1654.
100. Jung BH, Beck SE, Cabral J, et al. Activin type 2 receptor restoration in MSI-H colon cancer suppresses growth and enhances migration with activin. *Gastroenterology* 2007; 132: 633–644.
101. Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: D480–D484.
102. Bueno R, De Rienzo A, Dong L, et al. Second generation sequencing of the mesothelioma tumor genome. *PLoS One* 2010; 5: e10612.
103. Neri M, Ugolini D, Dianzani I, et al. Genetic susceptibility to malignant pleural mesothelioma and other asbestos-associated diseases. *Mutat Res* 2008; 659: 126–136.
104. Matullo G, Guarrera S, Betti M, et al. Genetic variants associated with increased risk of malignant pleural mesothelioma: a genome-wide association study. *PLoS One* 2013; 8: e61253.
105. Ugolini D, Neri M, Ceppi M, et al. Genetic susceptibility to malignant mesothelioma and exposure to asbestos: the influence of the familial factor. *Mutat Res* 2013; 658: 162–171.
106. Carbone M, Yang H, Pass HI, et al. BAP1 and cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 153–159.
107. Testa JR, Cheung M, Pei J, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet* 2011; 43: 1022–1025.
108. Carbone M, Yang H. Molecular pathways: targeting mechanisms of asbestos and erionite carcinogenesis in mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 598–604.
109. Bott M, Brevet M, Taylor BS, et al. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet* 2011; 43: 668–672.
110. Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T, et al. Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. *Cancer Sci* 2012; 103: 868–874.

111. Beyer HL, Geschwindt RD, Glover CL, et al. MESOMARK: a potential test for malignant pleural mesothelioma. *Clin Chem* 2007; 53: 666–672.
112. Robinson BW, Creaney J, Lake R, et al. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* 2003; 362: 1612–1616.
113. 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.
114. Gubbels JA, Belisle J, Onda M, et al. Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. *Mol Cancer* 2006; 5: 50.
115. Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, et al. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem* 2004; 279: 9190–9198.
116. Pass HI, Lott D, Lonardo F, et al. Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. *N Engl J Med* 2008; 53: 1564–1573.
117. Azim HA Jr., Gaafar R, Abdel Salam I, et al. Soluble mesothelin-related protein in malignant pleural mesothelioma. *J Egypt Natl Canc Inst* 2008; 20: 224–229.
118. Roe OD, Creaney J, Lundgren S, et al. Mesothelin-related predictive and prognostic factors in malignant mesothelioma: a nested case-control study. *Lung Cancer* 2008; 61: 235–243.
119. Kraemer S, Vaught JD, Bock C, et al. From SOMAmer-based biomarker discovery to diagnostic and clinical applications: a SOMAmer-based, streamlined multiplex proteomic assay. *PLoS One* 2011; 6: e26332.
120. Ostroff RM, Mehan MR, Stewart A, et al. Early detection of malignant pleural mesothelioma in asbestos-exposed individuals with a noninvasive proteomics-based surveillance tool. *PLoS One* 2012; 7: e46091.

121. 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.
122. Kirschner MB, Cheng YY, Badrian B, et al. Increased circulating miR-625-3p: a potential biomarker for patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 1184–1191.
123. Creaney J, Dick IM, Meniawy TM, et al. Comparison of fibulin-3 and mesothelin as markers in malignant mesothelioma. *Thorax* 2014; 69: 895–902.
124. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases* 2007; 2: MR17–MR71.
125. Lu F, Gu L, Meziani MJ, et al. Advances in bioapplications of carbon nanotubes. *Adv Mater* 2009; 21: 139–152.
126. Prato M, Kostarelos K, Bianco A. Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery. *Acc Chem Res* 2008; 41: 60–68.
127. Krätschmer K, Lamb L, Fostiropoulos K, et al. Solid C<sub>60</sub>: a new form of carbon. *Nature* 1990; 347: 354–335.
128. Iijima S, Ichihashi T. Single-shell carbon nanotubes of 1 nm diameter. *Nature* 1993; 363: 603–605.
129. Kwon YK, Tomanek D. Electronic and structural properties of multiwall carbon nanotubes. *Physical Rev B* 1998; 58: R16001–R16004.
130. Elgrabli D, Floriani M, Abella-Gallart S, et al. Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung. *Part Fibre Toxicol* 2008; 5: 20.
131. Ryman-Rasmussen JP, Cesta MF, Brody AR, et al. Inhaled carbon nanotubes reach the subpleura tissue in mice. *Nat Nanotech* 2009; 4: 747–751.

