

**UNIVERSITÀ
DI PAVIA**

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Direttore Chiar.ma Prof.ssa Simona Collina

**LAUREA MAGISTRALE A CICLO UNICO IN
FARMACIA**

**La mutazione del gene BAP1 nel
Mesotelioma Pleurico: nuove
prospettive per la Target Therapy**

Relatore: Chiar.ma Prof.ssa ANNALISA BARBIERI

Correlatore: Chiar.mo Prof. LUCIANO MUTTI

Tesi di Laurea Magistrale a Ciclo Unico di

VITTORIA CUCCHI

Matricola 500751

Anno Accademico 2025-2026

A mia nonna

INDICE

INTRODUZIONE

CAPITOLO 1: Epidemiologia

- 1.1 Proprietà e classificazione dell'amianto
- 1.2 Evoluzione storica e diffusione
- 1.3 Carico polmonare
- 1.4 Dati epidemiologici
- 1.5 Modelli matematici

CAPITOLO 2: Meccanismi patogenetici nel mesotelioma

- 2.1 L'innescò
 - 2.1.1 La risposta macrofagica e la fagocitosi frustata
 - 2.1.2 Il ruolo del ferro e lo stress ossidativo
 - 2.1.3 L'alterazione dell'omeostasi e il sequestro del ferro
 - 2.1.4 I corpi ferruginosi dell'asbesto (AFB)
 - 2.1.5 Suscettibilità genetica correlata al ferro
- 2.2 Genotossicità indotta dalle fibre di amianto
- 2.3 Microambiente tumorale
 - 2.3.1 Polarizzazione dei TAM
 - 2.3.2 Chemioresistenza e scudo immunitario
 - 2.3.3 Invasione tumorale
- 2.4 La risposta cellulare
 - 2.4.1 Vie di segnalazione del danno
 - 2.4.2 Infiammazione
 - 2.4.3 Proliferazione cellulare
 - 2.4.4 La via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR
 - 2.4.5 La via di segnalazione del calcio
- 2.5 Adattamento cellulare
 - 2.5.1 Adattamento all'ipossia
 - 2.5.2 Autofagia
 - 2.5.3 Transizione epitelio-mesenchimale (EMT)

CAPITOLO 3: La mutazione del gene BAP1 nel mesotelioma pleurico maligno

- 3.1 Il gene BAP1
 - 3.1.1 Caratteristiche generali e meccanismi d'azione
 - 3.1.2 Mutazioni germinali e somatiche

CAPITOLO 4: Le due facce della medaglia: il paradosso della mutazione di BAP1

- 4.1 Meccanismi di promozione tumorale
 - 4.1.1 Risposta infiammatoria
 - 4.1.2 Riparazione del DNA
 - 4.1.3 Regolazione del ciclo cellulare
 - 4.1.4 Controllo epigenetico
 - 4.1.5 Apoptosi e ferroptosi
 - 4.1.6 Stress metabolico

- 4.2 Maggiore indice di sopravvivenza

- 4.3 Maggiore risposta alle terapie
 - 4.3.1 Lo scenario terapeutico attuale
 - 4.3.2 Limitazioni terapeutiche e fallimenti clinici

CAPITOLO 5: BAP1 come biomarker predittivo

- 5.1 Diagnostica

- 5.2 Eterogeneità clinica

- 5.3 Nuove frontiere diagnostiche e terapeutiche
 - 5.3.1 Protocolli di sorveglianza
 - 5.3.2 Targeting molecolare

CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

INTRODUZIONE

Il mesotelioma maligno è una neoplasia estremamente aggressiva e letale che origina nelle cellule mesoteliali delle cavità sierose. Colpisce prevalentemente la pleura (70%), ma può riguardare anche il peritoneo, il pericardio e la tunica vaginale del testicolo. [1]

È un tumore causato principalmente dall'esposizione alle fibre di amianto (chiamato anche asbesto), che, una volta inalate, provocano uno stato infiammatorio cronico e persistente nella pleura. [2]

Il mesotelio è costituito da un monostrato di cellule specializzate, le cellule mesoteliali, che rivestono le cavità sierose proteggendo gli organi interni. Formano una superficie liscia, non adesiva e lubrificata in grado di facilitare i movimenti viscerali e, nel caso specifico della pleura polmonare, la respirazione. Le cellule mesoteliali, a seguito di infiammazione, perdono parte del citoplasma e si aggregano, innescando cascate biologiche che favoriscono la migrazione e la trasformazione neoplastica. [2, 3]

Questo tumore è caratterizzato da un lungo tempo di latenza, compreso tra i 30 e i 40 anni dopo la prima esposizione. Questo fa sì che ancora oggi l'incidenza del mesotelioma sia elevata, stimata tra 7 e 40 casi per milione, nonostante il divieto di utilizzo dell'asbesto in molti paesi. [2]

La diagnosi avviene in fase avanzata, e questo rende l'aspettativa di vita molto bassa, compresa, a seconda dello stadio, tra gli 8 e i 22 mesi dopo la diagnosi. [2]

Le cellule mesoteliali sono altamente suscettibili alla citotossicità dell'amianto, che contribuisce alla cancerogenesi. La mancanza di un programma di *screening* efficace ad individuare la malattia precocemente

aggrava la prognosi: la maggior parte dei pazienti riceve un trattamento di prima linea che prolunga la sopravvivenza di soli circa tre mesi. [4]

Secondo l'*Organizzazione Mondiale della Sanità* (OMS), il mesotelioma pleurico è suddiviso in tre varianti istologiche principali, la cui distinzione è fondamentale per la scelta terapeutica:

- epitelioide (60%): è la variante più comune, caratterizzata da una minore aggressività data da una crescita più lenta che caratterizza una prognosi migliore;
- sarcomatoide (10%): è la forma più aggressiva, associata ad una resistenza alle terapie e ad una prognosi infausta;
- bifasica (30%): comprende cellule delle due tipologie precedenti e la prognosi dipende dal tipo di cellula prevalente. [2]

La malattia è solitamente unilaterale (95%), localizzata prevalentemente nell'emitorace destro (60%). I sintomi si manifestano quando il tumore è ad uno stadio già avanzato e sono caratterizzati da *dispnea progressiva* dovuta dal versamento pleurico, tosse secca e dolore toracico non pleurico. Possono essere presenti anche febbre, astenia, ipossia, perdita di peso o sudorazione notturna. L'età media di diagnosi è di circa 76 anni. [4, 5]

La diagnosi definitiva si basa su risultati morfologici e immunoistochimici, dati dall'integrazione tra *imaging* (radiografia del torace) ed esami istopatologici su campioni di tessuti ottenuti tramite la biopsia o l'analisi citologica del versamento pleurico. [1]

Un segno distintivo del mesotelioma è l'*invasione tissutale*, che coinvolge sottili strati di collagene. L'uso di marcatori come la calretinina è fondamentale per distinguere il tumore dai normali processi infiammatori. [4]

A differenza di altre tipologie tumorali, non sono stati ancora identificati nel mesotelioma *driver* oncogenici. [4]

Negli ultimi anni, grazie alla migliore conoscenza dei meccanismi tumorali, l'attenzione si è concentrata sull'analisi genomica. [5] Uno degli aspetti chiave del mesotelioma è la presenza di alterazioni genomiche in grado di favorire lo sviluppo, tra cui principalmente l'alterazione del *gene oncosoppressore BAP1* e l'inattivazione dei soppressori tumorali CKDN2A e NF2. [2]

Studi recenti confermano l'importanza della perdita di funzione di BAP1 nell'insorgenza e nella progressione del cancro, tramite la modulazione della riparazione del danno al DNA e di altri meccanismi cellulari fondamentali alla sopravvivenza del tumore. La comprensione del suo ruolo ha permesso di aprire la strada a nuove strategie terapeutiche, tra cui gli inibitori PARP. [6]

Nonostante i progressi della ricerca, il mesotelioma rimane una sfida clinica aperta che rende l'approfondimento dei meccanismi patogenetici fondamentale per superare l'attuale approccio terapeutico, prettamente palliativo e di scarsa efficacia. [4]

1. EPIDEMIOLOGIA

Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è una neoplasia altamente aggressiva associata all'asbesto. Si stima che circa l'80% dei casi sia riconducibile all'esposizione alle fibre di amianto, in modo diretto (professionale) o indiretto (ambientale o familiare). [7]

Dalla seconda metà del secolo scorso, l'amianto è stato riconosciuto come cancerogeno umano di gruppo 1. L'amianto è responsabile dello sviluppo della patologia tra il 5% e il 10% dei lavoratori esposti. [7, 8]

Ancora oggi l'amianto è considerato un pericolo a causa del lungo tempo di latenza tra la prima esposizione e l'insorgenza della patologia, stimato tra i 30 e i 40 anni. [8]

1.1 PROPRIETA' E CLASSIFICAZIONE DELL'AMIANTO

Il termine amianto deriva dal greco *inestinguibile*, per le sue proprietà isolanti fisiche ed elettrochimiche che perdurano per 5000 anni. Identifica un gruppo di minerali presenti in natura contenenti il tetraedro di silicato, in forma fibrosa.

Si distinguono 6 tipologie principali, tra le 400 fibre minerali presenti in natura, e si suddividono in due sottogruppi: classe del serpentino (crisotilo, definito anche *amianto bianco*) e classe degli anfiboli (tra cui crocidolite, definita anche *amianto blu*, e amosite). [9, 10]

L'uso industriale diffuso dell'amianto nel secolo scorso ha coinvolto principalmente la crocidolite, l'amosite e il crisotilo, in un rapporto di rischio di 1:100:500. [11] Il crisotilo ha un'elevata rilevanza commerciale e rappresenta il 95% di tutto l'amianto estratto e utilizzato a livello globale. [12]

Secondo l'*ipotesi di Stanton*, il potenziale oncogeno delle fibre dipende dalle loro caratteristiche fisiche (tra cui diametro e lunghezza) e la biopersistenza nei tessuti. Esistono altre varietà di anfiboli, non tabellate, che si possono presentare in forma asbestiforme e potrebbero rappresentare un rischio cancerogeno. [13]

1.2 EVOLUZIONE STORICA E DIFFUSIONE

L'amianto iniziò ad essere utilizzato a fine Ottocento e divenne popolare negli anni '20, raggiungendo il picco durante la Seconda Guerra Mondiale e la ricostruzione post-bellica, dove si iniziò a diffondere rapidamente il mesotelioma. Oltre all'uso edilizio e industriale, l'amianto è stato miscelato in migliaia di prodotti, tra cui freni e guarnizioni di auto, navi e treni, materiali isolanti, componenti elettrici, lastre di cemento e piastrelle, e persino filtri di sigarette. [13, 14]

Negli Stati Uniti il picco di incidenza di mesotelioma è stato raggiunto precocemente, nell'ultimo decennio del secolo scorso, come conseguenza dell'uso dell'asbesto negli anni '20 (*Figura 1*). [14]

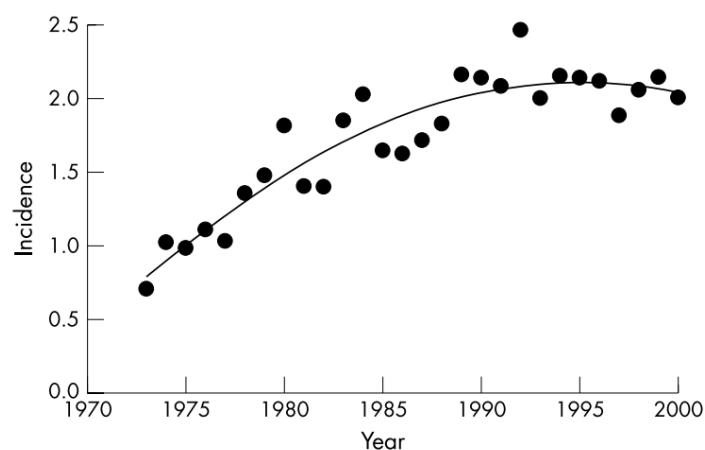


Figura 1: Incidenza del mesotelioma nel genere maschile. [14]

Al contrario, in Europa, la popolazione maggiormente colpita è quella nata alla fine degli anni '40, a causa dell'impiego dell'amianto nella

ricostruzione post-bellica durante il boom economico, che ha determinato un ritardo nella curva epidemica (*Figura 2*). [14]

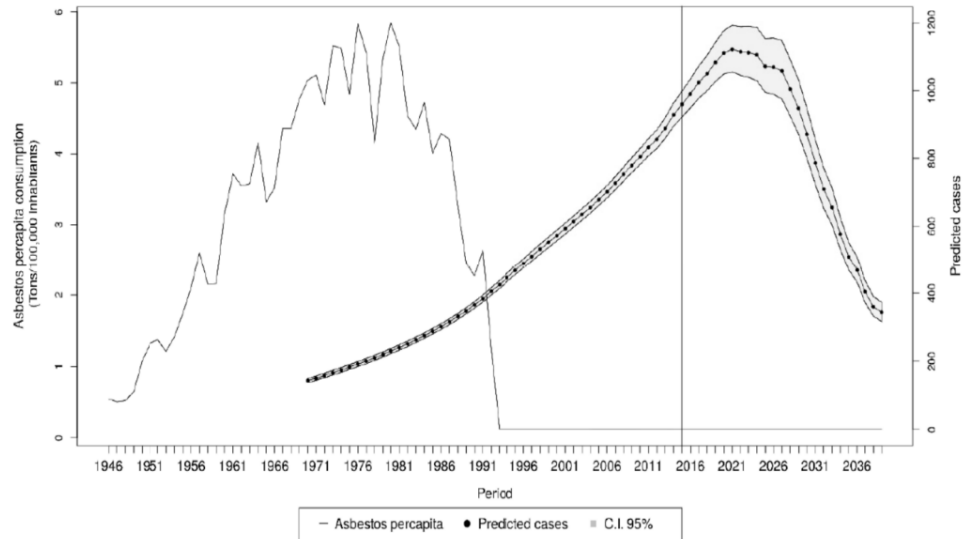


Figura 2: Consumo di asbesto e casi reali e previsti di Mesotelioma Pleurico Maligno fino al 2040 in Italia secondo uno studio di Oddone et al. (2021)

Ad oggi l'uso dell'amianto è vietato in 55 paesi, inclusi Stati Uniti, Europa occidentale e Australia. [15] Grazie a queste misure restrittive, l'incidenza e la mortalità complessive sono diminuite ma la produzione globale rimane elevata (1,1 milioni di tonnellate/anno) in nazioni come Russia, Cina, Kazakistan, Zimbabwe e Brasile, dove si può ipotizzare ci siano numerosi casi non segnalati. [15, 16]

Nonostante il divieto, il deterioramento dell'amianto installato nel secolo scorso mantiene alto il rischio di sviluppo tumorale. Si stima che oltre 20 milioni di case negli Stati Uniti contengono amianto o presentano tetti di amianto. [17, 18]

1.3 CARICO POLMONARE

Il carico polmonare, definito come la presenza di amianto nei polmoni, è lo strumento più affidabile per attribuire all'inalazione dell'amianto l'insorgenza della patologia. [19] I rischi di mesotelioma non possono essere calcolati sulla base degli studi sulle coorti occupazionali passati, in quanto i livelli di esposizione non possono essere stimati. Il carico polmonare di amianto è l'unico indicatore misurabile dell'esposizione da poter essere considerato affidabile. [20]

Normalmente l'amianto è presente nei polmoni di individui sani ma in concentrazioni significativamente inferiori rispetto ai pazienti malati di mesotelioma. Il *cut-off* usato per indicare precedenti esposizioni all'amianto è di 100.000 ff/gdw. Il contenuto di amianto nei polmoni viene valutato su piccoli frammenti polmonari in formalina. [19]

In passato, il rischio è stato sottostimato a causa dei limiti della microscopia ottica, incapace di rilevare le fibre ultrasottili con diametro inferiore a 0,25 micrometri. Con l'avvento della microscopia elettronica a trasmissione (TEM) è stato possibile identificare carichi polmonari molto più elevati rispetto a quelli ipotizzati in precedenza, evidenziando come la pericolosità del minerale sia stata a lungo sottostimata. [21]

Dal 2011 le concentrazioni di amianto nei polmoni dei pazienti affetti da mesotelioma sono diminuite. [19]

1.4 DATI EPIDEMIOLOGICI

Il carico globale del mesotelioma non è chiaro a causa dei diversi metodi di registrazione e segnalazione d'uso nei vari paesi. [22]

L'OMS (*Organizzazione Mondiale della Sanità*) ha stimato nel 2004 oltre 107.000 decessi annui correlati all'uso dell'amianto, tra cui casi di

mesotelioma, asbestosi e cancro al polmone. In Europa sono stati registrati il 54% dei decessi mondiali per il mesotelioma tra il 1994 e il 2016.

Da uno studio eseguito da *Hassan et al.* (2019) su 434 pazienti, il 74% ha riferito una storia di esposizione, professionale o ambientale/familiare. [23]

Il rapporto di rischio tra maschi e femmine varia tra 4:1 e 8:1, con una prevalenza maschile causata presumibilmente dall'esposizione professionale. [18]

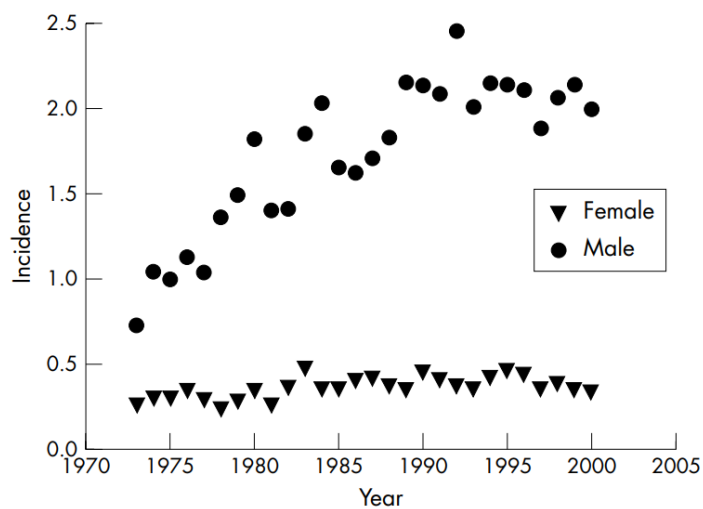


Figura 3: Profilo di incidenza del mesotelioma a seconda del genere.

Nella seguente tabella sono riassunte le caratteristiche del mesotelioma in base al sesso:

Parametro	Maschi (n=49)	Femmine (n=46)	valore p
Età del decesso (media)	70,65 anni	68,41 anni	0,3412
Latenza media	48,63 anni	50,59 anni	0,4817

Esposizione occupazionale	33 casi	4 casi	-
Esposizione domestica	4 casi	13 casi	-
Esposizione ambientale	12 casi	28 casi	-
Nessuna esposizione	0 casi	1 caso	-

Nelle donne la patologia è spesso legata all'esposizione domestica (il contatto con indumenti contaminati) o ambientale. [19, 24] Le donne presentano una maggiore concentrazione di fibre di crisotilo e una sopravvivenza migliore rispetto agli uomini, indipendentemente da età e terapie attuate, nonostante il profilo istologico sia simile in entrambi i sessi. [18, 19]

1.5 MODELLI MATEMATICI

Julian Peto scoprì una legge matematica correlata all'epidemiologia del mesotelioma, la *Terza Potenza del Tempo*, in grado di spiegare il lungo periodo di latenza. Secondo questa teoria, il rischio non aumenta linearmente al tempo, ma in maniera esponenziale in funzione della terza o della quarta potenza rispetto al tempo trascorso dalla prima esposizione. [21]

L'analisi epidemiologica condotta da *Peto et al.* (1999) evidenzia anche come l'incidenza del mesotelioma non segua un andamento uniforme a livello globale, ma rifletta fedelmente la storia industriale di ciascun Paese.

La valutazione del rischio cancerogeno associato all'esposizione alle fibre di amianto si sviluppa con due modelli: il modello lineare senza soglia (*Linear No-Threshold, LNT*) e il modello a soglia (*Threshold Model*).

Il modello LNT deriva da alcuni studi effettuati con le radiazioni ionizzanti ed è stato adottato dagli enti regolatori a scopo preventivo. Secondo questa teoria, il mesotelioma è correlato in modo direttamente proporzionale alla dose cumulativa di amianto inalata, e non esiste una dose sicura al di sotto della quale il rischio di sviluppare la patologia sia nullo.

Secondo questa teoria, anche l'interazione con una singola fibra potrebbe innescare la trasformazione neoplastica (*one fiber theory*). Diversi studi supportano l'ipotesi che il mesotelioma pleurico, contrariamente al tumore al polmone, evidenzia tassi crescenti di sviluppo della patologia nonostante bassi livelli di esposizione. [25]

A differenza del cancro al polmone, la relazione dose-risposta appare lineare e senza una soglia di sicurezza evidente. Anche esposizioni cumulative ma modeste possono essere sufficienti ad innescare la trasformazione neoplastica, e confermano l'ipotesi che la malattia possa essere innescata anche da poche fibre.

Nel modello a soglia, la *one fiber theory* è biologicamente implausibile, considerando che non tutti coloro che sono esposti all'amianto sviluppano il mesotelioma.

Questo viene giustificato da due meccanismi di difesa dell'organismo, la clearance e l'omeostasi dello stato ossidativo della cellula. Nel primo caso, l'efficienza dei macrofagi e del sistema mucociliare nel rimuovere la fibra di amianto permette di evitare che piccole dosi possano sviluppare infiammazione; nel secondo caso la capacità delle cellule di neutralizzare i ROS prodotti dal ferro permette di spegnere lo stress ossidativo indotto.

Il mesotelioma, secondo questo modello, si svilupperebbe sopra ad una certa soglia, in grado di saturare i meccanismi di clearance e innescare la fagocitosi frustrata persistente, generando stress ossidativo cronico. Tale soglia presenta un'elevata variabilità interindividuale. [20, 25]

2. MECCANISMI PATOGENETICI NEL MESOTELIOMA

In questo capitolo verranno analizzati i meccanismi patogenetici attraverso cui le fibre di amianto inducono la trasformazione neoplastica a livello cellulare. La cancerogenesi è un processo multifattoriale, causato principalmente da uno stato infiammatorio cronico. I meccanismi molecolari responsabili del danno alle cellule mesoteliali non sono ancora del tutto chiariti, ma sembrano dipendere dallo sviluppo di specie reattive dell'ossigeno (ROS), da alterazioni dell'omeostasi del ferro e da danni del genoma permanenti. L'amianto attiva vie di segnalazione cellulare che scatenano l'infiammazione e regolano l'espressione genica, causando l'insorgenza del mesotelioma pleurico maligno.

2.1 L'INNESCO

L'aria inalata segue un percorso tortuoso attraverso le vie aeree ramificate dell'apparato respiratorio. In seguito all'inalazione, nell'uomo, la maggiore deposizione delle particelle avviene a livello della 16°a- 19°a generazione delle vie aeree. [26]

Quando il flusso di aria cambia direzione a livello delle biforcazioni, le particelle tendono a mantenere le proprie traiettorie, impattando sulle pareti delle vie aeree. Al contrario, nei bronchioli e negli alveoli la ridotta velocità dell'aria contribuisce alla sedimentazione gravitazionale dove le fibre di amianto si depositano. [26]

A seguito dell'esposizione prolungata, l'infiammazione si propaga negli alveoli distali e nell'interstizio polmonare, da cui le fibre di amianto iniziano a migrare verso la pleura, tramite il sistema linfatico. Il deposito delle fibre in questi tessuti genera un ambiente infiammatorio, che nel tempo causa fibrosi, placche pleuriche e, a lungo termine, il mesotelioma pleurico. [27]

La composizione chimica delle fibre ne determina la tossicità, la durabilità, la biopersistenza e la biodegradabilità che caratterizzano le diverse tipologie di fibre di amianto. Questi parametri determinano la capacità di bypassare i meccanismi di clearance polmonare, permettendo alle fibre di rimanere in circolo e causare l'inflammatione cronica. [9]

Negli anni '60 Wagner dimostrò sperimentalmente l'associazione tra l'esposizione all'amianto e lo sviluppo del mesotelioma. Kane osservò come una singola dose di fibre di amianto fosse in grado di danneggiare il tessuto mesoteliale e stimolarne la rigenerazione. Fu il primo ad ipotizzare che un danno tissutale persistente e l'inflammatione cronica fossero i driver fondamentali dello sviluppo della neoplasia. [28, 29]

2.1.1 La risposta macrofagica e la fagocitosi frustrata

A seguito dell'inalazione, la fibra di amianto penetra nella cellula mesoteliale tramite perforazione diretta della membrana o per ingestione fagocitaria.

Come prima linea di difesa, i macrofagi reclutati nel mesotelio tentano di fagocitare le fibre per promuovere la clearance mucociliare e linfatica. [30] Tuttavia, quando la lunghezza della fibra supera il diametro del macrofago (10-20 μ m), come nel caso di fibre lunghe e sottili, si assiste alla mancata chiusura del fagosoma, con il seguente rilascio di enzimi lisosomiali, citochine pro-infiammatorie e specie reattive dell'ossigeno (ROS) nell'ambiente extracellulare. Questo fenomeno prende il nome di "fagocitosi frustrata". [30, 31] Le cellule mesoteliali adiacenti sono esposte a mediatori pro-infiammatori che contribuiscono allo sviluppo della neoplasia [9].

2.1.2 Il ruolo del Ferro e lo stress ossidativo

Il mesotelioma pleurico, come nel caso di altri tumori altamente proliferativi, è caratterizzato da una dipendenza dal ferro. Esso può derivare sia dalle riserve endogene sia dalla struttura della fibra di amianto.

Il meccanismo primario di danno è la **reazione di Fenton**: il ferro, agendo da catalizzatore, reagisce con il perossido di idrogeno (H_2O_2) generando specie radicaliche ossidriliche ($\cdot OH$) altamente reattive. [32]

Queste specie chimiche attaccano le macromolecole biologiche inducendo la produzione di radicali liberi e rotture al doppio filamento di DNA che, in mancanza di sistemi di riparazione efficaci, causano mutazioni genetiche che possono innescare la cancerogenesi. [33]

Il mesotelioma sfrutta il sovraccarico del ferro, che avvia cascate mutagene che permettono di selezionare solo le cellule resistenti alla ferroptosi. [32] Le cellule tumorali sviluppano meccanismi adattativi per sequestrare grosse quantità di ferro, necessario per la sopravvivenza cellulare. Questo, infatti, viene utilizzato dalla cellula nel metabolismo energetico e nella sintesi del DNA. Regolando l'omeostasi, permettono di tollerare alte concentrazioni di ferro intracellulare, condizione che risulterebbe letale in una cellula sana. [34] Questo suggerisce che l'induzione della ferroptosi potrebbe essere considerata un approccio terapeutico e risulterebbe altamente selettiva, in quanto colpirebbe solo le cellule neoplastiche. [32]

2.1.3 L'alterazione dell'omeostasi e il sequestro del ferro

Il ferro è essenziale in ciascun organismo vivente, in quanto permette di coordinare numerose funzioni cellulari essenziali (*chimica di*

coordinazione). L'interazione fisica tra l'amianto e il metabolismo del ferro genera un paradossale squilibrio. [35]

A seguito dell'inalazione, sulla superficie della fibra vengono esposti gruppi funzionali carichi negativamente in grado di complessare i metalli dell'organismo ospite, in particolare il ferro. [36] Ne consegue che le concentrazioni di ferro mitocondriale, a seguito dell'esposizione all'amianto, diminuiscono e le cellule percepiscono una carenza funzionale di ferro che normalmente comporterebbe l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi. [27]

Studi recenti dimostrano come le fibre di amianto siano in grado di adsorbire e rilasciare il ferro in base alla loro struttura chimica e alle condizioni ambientali, tra cui il pH. [37]

La crocidolite (amianto blu) e l'amosite (amianto bruno) contengono una quantità elevata di ferro (circa il 30%), al contrario del crisotilo (amianto bianco). [27] Quest'ultimo, tuttavia, viene considerato comunque cancerogeno poiché induce emolisi, a seguito della quale riveste la propria superficie con il ferro derivante dall'emoglobina. [38]

Le fibre di crisotilo possiedono un'alta affinità per la **ferritina**, la principale proteina di stoccaggio del ferro. [39] In un modello in vitro è stato osservato che, dopo soli 10 minuti, l'80% della ferritina viene captata dalla superficie della fibra di crisotilo.

L'adsorbimento della ferritina sulla fibra innesca una reazione a catena. La cellula percepisce una carenza funzionale del ferro, anche se fittizia, poiché il metallo sequestrato sulla fibra non risulta più biodisponibile. [39] Per ripristinare l'omeostasi, la cellula risponde tramite un'up-regolazione dei trasportatori, tra cui la ferritina stessa e la transferrina, con il conseguente aumento dell'importazione di ferro [40].

Per riacquisire il metallo sequestrato dalla fibra viene avviata dalla cellula una reazione di riduzione del metallo, necessaria a ridurre il ferro dallo stato ferrico allo stato ferroso, essenziale per l'attraversamento delle membrane biologiche. Questa reazione chimica, favorita dai superossidi, aumenta ulteriormente lo stress ossidativo all'interno della cellula, che contribuisce allo stato infiammatorio. [27]

2.1.4 I corpi ferruginosi dell'asbesto (AFB)

L'incapacità del sistema immunitario di eliminare l'amianto dal tratto respiratorio avvia il processo di biomineralizzazione: l'interazione tra la proteina dell'ospite e la fibra di amianto causa la formazione dei corpi ferruginosi dell'asbesto (AFB) all'interno dei macrofagi, visibili entro pochi mesi dall'esposizione. La fibra viene ricoperta da mucopolisaccaridi e proteine strettamente legate al ferro. [22, 41]

A causa delle loro dimensioni ridotte (diametro di 1-6 μ m) e alla possibile alterazione delle proprietà durante l'impiego delle metodologie d'analisi tradizionali, lo studio della loro composizione chimica precisa è complesso, e per questo la loro struttura non è ancora del tutto definita. [22] Tramite microscopia elettronica a scansione o a trasmissione (SEM o TEM), però, è stato possibile evidenziare la presenza, oltre al ferro, di metalli diversi come calcio e magnesio, fosfato e proteine. [22, 27]

In passato, si è ipotizzato che il processo di biomineralizzazione potesse isolare il tessuto biologico dalle fibre, e veniva considerato quindi un meccanismo di difesa avviato dai macrofagi a sostegno della cellula. Contrariamente, da analisi recenti, si è evidenziato come questo materiale sia in grado di potenziare le proprietà citotossiche e pro-infiammatorie dell'asbesto.

Uno studio di *Borelli et al.* (2007) ha permesso di studiare i corpi ferruginosi dell'asbesto in una forma biologicamente più rappresentativa

grazie al metodo di separazione magnetica, in grado di preservare le loro proprietà. [22, 42] Si è scoperto che i corpi estratti tramite separazione magnetica sono in grado di indurre una maggiore produzione di specie radicaliche. Inaspettatamente non è stato osservato alcun danno al filamento di DNA, evidenziato negli studi precedenti utilizzando il metodo di digestione chimica. [22]

Il ferro costituisce di fatto l'interfaccia tra l'amianto e il tessuto biologico: conoscere la struttura dei corpi ferruginosi dell'asbesto e il ruolo del ferro all'interno di essi, è cruciale per comprendere la patogenesi del mesotelioma. Solo studi recenti, mediante l'uso di tecniche a raggi X e radiazioni di sincrotrone, hanno permesso di studiare gli AFB direttamente in situ, all'interno del tessuto polmonare. [22]

Era già noto che gli AFB fossero costituiti principalmente da ferritina endogena, immagazzinata sotto forma di **ferridrite** altamente metastabile. Le recenti analisi hanno rivelato l'esistenza di una frazione significativa (circa il 30%) di **goethite**. [22, 41, 43]

La presenza di goethite è il risultato del processo infiammatorio indotto dalla fibra di amianto.