132. Porter DW, Hubbs AF, Mercer RR, et al. Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology* 2010; 269: 136–147.
133. Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, et al. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2003;21(14):2636–2644.
134. Treasure T, Lang-Lazdunski L, Waller D, et al; MARS trialists. Extra-pleural pneumonectomy versus no extra-pleural pneumonectomy for patients with malignant pleural mesothelioma: clinical outcomes of the Mesothelioma and Radical Surgery (MARS) randomised feasibility study. *Lancet Oncol*. 2011;12(8):763–772.
135. Flores RM, Zakowsky M, Venkatraman E, et al. Prognostic factors in the treatment of malignant pleural mesothelioma at a large tertiary referral center. *J Thorac Oncol*. 2007;2(10):957–965.
136. Lang-Lazdunski L, Bille A, Lal R, et al. Pleurectomy/decortication is superior to extrapleural pneumonectomy in the multimodality management of patients with malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol*. 2012;7(4):737–743.
137. Scorsetti M, Bignardi M, Clivio A, et al. Volumetric modulation arc radiotherapy compared with static gantry intensity-modulated radiotherapy for malignant pleural mesothelioma tumor: a feasibility study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2010;77(3):942–949.
138. Krayenbuehl J, Dimmerling P, Ciernik IF, Riesterer O. Clinical outcome of postoperative highly conformal versus 3D conformal radiotherapy in patients with malignant pleural mesothelioma. *Radiat Oncol*. 2014;9:32.
139. Minatel E, Trovo, M, Polesel J, et al. Tomotherapy after pleurectomy/decortication or biopsy for malignant pleural mesothelioma allows the delivery of high dose of radiation in patients with intact lung. *J Thorac Oncol*. 2012;7(12):1862–1866.



140. Minatel E, Trovo M, Polesel J, et al. Radical pleurectomy/decortication followed by high dose of radiation therapy for malignant pleural mesothelioma. Final results with long-term follow up. *Lung Cancer*. 2014;83(1):78–82.
141. Rosenzweig KE, Zauderer MG, Laser B, et al. Pleural intensity-modulated radiotherapy for malignant pleural mesothelioma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012;83(4):1278–1283.
142. Bölükbas S, Manegold C, Eberlein M, Bergmann T, Fisseler-Eckhoff A, Schirren J. Survival after trimodality therapy for malignant pleural mesothelioma: radical pleurectomy, chemotherapy and cisplatin/pemetrexed and radiotherapy. *Lung Cancer*. 2011;71(1):75–81.
143. Tsao AS, Wistuba I, Roth JA, Kindler HL. Malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2009 Apr 20;27(12):2081-90. doi: 10.1200/JCO.2008.19.8523. Epub 2009 Mar 2. Review.
144. Van der Heijden AG, Verhaegh G, Jansen CF, Schalken JA, Witjes JA. Effect of hyperthermia on the cytotoxicity of 4 chemotherapeutic agents currently used for the treatment of transitional cell carcinoma of the bladder: an in vitro study. *J Urol*. 2005;173:1375–80.
145. Refaely Y, Simansky DA, Paley M, Gottfried M, Yellin A. Resection and perfusion thermochemotherapy: a new approach for the treatment of thymic malignancies with pleural spread. *Ann Thorac Surg* 2001;72:366–70.
146. Ried M, Potzger T, Braune N, Neu R, Zausig Y, Schalke B et al. Cyto-reductive surgery and hyperthermic intrathoracic chemotherapy perfusion for malignant pleural tumours: perioperative management and clinical experience. *Eur J Cardiothorac Surg* 2013;43:801–7.
147. De Bree E, van Ruth S, Schotborgh CE, Baas P, Zoetmulder FA. Limited cardiotoxicity after extensive thoracic surgery and intraoperative hyperthermic intrathoracic chemotherapy with doxorubicin and cisplatin. *Ann Surg Oncol* 2007;14:3019–26.
148. Ried M, Potzger T, Braune N, Diez C, Neu R, Sziklavari Z et al. Local and systemic exposure of cisplatin during hyperthermic intrathoracic chemotherapy perfusion after

pleurectomy and decortication for treatment of pleural malignancies. *J Surg Oncol* 2013;107:735–40.

149. Ratto GB, Civalleri D, Esposito M, Spessa E, Alloisio A, De Cian F et al. Pleural space perfusion with cisplatin in the multimodality treatment of malignant mesothelioma: a feasibility and pharmacokinetic study. *J Thorac Cardiovas Surg* 1999;117:759–65.

150. Yellin A, Simansky DA, Paley M, Refaely Y. Hyperthermic pleural perfusion with cisplatin: early clinical experience. *Cancer*. 2001;92:2197–203.

151. De Bree E, van Ruth S, Baas P, Rutgers EJ, van Zandwijk N, Witkamp AJ et al. Cytoreductive surgery and intraoperative hyperthermic intrathoracic chemotherapy in patients with malignant pleural mesothelioma or pleural metastases of thymoma. *Chest*. 2002;121:480–7.

152. Gomez DR, Hong DS, Allen PK, et al. Patterns of failure, toxicity, and survival after extrapleural pneumonectomy and hemithoracic intensity-modulated radiation therapy for malignant pleural mesothelioma. *J Thorac Oncol*. 2013;8(2):238–245.