La ferridrite è termodinamicamente instabile e tende a trasformarsi, in condizioni di stress ossidativo ricche di ferro, in fasi cristalline come ematite e goethite. I fattori ambientali determinanti per questa trasformazione sono il pH e la temperatura: in ambiente neutro è favorita la formazione dell'ematite, l'ossido più cristallino, in ambiente acido è favorita la trasformazione in goethite. [22]

Nel polmone, la fagocitosi frustrata mediata dai macrofagi nel tentativo di inglobare le fibre di asbesto, crea attorno alla fibra un ambiente acido con un pH compreso tra 4.5 e 5.5, ideale per la formazione della goethite. I continui mancati tentativi di ingestione della fibra da parte dei macrofagi

portano quindi, nel tempo, alla progressiva cristallizzazione della ferridrite in goethite. [22]

La forma di goethite risulta la più citotossica tra gli ossidi di ferro, ed è in grado di indurre specie reattive dell'ossigeno (ROS) e dell'azoto (RNS), causare stress ossidativo e indurre danni al DNA. [22, 44]

L'aumento della concentrazione del ferro dell'ospite determina un tasso maggiore di formazione dei corpi ferruginosi dell'asbesto poiché il metallo è più disponibile all'incorporazione sulla fibra. [27]
L'eliminazione del ferro dall'ambiente tumorale potrebbe favorire la riduzione della risposta infiammatoria cronica.

2.1.5 Suscettibilità genetica correlata al ferro

È stata riscontrata un'associazione significativa tra i geni associati al metabolismo del ferro e la suscettibilità di sviluppo del mesotelioma pleurico. [45]

Uno studio ha valutato l'esistenza di un meccanismo patogenetico comune condiviso tra la popolazione di individui esposti all'amianto che ha sviluppato il mesotelioma o il tumore al polmone.

Lo studio si basa sulle evidenze cliniche emerse dagli studi di *Crovella et al.* (2016) sul ruolo dei geni del metabolismo del ferro e di *Borelli et al.* (2015) sull'inflammasoma.

I tre principali geni coinvolti sintetizzano per proteine strettamente correlate al metabolismo e all'omeostasi del ferro sono:

- Il gene HEPH, localizzato sul cromosoma X, codificante per la proteina eferstina, una ferrossidasi che trasporta il ferro dalle cellule epiteliali al sangue. La variante genetica rs3747359 è polimorfismo a singolo nucleotide codificante (cSNP).

È emerso che l'allele C è significativamente più frequente nei controlli sani rispetto ai malati, riportando un valore *Odds Ratio* (OR) pari a 0,06: i portatori hanno una probabilità significativamente maggiore di non sviluppare la malattia a seguito di esposizione all'amianto. [33]

- Il gene TF codifica per la proteina transferrina, coinvolta nel trasporto del ferro. La variante genetica rs2715631 è coinvolta nella protezione dal mesotelioma. [33]
- Il gene FTH1 codifica per la subunità pesante della proteina ferritina, coinvolta nell'immagazzinamento del ferro e nella formazione degli AFB. Si è evidenziato che il polimorfismo a singolo nucleotide codificante (cSNP), rs76059597, è coinvolto nella protezione dal mesotelioma. [33]

In conclusione, questi dati confermano che specifici polimorfismi genetici legati all'omeostasi del ferro sono associati ad una riduzione dell'insorgenza di mesotelioma.

2.2 GENOTOSSICITÀ INDOTTA DALLE FIBRE DI AMIANTO

L'attuale modello di cancerogenesi per il mesotelioma pleurico maligno correla la trasformazione neoplastica alla combinazione di eventi genetici, interconnessi all'infiammazione cronica.

I principali fattori di rischio genotossici, associati al mesotelioma maligno, sono rappresentati dallo stress ossidativo indotto, che stimola la produzione di specie radicaliche da parte delle cellule mesoteliali e dei macrofagi, tramite il processo di fagocitosi frustrata. [46]

Questi radicali liberi colpiscono direttamente i legami fosfodiesterici dello scheletro del DNA, ossidano le basi azotate e determinano importanti alterazioni genomiche. A seguito di questo danno continuo, la frazione di

cellule portatrici di danno aumenta progressivamente, e con essa la probabilità di sviluppare il cancro. [47]

Nonostante il lungo tempo di latenza, il *Tumor Mutational Burden*, definito come il numero totale di mutazioni somatiche nella regione codificante del genoma, è ritenuto particolarmente basso nel mesotelioma rispetto agli altri tipi di cancro. L'analisi genomica rivela che si rilevano 0,726 mutazioni somatiche per megabase. [48] La maggior parte di queste mutazioni sono a carico di geni oncosoppressori, tra cui **BAP1**, NF2, CDKN2AB. [49]

A livello molecolare, i ROS ossidano le basi di DNA, portando ad un *mismatch* di appaiamento, che, se non riparato, causa sostituzioni nelle basi G-T e C-A, con una conseguente instabilità genomica. La mutazione più frequente (49,56%) riscontrata nel genoma di un soggetto affetto da mesotelioma è la transizione C-T. [48]

Sono state evidenziate regioni di ipermutazione localizzata, note con il nome di *kataegis*, dal greco “*temporale*”. Questo fenomeno comporta la deaminazione multipla della citosina in uracile, specificatamente nella 5-metilcitosina presente nei tratti di DNA esposti durante la replicazione. [48, 49]

In condizioni fisiologiche, la cellula si difende dalla genotossicità grazie all'attivazione della risposta al danno del DNA (*DNA Damage Response*, *DDR*). Questo meccanismo permette di eliminare diverse tipologie di danno tramite cinque vie di riparazione: per escissione di basi (BER), per escissione di nucleotidi (NER), dei *mismatch* del DNA (MMR), per ricombinazione omologa (HR) e per giunzione di estremità non omologhe (NHEJ). [50]

Normalmente questo meccanismo permette di riparare i danni in modo tale da arrestare la formazione di cellule neoplastiche. Queste,

paradossalmente, utilizzano proprio questo sistema per bloccare l'apoptosi e favorire la loro sopravvivenza, una volta formate. Ad esempio, alterazioni a carico della via di riparazione dei *mismatch* sono state riscontrate nelle biopsie dei pazienti con mesotelioma pleurico maligno. [47]

Il danno più grave è dato dalle rotture a doppio filamento del DNA (*DSB, Double-Strand Breaks*), la cui riparazione avviene prevalentemente a carico della via NHEJ o tramite la ricombinazione omologa (HR). [47] La presenza di delezioni ed inserzioni nei tumori di mesotelioma potrebbe essere data proprio da errori a carico della via NHEJ, come conseguenza dello stress ossidativo indotto dai radicali liberi. [48]

Nella via di ricombinazione omologa (HR), in seguito ad una rottura a doppio filamento, il complesso MRN si lega al sito del danno attivando alcune proteine, tra cui **BRCA1**. La proteina associata a BRCA1 (*BRCA1 Associated Protein 1, BAP1*) è un fondamentale oncosoppressore coinvolto nella regolazione dei processi cellulari fondamentali alla proliferazione e alla risposta al danno del DNA. [47] I difetti nei geni preposti alla riparazione del DNA favoriscono la formazione del tumore. Diversi studi hanno dichiarato che un'elevata percentuale (23%) dei casi di mesotelioma pleurico maligno sporadici presenta mutazioni genomiche di BAP1, incluse mutazioni puntiformi o delezioni. La perdita funzionale di questa specifica proteina impedisce la corretta riparazione del DNA e altera i meccanismi epigenetici, aumentando il rischio di cancerogenesi. [51]

2.3 MICROAMBIENTE TUMORALE

Lo sviluppo e la progressione del mesotelioma pleurico maligno dipendono dalla sua capacità di sfuggire al sistema immunitario e questo viene favorito da un microambiente tumorale (TME) immunosoppressivo.

Fisiologicamente, i macrofagi rappresentano la prima linea di difesa grazie alla loro capacità fagocitica. La biopersistenza delle fibre di amianto nella pleura innesca un'inflammatione cronica che permette ai macrofagi e alle cellule mesoteliali di evadere dall'apoptosi, favorendo la trasformazione neoplastica e promuovendo la crescita tumorale. [52]

Nei tumori solidi, come il mesotelioma, il microambiente tumorale comprende cellule dell'immunità innata e adattativa come linfociti T, cellule dendritiche e macrofagi. Dalla linea mieloide si suddividono tre popolazioni: i macrofagi associati al tumore (TAM) derivanti da cellule mononucleate, macrofagi residenti nei tessuti e cellule di derivazione mieloide (MDSC). [54]

2.3.1 Polarizzazione dei TAM

I macrofagi, a seconda dei segnali ambientali, grazie alla loro plasticità si polarizzano (*Figura 4*) in **macrofagi M1** (pro-infiammatori e antitumorali) e **macrofagi M2** (pro-rimodellamento). [54]

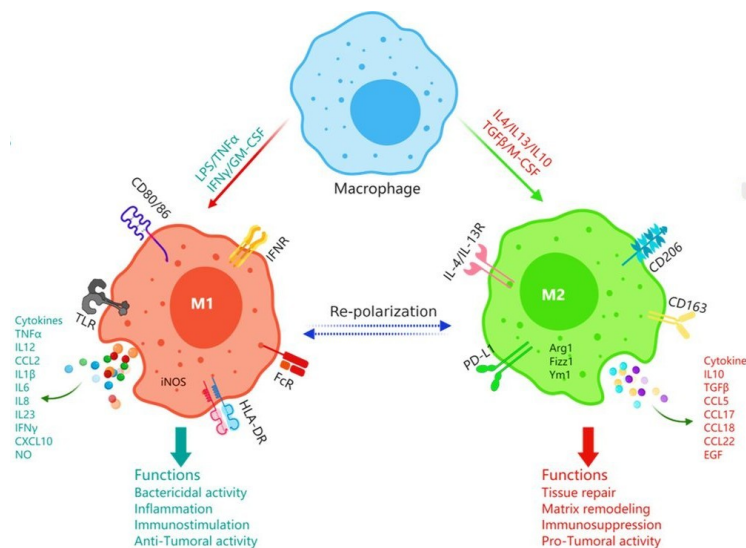


Figura 4: Polarizzazione dei macrofagi in macrofagi M1 e macrofagi M2

I macrofagi M1 vengono attivati per favorire l'eliminazione delle cellule tumorali, tramite il reclutamento dei linfociti T. Questa attivazione è

mediata dal rilascio di citochine Th1 (come l'interleuchina IL-18) o dal rilascio di TNF- α e radicali liberi. [55, 56]

Sebbene i macrofagi M1 siano stati ampiamente studiati per la loro azione oncosoppressiva, il ruolo dei macrofagi M2 nel contesto tumorale deve essere approfondito. [55]

Al contrario, infatti, i macrofagi M2 intervengono per calmare l'infiammazione e ricostruire i tessuti, intervenendo nel rimodellamento tissutale e nella guarigione delle ferite. [57] Rilasciano citochine antiinfiammatorie, come IL-10, IL-13 e TGF-beta e sostengono una risposta Th2. [54]

Tramite il rilascio di specifici mediatori, sono in grado di sostenere lo sviluppo neoplastico:

- Promuovono l'angiogenesi tumorale tramite il rilascio di citochine quali VEGF, COX-2 e attivano fattori di trascrizione inducibili dall'ipossia;
- Promuovono la proliferazione cellulare tramite il rilascio di fattori di crescita, citochine e chemochine, tra cui TGF-beta;
- Sono coinvolti nell'invasione tumorale e nella metastasi, tramite il rilascio di enzimi in grado di degradare ECM, tra cui metalloproteinasi;
- Mediano l'immunosoppressione, permettendo al tumore di fuggire ai controlli immunitari, tramite il rilascio di IL-10 e TGF-beta. [54]

Il tumore secerne fattori che costringono la maggior parte dei TAM ad assumere un fenotipo *M2-like*, identificabile dall'espressione di marcatori come CD163, CD206 e l'enzima Arginasi-1. L'elevata densità dei TAM M2 è stata associata clinicamente ad una prognosi infausta nella maggior

parte dei pazienti oncologici, mentre l'accumulo preferenziale di TAM M1 è associato ad una sopravvivenza prolungata. [58]

L'elevata plasticità dei TAM potrebbe essere usata come strategia terapeutica: l'eliminazione o la riduzione dei TAM e la ripolarizzazione verso il sottogruppo M1 potrebbe ridurre la crescita tumorale. [54]

2.3.2 Chemioresistenza e scudo immunitario

Studi recenti hanno indagato la distribuzione quantitativa e spaziale dei macrofagi, ed è stato evidenziato un aumento significativo dei TAM M2-like nel microambiente tumorale. Questa tipologia di macrofagi è associata ad una crescita tumorale, tramite l'avvio dell'angiogenesi e la soppressione delle cellule immunitarie. [58]

Questa attività viene sostenuta da diversi fattori: il rilascio di specifiche chemochine (come CCL2), l'espressione di ligandi inibitori dei checkpoint immunitari (come PD-L1) e la deplezione di amminoacidi essenziali per i linfociti, tramite l'Arginasi-1. [54]

L'aumento della popolazione M2 nel sito tumorale comporta una deplezione delle cellule T e B all'interno del microambiente tumorale. [59]

È emerso da diversi studi che la distanza spaziale tra i macrofagi e il tumore ha un ruolo chiave nella patogenesi. La sopravvivenza globale (OS) del paziente è stata associata non solo al numero di TAM M2, ma anche alla loro vicinanza alle cellule che, se inferiore alla media, determina un'aspettativa di vita più breve. [57]

Il tumore utilizza i TAM M2 come scudo sia fisico sia chimico per risultare invisibile al sistema immunitario e resistere alle terapie. I macrofagi nella sede tumorale secernono citochine (come IL-6, IL-10 e Cathepsina) che spengono i segnali pro-apoptotici innescati dai farmaci

chemioterapici. [60] I TAM depositano inoltre una matrice extracellulare che ostacola fisicamente le cellule tumorali dai farmaci citotossici. [54]

2.3.3 Invasione tumorale

I macrofagi associati al tumore hanno inoltre un ruolo chiave nella metastatizzazione del cancro, in quanto, grazie alla secrezione di metalloproteinasi, facilitano l'invasione e la migrazione delle cellule tumorali. Tramite il fattore di crescita epidermico e il fattore di crescita indotto dal tumore (CSF-1) mediano un circuito paracrino in grado di favorire la migrazione. [61]

La *transizione epitelio-mesenchimale* (EMT), attivata nel caso di metastatizzazione tumorale, risulta interconnessa ai macrofagi associati al tumore: i TAM riducono l'espressione della E-caderina e permettono alla cellula di acquisire la mobilità necessaria ad invadere i tessuti circostanti. [61]

In conclusione, il microambiente tumorale è strettamente influenzato dal profilo genetico tumorale. Le alterazioni a carico del gene oncosoppressore **BAP1**, più frequentemente mutato nel mesotelioma, modulano attivamente il microambiente tumorale. I portatori di mutazioni a carico di questo gene sviluppano un microambiente tumorale immuno-attivato, associato paradossalmente ad una prognosi migliore. [62]

2.4 LA RISPOSTA CELLULARE

L'interazione tra le fibre di amianto e l'epitelio mesoteliale, descritta precedentemente, innesca una risposta infiammatoria che attiva una cascata di segnalazione molecolare complessa.

2.4.1 Vie di segnalazione del danno

L'amianto induce la morte cellulare delle cellule mesoteliali tramite necrosi cellulare programmata. A differenza del processo apoptotico, la necrosi determina la rottura della membrana plasmatica, con il conseguente rilascio del contenuto citoplasmatico nello spazio extracellulare, tra cui la proteina HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*). [46]

In condizioni fisiologiche, la proteina HMGB1 è una proteina localizzata nel nucleo, dove stabilizza la struttura della cromatina.

Nelle cellule mesoteliali, a seguito del fenomeno di necrosi, trasloca nel nucleo come *Damage-Associated Molecular Pattern* (DAMP), fungendo da molecola segnale rilasciata solo in caso di pericolo dai macrofagi e dalle cellule del sistema immunitario [46, 63]. Si lega a specifici recettori tra cui RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End Products*) e TLR (*Toll-like Receptors*), innescando un meccanismo autocrino che promuove la sopravvivenza delle cellule mesoteliali danneggiate. [63]

2.4.2 Infiammazione

Le fibre di amianto inducono un'up-regolazione dei recettori TNF-R1: il legame con il proprio ligando TNF- α , rilasciato dai macrofagi, attiva il *fattore di trascrizione nucleare NF- κ B*, promotore della sopravvivenza cellulare. [64]

È un fattore di trascrizione in grado di regolare numerose funzioni immunitarie (sia innate sia adattative). In condizioni fisiologiche è mantenuto inattivo da proteine inibitorie mentre, in presenza di stress ossidativo o infiammazione, trasloca nel nucleo dove induce la trascrizione di citochine, chemochine e fattori di sopravvivenza. [65]

Fungendo da fattore anti-apoptotico, le cellule sono in grado di sfuggire alla morte cellulare programmata, ed evolvono in cellule neoplastiche. [65]

L'attivazione del fattore NF-Kb induce la formazione dell'*inflammasoma NLRP3*, un complesso multiproteico costituito dal sensore NALP3, dalla proteina associata all'apoptosi ASC e dall'effettore *Caspasi-1*. È in grado di riconoscere gli stimoli esterni (come le fibre di amianto) e mediare la risposta immunitaria innata e infiammatoria, intervenendo nelle vie di morte cellulare. È possibile, tramite la modulazione di questa via, spegnere l'infiammazione e promuovere la riparazione del tessuto. [66, 67]

L'attivazione di NLRP3 è un processo a due fasi che richiede un innesco (*priming*) e un segnale di attivazione. Il *priming* permette di indurre la sintesi dei precursori a seguito dell'attivazione di NF-κB, il segnale di attivazione permette di assemblare il complesso dell'inflammasoma, che attiva a sua volta il rilascio di citochine pro-infiammatorie. [68, 69]

Una volta assemblato, NLRP3 attiva l'enzima effettore, *Caspasi-1*. Questo scinde *pro-IL-1β*, attivando la forma matura biologicamente attiva, *IL-1β*, e taglia la proteina *Gasdermina D*. Il dominio N-terminale di questa proteina migra sulla membrana plasmatica dove causa la piroptosi, tramite la formazione di pori, permettendo il rilascio delle citochine infiammatorie nello spazio extracellulare. [69]

In alcuni modelli murini è stato evidenziato il ruolo critico che l'inflammasoma avrebbe nell'infiammazione causata dall'amianto, ma il suo meccanismo di attivazione non è ancora stato del tutto chiarito. [70, 71]

HMGB1 sembra essere un fattore determinante nell'infiammazione e nello sviluppo neoplastico. Può infatti essere considerato un biomarcatore per l'esposizione all'amianto, essendo presente in elevata concentrazione nei

soggetti esposti, e può risultare quindi potenzialmente utile per la diagnosi precoce di mesotelioma. L'inibizione della sua attività ha inoltre ottenuto risultati promettenti nel ridurre la crescita tumorale, sia in vitro sia in vivo. [72] Allo stesso modo, da uno studio di *Liu et al.* (1998), è emerso che il knock-out dei recettori del TNF- α è sufficiente a proteggere dalle lesioni indotte dall'amianto. [73]

2.4.3 Proliferazione cellulare

Le fibre di amianto e lo stress ossidativo innescano molteplici eventi di fosforilazione proteica e aumentano l'espressione dei recettori tirosin-chinasici (RTK), come il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR). Questo porta all'attivazione di cascate molecolari che favoriscono la cancerogenesi, tra cui la via RAF/MAPK. [74]

Le *protein-chinasi attivate dai mitogeni* (**MAPK**) sono protein-chinasi serina-treonina coinvolte nei diversi tipi di processi cellulari come la proliferazione, la differenziazione, l'apoptosi e l'infiammazione. [47]

Le MAPK comprendono tre famiglie principali: le *chinasi regolate da segnali extracellulari* (ERK), effettori dell'oncoproteina RAS, e le chinasi JNK e p38, attivate da fattori di stress e citochine proinfiammatorie. Queste chinasi sono regolate dalla fosfatasi MKP (*MAPK phosphatases*), up-regolate nelle cellule mesoteliali esposte all'amianto. [75]

Sebbene le mutazioni nella via MAPK siano rare nel caso di mesotelioma pleurico, la via di segnalazione viene attivata da meccanismi aberranti, inducendo la proliferazione incontrollata delle cellule che assumono caratteristiche neoplastiche. L'attivazione delle MAPK, in particolare di ERK, porta alla fosforilazione persistente di AP-1 (*Activator Protein-1*), un fattore di trascrizione etero dimerico. AP-1 trasloca nel nucleo, dove induce l'espressione di geni chiave per la proliferazione cellulare e dell'infiammazione, tra cui *c-Jun*, *c-Myc* e ATF2. [76]

La via RAS/MAPK risulta avere un ruolo nella progressione neoplastica a tal punto da poter essere considerata un possibile bersaglio terapeutico. [75]

2.4.4 La via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR

L'attivazione del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) è in grado di regolare la cascata di segnalazione PI3K/AKT/mTOR.

Questo *pathway* è cruciale in numerosi processi fisiologici cellulari, tra cui il differenziamento, l'apoptosi e il metabolismo cellulare. In oncologia, i geni regolatori di questa cascata sono frequentemente mutati o alterati a livello epigenetico, e possono contribuire attivamente alla cancerogenesi. Nel mesotelioma pleurico maligno è stata evidenziata l'iperattivazione di questa via.

A livello molecolare, la proteina PI3K fosforila il *fosfatidilinositolo-4,5-bifosfato* (PIP2) in *fosfatidilinositolo-3,4,5-trifosfato* (PIP3). Quest'ultimo è un prodotto lipidico in grado di attivare, tramite un cambiamento conformazionale, la proteina AKT, fondamentale in processi fisiologici quali il differenziamento cellulare. La sua attività viene modulata da una rete di proteine regolatrici.

AKT (1) agisce come mediatore anti-apoptotico, sopprimendo i mediatori dell'apoptosi e (2) induce la fosforilazione degli inibitori delle chinasi p21 e p27, inibendo l'arresto del ciclo cellulare da essi indotto.

Il complesso mTOR è una serina-treonina chinasi, effettore di AKT, in grado di coordinare la crescita e la proliferazione cellulare. [77, 78]

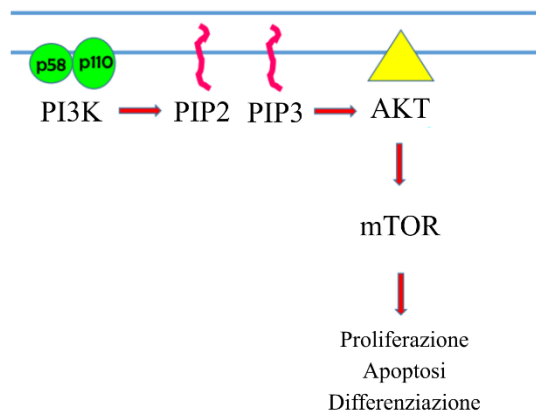


Figura 5: via di segnalazione PI3K/AKT/mTOR.

La via AKT/mTOR è finemente regolata da meccanismi a *feedback* positivo e negativo che ne coordinano l'attivazione e garantiscono il mantenimento dell'omeostasi. Tuttavia, l'iperattivazione di questa via di segnalazione determina una proliferazione cellulare incontrollata, la perdita dell'apoptosi e la formazione di metastasi.

Alcuni studi suggeriscono una stretta correlazione tra la cascata PI3K/AKT/mTOR e alcuni *driver* oncogenici, tra cui il fattore di crescita epidermico (EGFR). La soppressione di questa via ha evidenziato risultati promettenti in ambito clinico nel trattamento del mesotelioma, in quanto si è ottenuta una riduzione significativa della vitalità cellulare. In particolare, la soppressione di mTOR sembra interagire positivamente con il trattamento standard chemioterapico (cisplatino/pemetrexed), potenziandone l'effetto citotossico e contrastando la chemioresistenza. [79]

2.4.5 La via di segnalazione del Calcio

L'alterazione dell'omeostasi degli ioni calcio è coinvolta nella progressione tumorale. La concentrazione del calcio intracellulare è inferiore rispetto alla concentrazione extracellulare, in quanto viene normalmente depositato all'interno della cellula.

Quando viene rilasciato nel citoplasma, agisce come secondo messaggero, innescando una via di segnalazione che induce uno stato di allerta per la cellula. [47]

I canali del calcio di tipo T (a basso voltaggio) sono in grado di trasportare lo ione: i bloccanti di questi canali possono indurre la morte delle cellule neoplastiche e per questo sono considerati potenziali antitumorali. [80]

Le cellule mesoteliali sono caratterizzate dalla sovra regolazione della proteina *Calretinina* (CRT), legante il calcio, che comporta l'alterazione dei livelli intracellulari dello ione e ne riduce la captazione a livello mitocondriale, con la conseguente inibizione dell'apoptosi. Ad oggi viene considerata un marcatore diagnostico per il mesotelioma. [81]

Il gene **BAP1** è localizzato a livello del reticolo endoplasmatico (RE) che controlla il flusso del calcio ai mitocondri, regolando l'apoptosi. L'esposizione all'amianto determina un maggiore rilascio di calcio dal reticolo endoplasmatico, e la compromissione dell'omeostasi del calcio determina un destino infausto per la cellula. [82]

2.5 ADATTAMENTO CELLULARE

Mentre i fattori precedentemente descritti promuovono l'infiammazione e contribuiscono alla cancerogenesi, la cellula tenta di attivare dei meccanismi difensivi per sopravvivere all'ambiente ostile.

2.5.1 Adattamento all'ipossia

All'interno del microambiente tumorale, la mancanza di ossigeno permette al tumore di sopravvivere. Nei tumori solidi esistono due tipologie di ipossia, intermittente o cronica, che portano entrambi ad un peggioramento della prognosi. [83]

L'ipossia intermittente deriva da un flusso sanguigno anomalo, causato dalla modifica della permeabilità nel microambiente tumorale.

L'ipossia cronica insorge a causa dell'incapacità dei vasi sanguigni di fornire quantità adeguate di ossigeno alla massa tumorale in rapida crescita. [83]

La cellula si adatta a questa condizione ipossica aumentando l'espressione di HIF α , subunità α del *fattore inducibile dall'ipossia*. In normali condizioni fisiologiche verrebbe degradata, ma, in assenza di ossigeno, si stabilizza e sfugge alla degradazione tramite la via ubiquitina-proteasoma, accumulandosi nel nucleo. [83]

L'attività trascrizionale di HIF nelle cellule tumorali in condizioni ipossiche è mediata da HIF-1 α e HIF-2 α che attivano numerosi geni che regolano la sopravvivenza. [83]

Studi recenti hanno evidenziato la presenza di diverse regioni ipossiche nel mesotelioma pleurico. Nonostante il meccanismo molecolare sia ancora da chiarire, è evidente che l'ipossia potenzi l'aggressività del tumore. In particolare, favorisce la migrazione e l'invasione del tumore negli altri distretti corporei, favorendo la condizione di metastasi, e causa resistenza alle terapie, grazie all'inibizione dell'apoptosi. [84]

Si assiste a più scenari: (1) ad una riprogrammazione metabolica dove le cellule neoplastiche modificano il metabolismo per compensare la maggiore richiesta energetica. Viene sovraespresso il trasportatore del glucosio *Glut-1*, aumentando così la quantità di glucosio a favore della glicolisi anaerobica. [85]

(2) L'ipossia inibisce l'apoptosi indotta dai trattamenti chemioterapici, in quanto causa lo sviluppo di una resistenza ai farmaci tramite l'aumento dell'espressione della proteina anti-apoptotica *Bcl-2*. [83]

Questa condizione causa inoltre (3) l'attivazione di fattori di trascrizione che fanno assumere alle cellule proprietà staminali, tra cui *Oct4*, *c-Myc* e *Notch*, portando ad un aumento della proliferazione cellulare. HIF-2 α sembra avere un ruolo chiave nella formazione delle recidive. [83]

Infine, è stato dimostrato che l'ipossia favorisce la *transizione epitelio-mesenchimale* (EMT). L'analisi effettuata tramite *Western blot* ha evidenziato una riduzione dell'espressione della E-caderina e l'aumento della vimentina nelle cellule mesoteliali, che favorisce la metastatizzazione, aumentando il potenziale invasivo e migratorio della cellula tumorale. [83]

2.5.2 Autofagia

Il rilascio di HMGB1 attiva l'autofagia, un meccanismo di adattamento che permette alla cellula di sfuggire alla morte cellulare indotta dall'amianto. [10]

L'autofagia è un fenomeno fisiologico essenziale che permette alla cellula di sopravvivere e proteggersi dallo stress ossidativo e dall'attacco dei macrofagi. È un processo di degradazione non selettivo che favorisce l'eliminazione delle strutture danneggiate per garantire l'omeostasi cellulare e la sopravvivenza durante uno stadio di carenza nutrizionale. [86]

Il materiale contenuto nel citoplasma viene fagocitato all'interno di una membrana a doppio strato, l'*autofagosoma*, e trasportato al lisosoma per la degradazione. HMGB1, traslocando nel citoplasma, è in grado di attivare l'autofagia inattivando la via di segnale mTOR-ULK e promuovendo la fosforilazione di Beclin 1. [99, 102] Nell'ambiente extracellulare viene indotta la secrezione di TNF α , che induce il processo infiammatorio che guida la crescita della neoplasia. [10]

HMGB1 modula la trascrizione e protegge il DNA dai danni ambientali, contribuendo all'assemblaggio dei nucleosomi. È pertanto considerato un regolatore chiave delle alterazioni trascrizionali indotte da amianto. [10]

Le cellule mesoteliali murine isolate nei topi con HMGB1 silenziato ed esposti all'amianto mostravano una diminuzione dell'autofagia: l'inibizione dell'apoptosi tramite il trattamento con *BoxA*, antagonista di HMGB1, ha dimostrato che questa proteina contribuisce attivamente alla trasformazione neoplastica. [10]

Delle analisi effettuate sulle linee cellulari delle cellule mesoteliali neoplastiche, si sono evidenziati elevati livelli di autofagia basale, rispetto alle cellule non trasformate. In queste cellule l'autofagia è indipendente dai classici segnali, come la carenza nutrizionale: il tumore attiva questo meccanismo fisiologico per sostenere la sua attività metabolica. [10, 86]

L'up-regolazione dell'autofagia è caratteristica della resistenza alle chemioterapie, per cui la sua inibizione è proposta come possibile soluzione alla farmaco-resistenza. Inoltre, la regolazione dell'autofagia guidata da HMGB1 come terapia potrebbe prevenire o ritardare lo sviluppo del mesotelioma. [87]

2.5.3 Transizione epitelio-mesenchimale (EMT)

Se la condizione di stress persiste, i meccanismi adattativi utilizzati dalla cellula favoriscono l'attivazione della *transizione epitelio-mesenchimale* (EMT). Questo processo è fisiologico durante l'embriogenesi e la riparazione tissutale mentre, nel microambiente tumorale, fornisce alla cellula neoplastica l'energia necessaria a modificare le sue caratteristiche.

L'EMT consente alle cellule tumorali di acquisire proprietà invasive e staminali, oltre che indurre una maggiore resistenza ai farmaci. [88]

Durante la EMT si instaura uno stato intermedio tra una condizione epiteliale e una mesenchimale, capace di rendere il tumore invisibile al sistema immunitario e sviluppare resistenza alle terapie. [89]

A livello molecolare, il processo è caratterizzato da una drastica riduzione delle proteine epiteliali, in particolare la E-caderina, la cui perdita compromette l'adesione cellula-cellula che favorisce la metastatizzazione. Vengono attivati fattori di trascrizione che portano all'up-regolazione delle proteine mesenchimali, tra cui N-caderina, fibronectina e vimentina. Questo avviene perché, in condizioni infiammatorie, le cellule mesoteliali normali morirebbero. [89]

Il microambiente tumorale ha un ruolo determinante nell'induzione dell'EMT. I *fattori inducibili dall'ipossia* (HIF) e le citochine proinfiammatorie (come *IL-6* e *TGF-β*) attivano cascate di segnali che attivano i geni mesenchimali e contrastano i geni epiteliali.

L'EMT non è un semplice cambiamento fenotipico ma comporta gravi conseguenze che aggravano la prognosi della malattia. [90]

Le cellule acquisiscono la capacità migratoria necessaria ad invadere i tessuti circostanti, disseminandosi nella cavità pleurica e generando metastasi anche a distanza. Gli enzimi sovra regolati, infatti, sono in grado di degradare le barriere della matrice extracellulare, contribuendo all'infiltrazione. [89, 90]

I tumori sfruttano questo meccanismo per il *mimetismo vasculogenico* (VM), necessario a sostenere la progressione e la crescita tumorale: le cellule neoplastiche si organizzano per formare delle strutture simil-vascolari che forniscono nutrienti al sito tumorale. [91]

Le cellule acquisiscono inoltre una maggiore resistenza all'apoptosi, resistendo a condizioni avverse e alla sorveglianza immunitaria. Il

fenotipo mesenchimale causa una maggiore espressione di *PD-L1*, checkpoint immunitario fondamentale che rende il tumore invisibile e permette di resistere all'attacco immunitario, in quanto inibisce l'attività dei linfociti T. [92]

Anche la genetica svolge un ruolo fondamentale: la frequente inattivazione del gene NF2, spesso mutato nei pazienti affetti da mesotelioma, rafforza il fenotipo mesenchimale. [8]

3. LA MUTAZIONE DEL GENE BAP1 NEL MESOTELIOMA PLEURICO MALIGNO

L'esposizione all'amianto rappresenta il principale fattore eziologico: in uno studio di una coorte di soggetti affetti da mesotelioma pleurico, l'esposizione all'amianto è stata documentata in circa l'80% degli individui. Tuttavia, è stato dimostrato che la patologia si è sviluppata solo in una frazione ridotta degli individui fortemente esposti alle fibre (solo in circa il 5% dei minatori di amianto) e vengono registrati solo 3200 casi annui sui 27 milioni di lavoratori statunitensi esposti nel secolo scorso. [93]

È stato successivamente evidenziato che alcuni individui sviluppano il mesotelioma in seguito all'esposizione di piccole quantità di amianto, mentre altri non la sviluppano, nonostante l'esposizione a quantità elevate. [94] Questi dati suggeriscono che *l'esposizione ambientale è una condizione necessaria ma non sufficiente* all'insorgenza della patologia, e sottolineano il ruolo chiave della *suscettibilità genetica*. [93]

Il cancro è causato dall'accumulo di danni genetici, sia ereditari sia spontanei. Parte della letteratura scientifica attribuisce due terzi delle neoplasie alle mutazioni spontanee, che derivano dalla fisiologica divisione cellulare; altri studi sostengono, invece, che gli stimoli ambientali contribuiscano al 60% delle mutazioni. [95] La mutazione del gene oncosoppressore BAP1 risulta la più frequente nel mesotelioma pleurico, in quanto è presente nel 3% dei pazienti (*Panou et al.*, 2018) con una prevalenza fino al 57% (*Hmeljal et al.*, 2018). [95, 96] Studi recenti hanno confermato che le alterazioni a carico di questo gene accelerano lo sviluppo del tumore indotto dall'amianto, in quanto aumenta la suscettibilità ai cancerogeni ambientali secondo il *modello di interazione gene-ambiente (GxE)*. [95, 97]

La perdita di BAP1 è considerata un evento precoce nella cancerogenesi, mentre altre mutazioni avvengono in fasi successive della malattia. [98] Tra le diverse alterazioni rientra la mutazione di NF2, che aumenta la segnalazione del *pathway Hippo* e la proliferazione cellulare, di TP53, che comporta la formazione di tumori più aggressivi, e di CDKN2A e SETD2. [96] La scoperta che la suscettibilità al mesotelioma viene trasmessa per via mendeliana ha confermato il ruolo chiave della genetica e ha permesso di confermare l'ipotesi di una predisposizione genetica al cancro, legata alla mutazione del gene BAP1. [8, 99]

3.1 IL GENE BAP1

3.1.1 Caratteristiche generali e meccanismi d'azione

Il gene BAP1 (*BRCA-1 Associated Protein-1*) è stato identificato per la prima volta nel 1998, ma solamente nel 2011 è stato correlato allo sviluppo del mesotelioma pleurico.

È situato sul cromosoma 3 (3p21-1) e codifica per una deubiquitinasi di 729 amminoacidi. [51, 96] Questa proteina fa parte della sottofamiglia delle idrolasi dell'*ubiquitina C-terminale* (UCH) degli enzimi deubiquitinanti (DUB). [100] In condizioni fisiologiche, BAP1 è espresso nelle cellule mesoteliali dove agisce come *guardiano del genoma*. La mutazione comporta la perdita d'espressione e il conseguente accumulo nel citoplasma. [101]

BAP1 è compreso all'interno di complessi multiproteici contenenti fino a 10 subunità differenti, tra cui ASXL3. [102] È stato identificato come parte del gruppo *Polycomb* (*PcG*), che assume un ruolo essenziale nel rimodellamento della cromatina e nella trascrizione. Questo gruppo comprende tre complessi principali: i *complessi repressivi Polycomb 1 e 2* (PRC1/2) e il *complesso deubiquitinasi repressivo Polycomb* (PR-DUB). [103] Contiene domini di legame per diverse proteine (come

HCF1, YY1 e BRCA1) e questo giustifica il ruolo centrale di BAP1 nella regolazione di diversi meccanismi biologici. [103]

È stato ipotizzato che l'estremità *C-terminale* di BAP1 lega direttamente il dominio RING di BRCA1, mentre la regione centrale compresa tra i residui 182-356 interagisce con BARD1. Il complesso BRCA1-BARD1 forma l'*E3 ubiquitina ligasi*, che permette di legare l'ubiquitina alle proteine bersaglio, avendo attività opposta a BAP1, che invece deubiquitina. [98]

La struttura di BAP1 (*Figura 6*) è definita da due regioni. Possiede due diversi *segnali di localizzazione nucleare* (NLS), situati nella regione C-terminale, che regolano la corretta localizzazione del gene all'interno del nucleo. [100] L'attività deubiquitinasi di BAP1 è codificata, invece, dai 240 residui N-terminali, che formano il dominio *ubiquitina carbossilidrolasi* (UCH) e svolgono l'azione enzimatica. [101]

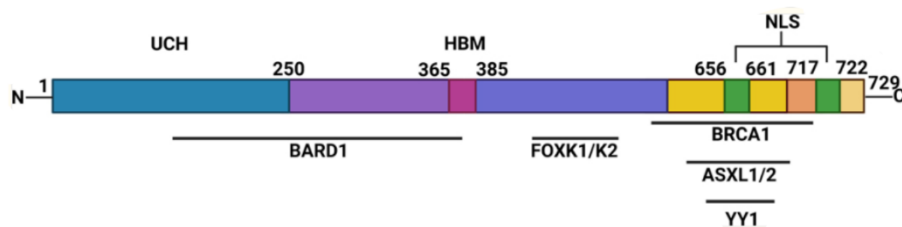


Figura 6: La struttura del gene BAP1.

Le mutazioni più pericolose sono a carico del dominio UCH, in quanto spengono la funzione enzimatica, e a carico del dominio finale NLS, in quanto viene impedita la penetrazione all'interno del nucleo, dove BAP1 svolge la sua funzione oncosoppressiva.

BAP1 ha un ruolo chiave in diversi processi metabolici vitali, tra cui la riparazione del DNA, il controllo del flusso del calcio e la riduzione della

respirazione mitocondriale per *effetto Warburg* e per questo controlla indirettamente la cancerogenesi. [101]

3.1.2 Mutazioni germinali e somatiche

Le mutazioni che possono regolare l'insorgenza del mesotelioma pleurico possono essere somatiche o germinali. Ancora oggi non è del tutto chiaro se i meccanismi tumorali si differenziano tra le due forme di mutazione. [96]

Le mutazioni somatiche sono il caso più comune e si acquisiscono durante il corso della vita, spesso a seguito di stimoli ambientali come l'esposizione alle fibre di amianto. La maggior parte di queste mutazioni è stata rilevata nel dominio UCH N-terminale, ed è stata identificata come mutazione clinicamente inattiva. [101]

Le mutazioni germinali, invece, sono autosomiche dominanti, per cui si ha la probabilità del 50% di trasmettere la mutazione alla progenie. [104] Causano una patologia con una *penetranza del 100%* entro i 55 anni di età. [8, 99] I portatori della mutazione di BAP1 sono affetti dalla *Sindrome da Predisposizione Tumorale (BAP1-TPS)*. Questi individui hanno un elevato rischio di sviluppare da due a sette neoplasie nel corso della vita, tra cui il mesotelioma, il melanoma uveale e cutaneo e il carcinoma mammario o renale (*Figura 7*). [8, 19] Mutazioni germinali patogene, specialmente a carico di BAP1, sono state riscontrate nel 9,7-12% di tutti i pazienti affetti da mesotelioma. [19] Dal punto di vista istologico non vengono evidenziate differenze tra i pazienti con e senza mutazione germinale. [23]

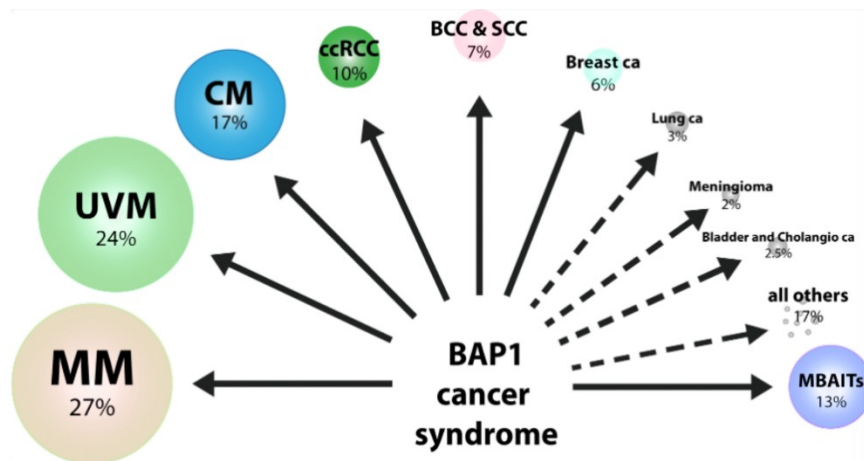


Figura 7: Dati raccolti da uno studio di 689 individui (309 femmine, 268 maschi e 112 di sesso sconosciuto), in cui 553 hanno sviluppato un tumore e il 27% presentava da due a sette tipologie diverse di tumore. [19]

Il mesotelioma, nel caso di mutazione germinale a carico del gene BAP1, si manifesta prettamente in pazienti più giovani, spesso diagnosticata fino a vent'anni prima rispetto all'età media di diagnosi. Si ha una maggiore prevalenza nel sesso femminile, a causa probabilmente della minore incidenza occupazionale. [23]

Dallo studio di *Carbone et al.* (2007) è stato studiato il ruolo di BAP1 in una popolazione in Cappadocia (Turchia). Lo studio è riferito ad una coppia tedesca del 1700 che ha trasmesso la mutazione germinale del gene BAP1 di generazione in generazione, arrivando ad oggi con una stirpe di 80.000 discendenti. [8, 99] Questo evidenzia come l'ereditarietà relativa alla mutazione di questo gene sia estremamente elevata.

La maggior parte delle mutazioni a carico dei geni oncosoppressori sono recessive. Secondo la *Two-hits Knudson Theory*, proposta da *Alfred Knudson* nel 1971, si possono identificare due percorsi eziologici differenti, a seconda del tipo di mutazione. La perdita somatica di un allele del gene BAP1 può portare alla perdita del secondo allele a causa della presenza delle fibre di amianto. La perdita germinale di un allele, invece,

può indurre la perdita somatica del secondo allele indipendentemente dall'esposizione ambientale. Questa teoria ha fornito un modello per la comprensione dei tumori causati da un gene di suscettibilità. [105, 106]

La diagnosi molecolare di BAP1 viene stabilita mediante l'identificazione di una variante tramite specifici test genetici molecolari. Questi includono analisi di un singolo gene (per varianti *missense*, *nosense*, siti di *splicing* o micro-inserzioni o delezioni) o l'uso di un pannello multigenico, utile per analizzare la possibile predisposizione al cancro indotta da BAP1 e per identificare eventuali altre varianti genetiche. [107]

4. LE DUE FACCE DELLA MEDAGLIA: IL PARADOSSO DELLA MUTAZIONE DI BAP1

In occasione del congresso sul mesotelioma coordinato dal *prof. Luciano Mutti* tenuto all'Aquila nel Novembre 2025, il *prof. Michele Carbone* ha descritto il *dualismo* della mutazione di BAP1 che rappresenta un *paradosso*: da un lato porta alla perdita della funzione oncosoppressiva predisponendo alla formazione del tumore; dall'altro permette un aumento significativo della sopravvivenza globale (OS) e della risposta terapeutica, rispetto ai casi *wild-type*. [23, 97]

4.1 MECCANISMI DI PROMOZIONE TUMORALE

La mutazione di BAP1 agisce come *driver* nell'insorgenza tumorale, in particolare per il mesotelioma. A seguito del *knock-out* di BAP1, si è rilevato un aumento significativo dei linfonodi e delle cellule del midollo osseo nei topi con BAP1 mutato, con la conseguente trasformazione neoplastica. [108]

BAP1 preserva l'identità cellulare e regola l'epigenetica, favorendo la capacità della cellula di esprimere solo le proteine realmente utili. Nei pazienti che presentano mutazioni, i meccanismi di controllo vengono a mancare, la cellula perde la propria identità e ne consegue la trasformazione neoplastica. [109]

Si è rilevato che per molti dei pazienti portatori di una mutazione germinale eterozigote di BAP1 a cui è stato diagnosticato il mesotelioma, non è stata riportata un'esposizione all'amianto passata, né professionale né ambientale. Nel caso del mesotelioma "*ereditario*", fino al 50% dei membri nello studio ha sviluppato la patologia, ma solamente il 4,6% delle coorti sono state esposte a livelli elevati di amianto. [51, 110] Questo suggerisce che la mutazione può essere una condizione *sufficiente* alla

trasformazione neoplastica in quanto può rendere la cellula ipersensibile a quantità minime di fibre.

Questo dato è importante poiché sottolinea come la variabilità genomica ha profonde conseguenze sullo sviluppo tumorale ed evidenzia l'importanza di ridurre l'esposizione di amianto, in quanto anche quantità minime potrebbero portare alla trasformazione neoplastica in alcuni individui. Secondo gli standard dell'*Occupational Safety and Health Administration* statunitense i livelli ad oggi ritenuti sicuri sono inferiori a 0,1 fibre/cc di aria in otto ore. [94, 108]

4.1.1 Risposta infiammatoria

BAP1 si associa a complessi multiproteici che regolano diversi meccanismi cellulari, tra cui la trascrizione, la replicazione del DNA e i meccanismi di risposta al danno (DDR). [96] L'insieme di questi fenomeni, alterati in caso di mutazione, predispone il soggetto ad una maggiore probabilità di sviluppare la neoplasia, a causa anche di un'alterazione della risposta infiammatoria tumorale.

Su modelli murini dello studio di *Napolitano et al.*, (2016) la mutazione di BAP1 ha evidenziato una maggiore polarizzazione dei macrofagi nel sottotipo M2 e un minore rilascio delle citochine IL-6 e delle chemochine MCP-1 e KC. MCP-1 e IL-6 aumentano a seguito dell'esposizione alle fibre di amianto e sono strettamente collegate alla cancerogenesi del mesotelioma. La risposta infiammatoria cronica può quindi avere un ruolo nello sviluppo pro-tumorale o antitumorale, a seconda dei casi. [108]

La trasformazione mesoteliale indotta dall'amianto è guidata dall'infiammazione cronica mediata dalla proteina HMGB1. I ridotti livelli di BAP1 favoriscono il rilascio di HMGB1 nella matrice extracellulare ed è per questo che il suo ruolo è strettamente connesso all'infiammazione che causa la trasformazione neoplastica. In particolare,

BAP1 forma un complesso con HMB1 e HDAC1, a seguito del quale HMGB1 viene deacetilata e trasloca nel nucleo dove viene attivata e rilasciata nello spazio extracellulare. [103]

4.1.2 Riparazione del DNA

Il mantenimento dell'integrità genomica rappresenta una delle principali funzioni di BAP1, grazie al coordinamento dei meccanismi di riparazione del danno del DNA (*DNA Damage Response*, DDR). BAP1 regola due vie principali: la *via di riparazione per ricombinazione omologa* (HR), nel caso di rotture a doppio filamento, e la *via di riparazione per escissione di nucleotidi* (NER), nel caso delle lesioni a singolo filamento. [103]

In presenza di una rottura a doppio filamento viene avviata una cascata segnale mediata dalla proteina ubiquitina. L'*ubiquitina ligasi E3 RING finger* RNF8/RNF168 inserisce delle catene di ubiquitina agli istoni per il reclutamento dei complessi di riparazione del DNA nel punto esatto della rottura. [111] BAP1 stimola la riparazione tramite la via HR, un meccanismo altamente preciso mediato da BRCA1. [112] BAP1 rimuove l'ubiquitina inserita da RNF8 e RNF168. [111] Se la mutazione è presente, si ha un'elevata frequenza di rotture cromosomiche, specialmente in seguito a radiazioni ionizzanti a cui le cellule risultano ipersensibili. [112]

La *via di riparazione per escissione di nucleotidi* (NER) viene regolata da BAP1 nel caso di rotture a singolo filamento (SSB), essendo un meccanismo meno preciso rispetto alla via HR. Questa via è mediata dalla *poli ADP-ribosio polimerasi* (PARP). PARP1 interagisce con BAP1 e ne aumenta la stabilità, tramite ubiquitinazione e PARilazione. Viene infatti impedito il reclutamento dell'*ubiquitina ligasi E3*, tramite l'inibizione della degradazione di BAP1 a livello del proteasoma. BAP1 e l'attività deubiquitinasi aumentano nel sito del danno, permettendo la riparazione. [103]

La perdita di BAP1 causa l'innescamento di vie di riparazione meno efficienti o aberranti, che causano l'accumulo di danni al DNA che portano alla trasformazione neoplastica. [23]

4.1.3 Regolazione del ciclo cellulare

BAP1 contribuisce attivamente all'integrità dello *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC), un meccanismo di controllo che regola la *segregazione* cromosomica prima dell'inizio della divisione cellulare. La mutazione di BAP1 causa un indebolimento di questo sistema di controllo: durante le analisi si evidenzia, infatti, la formazione di anomalie morfologiche, come nuclei multipli e micronuclei. [98] La sola perdita di BAP1 cambia la morfologia del fuso mitotico, in quanto ne aumenta la lunghezza, modifica la forma e provoca il distacco dei poli del fuso dai microtubuli. [101]

All'inizio della mitosi, il centrosoma, a seguito della maturazione, accresce e inizia la nucleazione dei microtubuli, a seguito del reclutamento di γ -tubulina e CDK5RAP2. La deplezione di BRCA1 sembra non influenzare i livelli di γ -tubulina, al contrario della perdita di BAP1: questo conferma l'ipotesi che spesso la perdita di BAP1 ha ulteriori conseguenze che vanno oltre il controllo dell'espressione di BRCA1. [101]

Nonostante il meccanismo di regolazione del numero dei centrosomi sia ancora in fase di studio, è stato evidenziato che tramite l'ubiquitinazione di γ -tubulina, necessaria alla duplicazione dei centrosomi, BRCA1 controlla il numero dei centrosomi, localizzandosi al loro interno durante il ciclo cellulare. La perdita di BRCA1 è stata associata all'accumulo di γ -tubulina nei centrosomi e alla diminuzione delle dimensioni del centrosoma durante l'interfase. [101]

A seguito della perdita di BAP1 si è inoltre rilevata una sostanziale perdita di KIF18A e KIF18B dai microtubuli del cinetocore. Queste chinesine mitotiche sono essenziali per la divisione cellulare: KIF18A regola la

lunghezza del fuso e il posizionamento dei cromosomi mentre KIF18B regola la lunghezza dei microtubuli astrali. [101]

All'interno del nucleo, BAP1 coordina il ciclo cellulare deubiquitinando HCF-1 (*Host Cell Factor 1*), permettendo di richiamare enzimi modificatori della cromatina (tra cui E2F1) e rimuovere il freno della trascrizione. [113, 114] È stato inoltre dimostrato da alcune analisi che la deplezione di BAP1 può perturbare i livelli di mRNA di BRCA1: BAP1 forma un complesso ternario con HCF-1 e Yin Yang 1 (YY1), una proteina a dito di zinco in grado di regolare positivamente l'espressione di BRCA1.

Infine, la ridotta espressione di BAP1 è stata associata ad una ridotta proliferazione cellulare e all'inibizione del ciclo cellulare in fase S. Questo gene è in grado di promuovere l'insorgenza del tumore inducendo un checkpoint G1/S ritardato favorendo una proliferazione aberrante. [108]

Tramite questi meccanismi, BAP1 agisce, sia direttamente sia regolato da BRCA1, nella regolazione del ciclo cellulare delle cellule mesoteliali. [101]

4.1.4 Controllo epigenetico

Uno dei ruoli più importanti di BAP1 è la regolazione dell'epigenetica. In sua assenza o in presenza di una mutazione, vengono alterati i modelli di modificazione istonica che causano una modifica dell'espressione genica. [96]

Oltre alla regolazione dell'*ubiquitinazione degradativa* delle proteine che ne impedisce la degradazione, BAP1 regola l'ubiquitinazione degli istoni, regolando l'epigenetica. [115]

L'equilibrio tra l'eucromatina e l'eterocromatina viene regolato dalla famiglia del gruppo *Polycomb* (PcG) formata dal complesso PR-DUB, il complesso PRC1 e PRC2. Questi ultimi metilano e ubiquitinano la

cromatina, silenziando i geni non necessari alla cellula. Il complesso PR-DUB, in cui rientra BAP1, invece, rimuove i residui di ubiquitina inseriti sulla lisina 119 dell'istone 2A (H2AK119Ub), permettendo di controllare il rimodellamento della cromatina. L'intervento di BAP1 favorisce la rottura del legame tra l'istone H2A e l'ubiquitina e rende la cromatina in conformazione aperta, necessaria a favorire l'espressione di determinati geni. [115]

Durante la cancerogenesi, se BAP1 risulta mutato la capacità di regolare l'epigenetica viene persa: l'espressione genica viene alterata e la cellula perde la sua identità diventando neoplastica. [115]

4.1.5 Apoptosi e ferroptosi

Le cellule mettono in atto strategie di adattamento metabolico tramite vie di morte programmata, sia apoptotiche sia non apoptotiche. In presenza di tumore, questi percorsi sono *disregolati* e permettono alla cellula di sopravvivere anche in condizioni di stress estremo. [116]

È stato dimostrato da uno studio di *Carbone et al.* (2020) che la perdita di BAP1 a livello citoplasmatico altera l'apoptosi, e questo impedisce alle cellule danneggiate di essere eliminate, favorendo lo sviluppo tumorale. [116, 117] Il processo viene regolato dalle deubiquitilazione e stabilizzazione del recettore dell'*inositolo-1,4,5-trifosfato di tipo 3* (IP3R3) a livello del reticolo endoplasmatico (ER) dove avviene il rilascio degli ioni calcio all'interno del citoplasma. [103] Questo favorisce il rilascio di calcio nei mitocondri e del *citocromo c*, con l'attivazione dell'apoptosi. [116] Nei modelli murini con *knock-out* condizionale per BAP1 si osserva l'aumento dei livelli di *caspasi-3*, che suggerisce che la perdita del gene interferisce con i normali meccanismi apoptotici. [116]

La ferroptosi, invece, è una forma di morte cellulare regolata non apoptotica, indotta da stress ossidativo, causata dalla sovrapproduzione di

specie radicaliche dell'ossigeno (ROS). [116] SLC7A11, membro 11 della famiglia dei trasportatori dei soluti 7, è una subunità catalitica dell'antiporto cistina-glutammato, che trasporta la cistina extracellulare all'interno della cellula, dove viene trasformata in cisteina. La cistina ha un ruolo importante nel mantenimento dell'equilibrio redox, e viene usata per la produzione di glutatione che viene utilizzato dalla *glutathione perossidasi* per proteggere la cellula dalla perossidazione lipidica. [118]

BAP1 normalmente reprime l'espressione di SLC7A11 tramite la deubiquitinazione di H2Aub. Da uno studio di *Zhang et al.* (2018) è stato rilevato che, in caso di mutazione o *down-regulation*, l'aumento dell'espressione di SLC7A11 nelle cellule tumorali aumenta l'assorbimento di cistina e la produzione di GSH. Questo permette una maggiore resistenza allo stress ossidativo e, di conseguenza, anche alla ferroptosi. [118]

4.1.6 Stress metabolico

BAP1 esercita un ruolo di sopravvivenza cellulare in risposta allo stress metabolico grazie all'inibizione, tramite deubiquitinazione dell'istone H2A, della *risposta alle proteine non ripiegate* (UPR), che può essere indotta dalla carenza di glucosio nel reticolo endoplasmatico. [119]

Se mutato, BAP1 interviene nella riprogrammazione del metabolismo cellulare tramite *effetto Warburg* in cui la respirazione mitocondriale viene soppressa a favore della glicolisi. Le cellule tumorali producono energia stimolando la glicolisi aerobica, seguita dalla fermentazione del piruvato in lattato. [101] L'aumento della secrezione di lattato extracellulare favorisce l'evasione immunitaria e la crescita tumorale. [115]

Dagli studi di *Carbone et al.* è stato evidenziato che le cellule mesoteliali e fibroblastiche primarie portatrici di mutazioni eterozigoti di BAP1 presentano una glicolisi aerobica e una produzione di lattato elevata e una

respirazione mitocondriale ridotta. Usando un modello murino con *knockout* di BAP1, ne è stato evidenziato il ruolo chiave in queste vie metaboliche, sia nel fegato sia nel pancreas. [120] Il fenotipo con BAP1 mutato include pancreatite, ipoglicemia, ipercolesterolemia e perdita dei lipidi epatici. [121]

Warburg scoprì che questo meccanismo permetteva alle cellule tumorali di proteggersi dall'ipossia, fornendo una ricca fonte di precursori per la sintesi di acidi nucleici, acidi grassi e fosfolipidi. Si ipotizza che l'ipossia e l'acidosi siano in grado di selezionare solo le cellule in grado di sopravvivere e adattarsi ad ambienti ostili; ma nel caso dei portatori della mutazione al gene BAP1 non è necessaria la presenza di un processo di selezione per la crescita cellulare, e questo accelera l'insorgenza della patologia. [120]

4.2 MAGGIORE INDICE DI SOPRAVVIVENZA

Oltre a determinare profondi cambiamenti nei meccanismi fisiologici che contribuiscono all'insorgenza tumorale, la perdita di BAP1 influenza significativamente il progresso della malattia. È stato ampiamente dimostrato che i pazienti affetti da mesotelioma pleurico che presentano una mutazione germinale di BAP1 hanno una prognosi migliore, data da una minore aggressività tumorale e una migliore risposta alle terapie. Il numero limitato di pazienti e i dati contraddittori degli studi non hanno ancora permesso di utilizzare BAP1 come *biomarker* predittivo o prognostico nell'attuale pratica clinica. [97, 23]

Ancora oggi il motivo della minore aggressività del tumore nei portatori di questa mutazione è sconosciuto. [19] La migliore sopravvivenza potrebbe essere attribuita ad una combinazione di diversi fattori, tra cui le variazioni nella risposta immunitaria, una maggiore risposta alle terapie, l'età della diagnosi, e la possibilità di un trattamento precoce. [103]

La mutazione somatica del gene BAP1 è emersa nel 60% dei casi di mesotelioma pleurico e fino all'80% nel caso del sottogruppo epitelioide. [96] Le mutazioni germinali, invece, sono meno comuni e sono associate ad un tumore meno aggressivo. [96]

Dallo studio di *Hassan et al.* (2019) è emerso che l'effetto della mutazione è altamente significativo per i casi di mesotelioma pleurico, con una sopravvivenza di **7,9 anni** ($P = 0,0012$) rispetto ai 2,4 anni per i pazienti che non presentano la mutazione (*Figura 8*). [23] La sopravvivenza mediana è risultata *7 volte superiore* nei pazienti con mutazioni germinali di BAP1, rispetto ai pazienti con tumori sporadici. I pazienti con mutazioni germinali erano più giovani alla diagnosi e di sesso prettamente femminile. [96] Il 26% dei pazienti sopravvive per 10 o più anni, e alcuni sono vivi e in buona salute dopo 20 anni dalla diagnosi. [19]

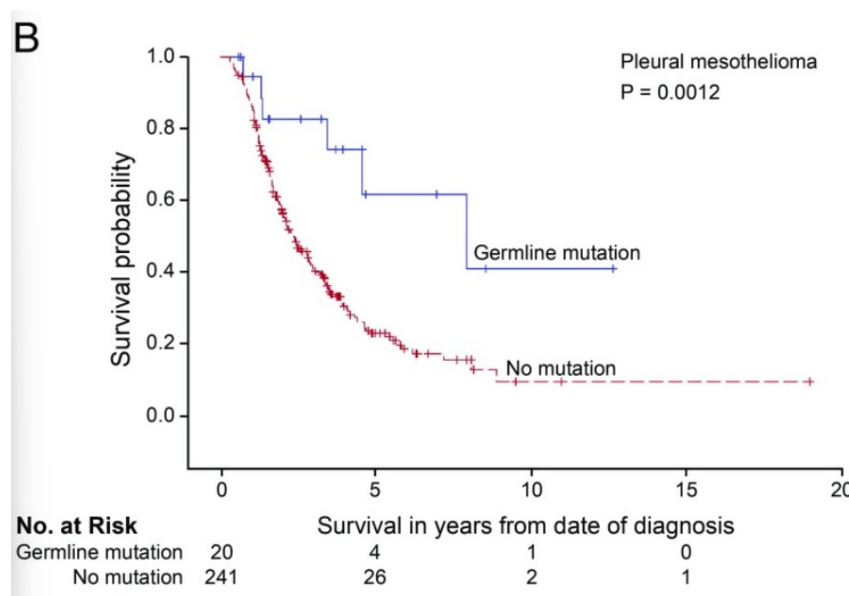


Figura 8: Profilo di sopravvivenza con e senza mutazione del gene BAP1.

È importante sottolineare che per i pazienti portatori di mutazioni somatiche e/o germinali la sopravvivenza è superiore e indipendente dal trattamento ricevuto, rispetto ai casi *wild-type*. [122]

4.3 MAGGIORE RISPOSTA ALLE TERAPIE

Le limitazioni dei trattamenti standard e di quelli introdotti recentemente, insieme alla complessa *drug delivery* dovuta al microambiente tumorale, spingono la Comunità Scientifica a ricercare nuovi approcci terapeutici. Le prospettive di sopravvivenza per il mesotelioma pleurico rimangono scarse, e rimangono ancora aperte molte domande sull'efficacia degli attuali trattamenti approvati dalle linee guida. In questo contesto, una delle domande più importanti è: *si può utilizzare la mutazione di BAP1 come guida per la scelta terapeutica individuale?* [19]

4.3.1 Lo scenario terapeutico attuale

Per oltre 15 anni, l'unico trattamento di prima linea approvato dalla *Food and Drug Administration* è stata la chemioterapia a base di platino e pemetrexed, specialmente nel caso di una malattia non resecabile o per i pazienti con malattia recidivante. Secondo lo studio di fase III EMPHAICS, l'utilizzo del platino, in particolare, ha permesso di aumentare la risposta terapeutica favorevole. L'associazione con *pemetrexed* ha permesso di aumentare la sopravvivenza mediana di 9-12 mesi per il mesotelioma non resecabile e di 17-25 mesi per il mesotelioma pleurico resecabile. [95, 123] Negli anziani o nei soggetti più fragili, si ha la possibilità di sostituire il cisplatino con il *carboplatino*, aumentando l'ORR al 25-29%, pur aumentando la tossicità. L'aggiunta dell'anticorpo anti-VEGF *bevacizumab* ha mostrato diversi benefici in termini di *sopravvivenza libera da progressione* (PFS) a 9.2 mesi (rispetto ai 7.3) e in termini di sopravvivenza globale (OS) a 18.8 mesi (rispetto ai 16.1), ma non ha ottenuto l'approvazione da parte degli enti regolatori a causa della sua tossicità. [96, 124, 125, 126]

Gli *inibitori dei checkpoint immunitari* (ICI), approvati dalla FDA nel 2020, sfruttano il sistema immunitario del paziente per l'eliminazione

delle cellule neoplastiche, e danno diversi benefici in termini di OS. [120, 122] Lo studio di fase III *CheckMate 743* ha dimostrato che la combinazione nivolumab e ipilimumab (specifici verso PD-1 e CTLA4) offre benefici significativi, specialmente nel caso del mesotelioma sarcomatoide, con un aumento del tasso di sopravvivenza globale (OS) fino a 3 anni nel 23,2% dei pazienti (contro il 15,4% nel caso della chemioterapia). [96, 124, 127]

Alcuni esempi di approccio immunoterapico attualmente in uso includono inibitori delle cellule T, citochine IL-12 e IL-15, vaccini terapeutici, l'eliminazione di cellule immunosoppressive. In alcuni Paesi, tuttavia, l'immunoterapia non è ancora stata approvata per l'istologia epitelioide. [123]

L'utilizzo di farmaci immunoterapici è stato ampiamente studiato in combinazione con il trattamento chemioterapico standard. [126] Nella maggior parte dei casi, il tumore progredisce a seguito della terapia di prima linea e la terapia di seconda linea ha evidenziato solo benefici clinici modesti. Le linee guida raccomandano la monoterapia con vinorelbina o gemcitabina o il trattamento chemioterapico platino-pemetrexed, se la PFS è superiore a tre mesi dopo il trattamento di prima linea. [96, 123] L'immunoterapia in seconda linea ha dimostrato risultati contrastanti.

La prognosi del mesotelioma è infausta nella maggior parte dei casi, specialmente a causa dell'impossibilità di rimuovere chirurgicamente il tumore, a causa del cattivo stato di salute del paziente e dall'età già avanzata al momento della diagnosi. [95] Nel caso di una malattia resecabile, il trattamento del mesotelioma si basa su una terapia composta da chirurgia (torascopia con pleurodesi, pleurectomia/decorticazione e pneumonectomia extra pleurica), chemioterapia e radioterapia. [125]

L'intervento chirurgico deve essere considerato in base alla salute del paziente e all'integrità cardiopolmonare. [95]

4.3.2 Limitazioni terapeutiche e fallimenti clinici

Nonostante i progressi degli ultimi anni, i tassi di sopravvivenza rimangono ancora scarsi. L'efficacia dei trattamenti è ostacolata da fattori intrinseci al microambiente tumorale, come l'ipossia, la resistenza alla ferroptosi e la complessa infiltrazione delle cellule immunitarie che ostacolano la *drug delivery*. [19]

L'uso degli *inibitori dei checkpoint immunitari* (ICI) come trattamento di seconda linea è oggetto di dibattito. Lo studio CONFIRM ha inizialmente evidenziato un vantaggio di sopravvivenza globale (OS) per Nivolumab, mentre al contrario lo studio PROMISE-Meso non ha riscontrato benefici significativi per Pembrolizumab, rispetto alla chemioterapia standard. [8, 128] Lo studio PROMISE-Meso ha fornito stime più stabili, mentre è stato ipotizzato che i risultati positivi del CONFIRM fossero influenzati da *bias* statistici, a causa della "*censura post-progression*". Una volta rianalizzati i dati, includendo anche i decessi successivi, PFS e OS hanno perso evidenza statistica, a fronte di una tossicità di grado superiore o pari a 3. [8, 129]

Le terapie mirate hanno rappresentato un progresso nel trattamento di alcuni tumori. Si è registrato negli ultimi anni un miglioramento nella comprensione del meccanismo molecolare ma la maggior parte degli studi clinici di nuovi potenziali farmaci sono falliti. [96]

5. BAP1 COME BIOMARKER PREDITTIVO

La prognosi del mesotelioma rimane ancora oggi sfavorevole e per questo la Comunità Scientifica si sta concentrando verso l'identificazione di nuovi biomarcatori o bersagli molecolari utili per lo sviluppo di terapie mirate. [123] L'identificazione di *biomarker* selettivi, come BAP1, potrebbe essere utile non solo nello screening delle popolazioni più a rischio e nella diagnosi precoce ma anche nel *follow-up* terapeutico. [9]

5.1 DIAGNOSTICA

Ad oggi, il metodo più utilizzato per valutare la mutazione di BAP1 è l'*immunoistochimica* (IHC). Questa analisi permette di distinguere il mesotelioma pleurico da proliferazioni mesoteliali reattive o da altre tipologie di carcinoma, come il carcinoma renale a cellule chiare, il carcinoma timico e il melanoma. [96] Siccome il rischio di una diagnosi errata è elevato, a causa della rarità del tumore, si stima che la percentuale di errore sia compreso tra il 14% e il 50%, specialmente nei paesi in via di sviluppo. L'immunoistochimica permette di migliorare l'accuratezza diagnostica. [95]

Le cellule normali presentano una colorazione nucleare di BAP1, assente nel caso delle cellule tumorali che mantengono, invece, la colorazione citoplasmatica. La perdita nucleare di BAP1 è omogenea nelle cellule neoplastiche nella maggior parte dei casi di mesotelioma. [96] Tuttavia, nessun singolo marcatore IHC è sensibile o specifico per il mesotelioma pleurico, per cui si raccomanda l'uso di *pannelli multiparametrici* con almeno due marcatori tumorali e due marcatori mesoteliali. [125] Se i risultati sono concordanti, la diagnosi può essere considerata confermata. [1]

Dal punto di vista genetico, il test germinale è fortemente raccomandato quando la *Variant Allele Frequency* (VAF) supera il 10%. [96, 131] Ad

oggi i pannelli di *screening* per i tumori ereditari comprendono 40-300 geni, tra cui BAP1: in questo modo è possibile individuare contemporaneamente molteplici mutazioni germinali, che possono essere associate ad un aumento della penetranza tumorale. [19] Recentemente, la perdita di BAP1 è stata integrata con altri *biomarker*, come la delezione omozigote di CDKN2A (p16) e l'espressione della *metil-tio-adenosina fosforilasi* (MTAP), che permettono di distinguere le cellule neoplastiche sulla superficie sierosa. [125]

5.2 L'ETEROGENEITA' CLINICA

L'eterogeneità clinica nei portatori della mutazione germinale di BAP1 è stata riportata dallo studio di *Carbone et al.* (2022), effettuato su un nucleo familiare di tre donne (due sorelle e una nipote). Nonostante le scelte terapeutiche differenti nelle tre casistiche, il decorso della patologia ha presentato caratteristiche simili:

La prima paziente (I-01) è una donna di 43 anni a cui è stato diagnosticato il mesotelioma pleurico epitelioide maligno. Ha deciso di sottoporsi a chirurgia e chemioterapia con *Cisplatino* e *Pemetrexed* e ad oggi, dopo sei anni dalla diagnosi, la paziente è guarita e mantiene un'ottima qualità di vita.



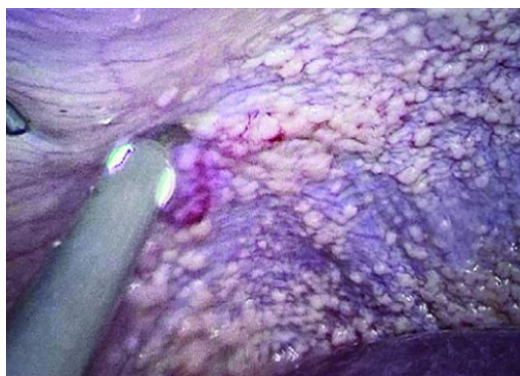
Paziente I-01. Noduli evidenziati durante la laparoscopia

La seconda paziente (I-02) è una donna di 46 anni, sorella della Paziente I-01. Ha una storia pregressa di carcinoma mammario e anche in questo caso le è stato diagnosticato mesotelioma pleurico epitelioide maligno. Nonostante la sua decisione di non sottoporsi ad alcun trattamento, la malattia non ha avuto progressioni e, dopo sei anni dalla diagnosi, è asintomatica e mantiene una qualità di vita alta.



Paziente I-02. Noduli identificati durante la laparoscopia

La terza paziente (II-09) è una donna di 39 anni, nipote delle pazienti I-01 e I-02. Per 8 anni ha mostrato versamenti pleurici ricorrenti, dopo i quali ha deciso di sottoporsi ad una biopsia: le è stato diagnosticato mesotelioma pleurico epitelioide maligno. Ha mostrato una risposta parziale alla chemioterapia standard.



Paziente II-09. Noduli evidenziati durante la VATS

Questi casi evidenziano la complessità di questa sindrome tumorale: spesso nei soggetti con BAP1 mutato, il decorso può risultare *subclinico*.

“Sarebbe cambiato qualcosa se la paziente II-09 si fosse sottoposta alla terapia otto anni prima, all’inizio della sintomatologia?”, conclude Carbone nel suo studio. Ad oggi manca l’evidenza di *biomarker* in grado di prevedere il decorso della patologia ed è difficile identificare quali pazienti possano beneficiare di una terapia realmente efficace. [19]

5.3 NUOVE FRONTIERE DIAGNOSTICHE E TERAPEUTICHE

Nonostante diverse evidenze, il valore prognostico di BAP1 rimane oggetto di dibattito in quanto le analisi hanno ottenuto risultati contraddittori, a causa probabilmente della diversità dei metodi di analisi immunoistochimiche (IHC) e delle coorti studiate. [96]

Nessun biomarcatore nel sangue (tra cui mesotelina, HMGB1, fibulina-3, calretinina) è stato valutato efficace per la diagnosi precoce di mesotelioma, nonostante i diversi studi. [19] Anche le analisi tramite *imaging tradizionale* (TAC ed ecografia) non si sono dimostrate efficienti: spesso, quando una massa è visibile alla TAC, la malattia è già in stadio avanzato. Sottoporre i pazienti sani a TAC ripetute li espone a radiazioni eccessive senza un beneficio in termini di sopravvivenza, a causa dell’alta fragilità dovuta ai danni del DNA in caso di mutazione. [19]

5.3.1 Protocolli di sorveglianza

Il *National Cancer Institute* (NCI) ha attivato due protocolli per i pazienti affetti da mesotelioma con la mutazione del gene BAP1, che mirano a sorvegliare il tumore per avere una prognosi più favorevole. [19]

Nel primo protocollo, si interviene con il *follow-up* dei pazienti che mira ad individuare in maniera non invasiva le neoplasie che insorgono, mediante risonanze magnetiche periodiche, esami dermatologici, mammografia e visite oculistiche. [19] Il test genetico è raccomandato nei

portatori delle mutazioni BAP1 all'età di 2 anni; la mutazione espone infatti i bambini ad un maggiore rischio di melanomi e meningiomi. [19]

Il secondo protocollo complementare, più innovativo, propone di (1) determinare l'incidenza e la prevalenza dei mesoteliomi subclinici, (2) diagnosticare i tumori precocemente grazie alla nuova tecnologia PCCT (*Photon-Counting CT*) e (3) stabilire nuove possibili strategie per il trattamento. Propone di sottoporre ogni tre anni i pazienti sopra i 33 anni, visionando direttamente la pleura tramite la *mini-torascopia*. [19]

5.3.2 Targeting molecolare

Scegliere la terapia sulla base della mutazione del gene ad oggi è ancora difficile nella normale pratica clinica, a causa delle limitate opzioni di trattamento efficaci. [124] Data la frequenza di mutazioni germinali nei geni coinvolti nella riparazione del DNA, è evidente la necessità di esplorare nuove terapie che possano sfruttare la letalità sintetica della riparazione del danno, come nel caso degli inibitori PARP. [23] Questi inibitori bloccano la polimerasi nella riparazione delle rotture a singolo filamento, causando rotture a doppio filamento che non possono essere riparate, a causa della deplezione o mutazione di BAP1. [132]

CONCLUSIONI

L'identificazione della mutazione del gene BAP1 ha rappresentato un punto di svolta nella conoscenza del mesotelioma pleurico, permettendo di superare il dogma che identificava questo tumore come una neoplasia incurabile e legata esclusivamente all'esposizione all'amianto. Ad oggi, la componente genetica germinale rappresenta una prospettiva concreta per migliorare la prevenzione, la diagnosi e l'efficacia terapeutica.

Dal 2011, grazie alla scoperta di *Carbone*, è stato possibile identificare l'assenza nucleare di BAP1 tramite immunohistochimica, efficace per identificare i mesoteliomi con mutazione biallelica del gene e per distinguere il sottogruppo mesoteliale, tra bifasico e sarcomatoide. I mesoteliomi del sottotipo sarcomatoide sono difficili da diagnosticare, in quanto assomigliano dal punto di vista istologico ad altri tumori e di conseguenza richiedono un'analisi più approfondita. [95]

La transizione del mesotelioma *in situ* al mesotelioma invasivo richiede diversi anni e questo è un dato che dovrebbe far riflettere sull'importanza di una diagnosi precoce. L'avvio di programmi di *screening* mirati potrebbe quindi risultare utile per aumentare la sopravvivenza, specialmente nel caso dei familiari dei portatori della mutazione. [19] Il mesotelioma è considerato non resecabile ma, nel caso dei soggetti con BAP1 mutato, lo *screening* e la risposta favorevole alle terapie permette di intervenire più facilmente tramite chirurgia, se il tumore viene diagnosticato in una fase precoce. Questo aumenta l'aspettativa di vita oltre dieci anni a seguito della diagnosi, e per altri ne comporta la guarigione completa. Monitoraggi di routine permetterebbero, inoltre, di individuare noduli pleurici asintomatici molto tempo prima della manifestazione, essendo facilmente identificabili tramite biopsia. [19]

Le ricerche future devono integrare nuove tipologie di analisi che permettano di evidenziare stati mutazionali di BAP1 in modo da personalizzare il trattamento. [96] Rimangono tutt'ora delle difficoltà dovute all'elevata eterogeneità dei pazienti e alla mancanza di marcatori specifici. [133]

Ad oggi la ricerca si sta concentrando sui difetti nei sistemi di riparazione del DNA che possono rappresentare un importante bersaglio terapeutico. L'uso degli inibitori della poli-ADP-ribosio polimerasi (PARP), da soli o in combinazione con la chemioterapia, è attualmente in fase di valutazione e potrebbe risultare efficace. [1, 95, 130]

Inoltre, si dovrebbe considerare che colpire un solo fattore potrebbe non essere sufficiente a garantire la gestione del mesotelioma, mentre la combinazione di diverse strategie terapeutiche potrebbe risultare più efficace, specialmente nei pazienti che non rispondono alla sola immunoterapia. Questo rende indispensabile l'identificazione di biomarcatori predittivi che possano orientare le scelte terapeutiche verso il *singolo* paziente. [133]

In conclusione, la presenza della mutazione di BAP1 definisce una tipologia di mesotelioma meno aggressivo e più sensibile alle terapie. La sfida consiste nel tradurre queste conoscenze in *linee guida standardizzate*, capaci di offrire opzioni terapeutiche efficaci e ridurre diagnosi tardive o errate. [95]

BIBLIOGRAFIA

- [1] Husain AN, Chapel DB, Attanoos R, Beasley MB, Bric L, Butnor K, Chirieac LR, Churg A, Dacic S, Galateau-Salle F, Hiroshima K, Hung YP, Klebe S, Krausz T, Khor A, Litzky L, Marchevsky A, Nabeshima K, Nicholson AG, Pavlisko EN, Roden AC, Roggli V, Sauter JL, Schulte JJ, Sheaff M, Travis WD, Tsao MS, Walts AE, Colby TV. Guidelines for Pathologic Diagnosis of Mesothelioma: 2023 Update of the Consensus Statement From the International Mesothelioma Interest Group. Arch Pathol Lab Med. (2024) <https://doi.org/10.5858/arpa.2023-0304-RA>
- [2] Rigon M, Mutti L, Campanella M. Pleural mesothelioma (PMe): The evolving molecular knowledge of a rare and aggressive cancer. (2024) <https://doi.org/10.1002/1878-0261.13591>
- [3] Mutsaers SE. The mesothelial cell. Int J Biochem Cell Biol. (2004) [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00242-5](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00242-5)
- [4] Hajj GNM, Cavarson CH, Pinto CAL, Venturi G, Navarro JR, Lima VCC. Malignant pleural mesothelioma: an update. J Bras Pneumol. (2021) <https://doi.org/10.36416/1806-3756/e20210129>
- [5] Thomas A, Chen Y, Yu T, Gill A, Prasad V. Distinctive clinical characteristics of malignant mesothelioma in young patients. Oncotarget. (2015) <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4414>
- [6] Elsayed AM, Kittaneh M, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH. An overview of BAP1 biological functions and current therapeutics. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. (2025) <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2025.189267>
- [7] Mott FE. Mesothelioma: a review. Ochsner J. (2012)
- [8] Gray, S. G., Meirson, T., & Mutti, L. *OncoTherapy in mesothelioma*. (2024) <https://doi.org/10.1201/9781003431909-13>
- [9] Ramos-Nino ME, Testa JR, Altomare DA, Pass HI, Carbone M, Bocchetta M, Mossman BT. Cellular and molecular parameters of mesothelioma. J Cell Biochem. (2006) <https://doi.org/10.1002/jcb.20828>
- [10] Suarez JS, Novelli F, Goto K, Ehara M, Steele M, Kim JH, Zolondick AA, Xue J, Xu R, Saito M, Pastorino S, Minaai M, Takanishi Y, Emi M, Pagano I, Wakeham A,

Berger T, Pass HI, Gaudino G, Mak TW, Carbone M, Yang H. HMGB1 released by mesothelial cells drives the development of asbestos-induced mesothelioma. (2023) <https://doi.org/10.1073/pnas.2307534120>

[11] Hodgson JT, Darnton A. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. (2020)

[12] Baur X, Soskolne CL, Lemen RA, Schneider J, Woitowitz HJ, Budnik LT. How conflicted authors undermine the World Health Organization (WHO) campaign to stop all use of asbestos: spotlight on studies showing that chrysotile is carcinogenic and facilitates other non-cancer asbestos-related diseases. (2015)

[13] Berman DW, Crump KS. Update of potency factors for asbestos-related lung cancer and mesothelioma. *Crit Rev Toxicol.* (2008) <https://doi.org/10.1080/10408440802276167>

[14] Weill H, Hughes JM, Churg AM. Changing trends in US mesothelioma incidence. *Occup Environ Med.* (2004) <https://doi.org/10.1136/oem.2003.010165>

[15] Schumann SO, Kocher G, Minervini F. Epidemiology, diagnosis and treatment of the malignant pleural mesothelioma, a narrative review of literature. *J Thorac Dis.* (2021) <https://doi.org/10.21037/jtd-20-2761>

[16] Stayner L, Welch LS, Lemen R. The worldwide pandemic of asbestos-related diseases. *Annu Rev Public Health.* (2013) <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-031811-124704>

[17] Carbone M, Ly BH, Dodson RF, Pagano I, Morris PT, Dogan UA, Gazdar AF, Pass HI, Yang H. Malignant mesothelioma: facts, myths, and hypotheses. *J Cell Physiol.* (2012) <https://doi.org/10.1002/jcp.22724>

[18] Baumann F, Flores E, Napolitano A, Kanodia S, Taioli E, Pass H, Yang H, Carbone M. Mesothelioma patients with germline BAP1 mutations have 7-fold improved long-term survival. *Carcinogenesis.* (2015) <https://doi.org/10.1093/carcin/bgu227>

[19] Carbone M, Pass HI, Ak G, Alexander HR Jr, Baas P, Baumann F, Blakely AM, Bueno R, Bzura A, Cardillo G, Churpek JE, Dianzani I, De Rienzo A, Emi M, Emri S, Felley-Bosco E, Fennell DA, Flores RM, Grosso F, Hayward NK, Hesdorffer M, Hoang CD, Johansson PA, Kindler HL, Kittaneh M, Krausz T, Mansfield A, Metintas M,

Minaai M, Mutti L, Nielsen M, O'Byrne K, Opitz I, Pastorino S, Pentimalli F, de Perrot M, Pritchard A, Ripley RT, Robinson B, Rusch V, Taioli E, Takinishi Y, Tanji M, Tsao AS, Tuncer AM, Walpole S, Wolf A, Yang H, Yoshikawa Y, Zolondick A, Schrupp DS, Hassan R. Medical and Surgical Care of Patients With Mesothelioma and Their Relatives Carrying Germline BAP1 Mutations. *J Thorac Oncol.* (2022) <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.03.014>

[20] Gilham C, Rake C, Burdett G, Nicholson AG, Davison L, Franchini A, Carpenter J, Hodgson J, Darnton A, Peto J. Pleural mesothelioma and lung cancer risks in relation to occupational history and asbestos lung burden. *Occup Environ Med.* (2016) <https://doi.org/10.1136/oemed-2015-103074>

[21] Peto J, Decarli A, La Vecchia C, Levi F, Negri E. The European mesothelioma epidemic. *Br J Cancer.* (1999) <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690105>

[22] Bardelli F, Giacobbe C, Ballirano P, Borelli V, Di Benedetto F, Montegrossi G, Bellis D, Pacella A. Closing the knowledge gap on the composition of the asbestos bodies. *Environ Geochem Health.* (2023) <https://doi.org/10.1007/s10653-023-01557-0>

[23] Hassan R, Morrow B, Thomas A, Walsh T, Lee MK, Gulsuner S, Gadiraju M, Panou V, Gao S, Mian I, Khan J, Raffeld M, Patel S, Xi L, Wei JS, Hesdorffer M, Zhang J, Calzone K, Desai A, Padiernos E, Alewine C, Schrupp DS, Steinberg SM, Kindler HL, King MC, Churpek JE. Inherited predisposition to malignant mesothelioma and overall survival following platinum chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2019) <https://doi.org/10.1073/pnas.1821510116>

[24] Visonà SD, Bertoglio B, Favaron C, Capella S, Belluso E, Colosio C, Villani S, Ivic-Pavlicic T, Taioli E. A postmortem case control study of asbestos burden in lungs of malignant mesothelioma cases. *J Transl Med.* (2023) <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04761-9>

[25] Goodman JE, Korchevskiy A, Wylie AG. Comparison of various methodological approaches to model asbestos thresholds for mesothelioma. *Front Public Health.* (2025) <https://doi.org/10.3389/fpubh.2025.1569343>

[26] Lippmann M, Yeates DB, Albert RE. Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br J Ind Med.* (1980) <https://doi.org/10.1136/oem.37.4.337>

- [27] Ghio AJ, Stewart M, Sangani RG, Pavlisko EN, Roggli VL. Asbestos and Iron. *Int J Mol Sci.* (2023) <https://doi.org/10.3390/ijms241512390>
- [28] Rehrauer H, Wu L, Blum W, Pecze L, Henzi T, Serre-Beinier V, Aquino C, Vrugt B, de Perrot M, Schwaller B, Felley-Bosco E. How asbestos drives the tissue towards tumors: YAP activation, macrophage and mesothelial precursor recruitment, RNA editing, and somatic mutations. *Oncogene.* (2018) <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0153-z>
- [29] Srikrishna G, Freeze HH. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia.* (2009) <https://doi.org/10.1593/neo.09402>
- [30] Bernstein D, Dunnigan J, Hesterberg T, Brown R, Velasco JA, Barrera R, Hoskins J, Gibbs A. Health risk of chrysotile revisited. *Crit Rev Toxicol.* (2013) <https://doi.org/10.1080/10408440.2012.756454>
- [31] Schinwald A, Donaldson K. Use of back-scatter electron signals to visualise cell/nanowires interactions in vitro and in vivo; frustrated phagocytosis of long fibres in macrophages and compartmentalisation in mesothelial cells in vivo. *Part Fibre Toxicol.* (2012) <https://doi.org/10.1186/1743-8977-9-34>
- [32] Toyokuni S, Yanatori I, Kong Y, Zheng H, Motooka Y, Jiang L. Ferroptosis at the crossroads of infection, aging and cancer. *Cancer Sci.* (2020) <https://doi.org/10.1111/cas.14496>
- [33] Crovella S, Bianco AM, Vuch J, Zupin L, Moura RR, Trevisan E, Schneider M, Brollo A, Nicastro EM, Cosenzi A, Zabucchi G, Borelli V. Iron signature in asbestos-induced malignant pleural mesothelioma: A population-based autopsy study. *J Toxicol Environ Health A.* (2016) <https://doi.org/10.1080/15287394.2015.1123452>
- [34] Hsu MY, Mina E, Roetto A, Porporato PE. Iron: An Essential Element of Cancer Metabolism. *Cells.* (2020) <https://doi.org/10.3390/cells9122591>
- [35] Sánchez M, Sabio L, Gálvez N, Capdevila M, Dominguez-Vera JM. Iron chemistry at the service of life. *IUBMB Life.* (2017) <https://doi.org/10.1002/iub.1602>
- [36] Cabantchik ZI. Labile iron in cells and body fluids: physiology, pathology, and pharmacology. *Front Pharmacol.* (2014) <https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00045>

- [37] Macher GZ, Torma A, Beke D. Examining the Environmental Ramifications of Asbestos Fiber Movement Through the Water-Soil Continuum: A Review. *Int J Environ Res Public Health*. (2025) <https://doi.org/10.3390/ijerph22040505>
- [38] Toyokuni S, Kong Y. Decoding the molecular enigma behind asbestos and fibrous nanomaterial-induced carcinogenesis. *J Occup Health*. (2025) <https://doi.org/10.1093/jocuh/uiac064>
- [39] Zangari M, Piccirilli F, Vaccari L, Radu C, Zacchi P, Bernareggi A, Leone S, Zabucchi G, Borelli V. Ferritin adsorption onto chrysotile asbestos fibers influences the protein secondary structure. *Heliyon*. (2024) <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e38966>
- [40] Gunshin H, Allerson CR, Polycarpou-Schwarz M, Rofts A, Rogers JT, Kishi F, Hentze MW, Rouault TA, Andrews NC, Hediger MA. Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter. *FEBS Lett*. (2001) [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)03189-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)03189-1)
- [41] Bardelli F, Veronesi G, Capella S, Bellis D, Charlet L, Cedola A, Belluso E. New insights on the biomineralization process developing in human lungs around inhaled asbestos fibres. *Sci Rep*. (2017) <https://doi.org/10.1038/srep44862>
- [42] Borelli V, Brochetta C, Melato M, Rizzardi C, Polentarutti M, Busatto C, Vita F, Abbate R, Gotter R, Zabucchi G. A procedure for the isolation of asbestos bodies from lung tissue by exploiting their magnetic properties: a new approach to asbestos body study. *J Toxicol Environ Health A*. (2007) <https://doi.org/10.1080/15287390701380906>
- [43] Avramescu ML, Potiszil C, Kunihiro T, Okabe K, Nakamura E. An investigation of the internal morphology of asbestos ferruginous bodies: constraining their role in the onset of malignant mesothelioma. *Part Fibre Toxicol*. (2023) <https://doi.org/10.1186/s12989-023-00522-0>
- [44] Bardelli F, Pacella A, Giacobbe C, Di Benedetto F, Montegrossi G, Borelli V, Ballirano P. The composition of asbestos bodies in human lungs. *EGU General Assembly*. (2023) <https://doi.org/10.5194/egusphere-egu23-14620>
- [45] Celsi F, Crovella S, Moura RR, Schneider M, Vita F, Finotto L, Zabucchi G, Zacchi P, Borelli V. Pleural mesothelioma and lung cancer: the role of asbestos exposure and

genetic variants in selected iron metabolism and inflammation genes. *J Toxicol Environ Health A*. (2019) <https://doi.org/10.3892/br.2014.406>

[46] Yang H, Rivera Z, Jube S, Nasu M, Bertino P, Goparaju C, Franzoso G, Lotze MT, Krausz T, Pass HI, Bianchi ME, Carbone M. Programmed necrosis induced by asbestos in human mesothelial cells causes high-mobility group box 1 protein release and resultant inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2010) <https://doi.org/10.1073/pnas.1006542107>

[47] Malakoti F, Targhazeh N, Abadifard E, Zarezadeh R, Samemaleki S, Asemi Z, Younesi S, Mohammadnejad R, Hadi Hossini S, Karimian A, Alemi F, Yousefi B. DNA repair and damage pathways in mesothelioma development and therapy. *Cancer Cell Int*. (2022) <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02597-9>

[48] Brossel H, Fontaine A, Hoyos C, Jamakhani M, Willems M, Hamaidia M, Willems L. Activation of DNA Damage Tolerance Pathways May Improve Immunotherapy of Mesothelioma. *Cancers (Basel)*. (2021) <https://doi.org/10.3390/cancers13133211>

[49] Badhai J, Pandey GK, Song JY, Krijgsman O, Bhaskaran R, Chandrasekaran G, Kwon MC, Bombardelli L, Monkhorst K, Grasso C, Zevenhoven J, van der Vliet J, Cozijnsen M, Krimpenfort P, Peeper D, van Lohuizen M, Berns A. Combined deletion of Bap1, Nf2, and Cdkn2ab causes rapid onset of malignant mesothelioma in mice. *J Exp Med*. (2020) <https://doi.org/10.1084/jem.20191257>

[50] Gavande NS, VanderVere-Carozza PS, Hinshaw HD, Jalal SI, Sears CR, Pawelczak KS, Turchi JJ. DNA repair targeted therapy: The past or future of cancer treatment? *Pharmacol Ther*. (2016) <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.02.003>

[51] Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, Cox NJ, Dogan AU, Pass HI, Trusa S, Hesdorffer M, Nasu M, Powers A, Rivera Z, Comertpay S, Tanji M, Gaudino G, Yang H, Carbone M. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet*. (2011) <https://doi.org/10.1038/ng.912>

[52] Kagan E. Asbestos-Induced Mesothelioma Is Fiber Biopersistence Really a Critical Factor? *The American Journal of Pathology*. (2013) [https://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440\(13\)00617-2/pdf](https://ajp.amjpathol.org/article/S0002-9440(13)00617-2/pdf)

- [54] Li C, Xu X, Wei S, Jiang P, Xue L, Wang J; Senior Correspondence. Tumor-associated macrophages: potential therapeutic strategies and future prospects in cancer. *J Immunother Cancer*. (2021) <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-001341>
- [55] Chen Y, Song Y, Du W, Gong L, Chang H, Zou Z. Tumor-associated macrophages: an accomplice in solid tumor progression. *J Biomed Sci*. (2019) <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0568-z>
- [56] Zhu J. Transcriptional regulation of Th2 cell differentiation. *Immunol Cell Biol*. (2010) <https://doi.org/10.1038/icb.2009.114>
- [57] Laberiano-Fernandez C, Baldavira CM, Machado-Rugolo J, Tamegnon A, Pandurengan RK, Ab'Saber AM, Balancin ML, Takagaki TY, Nagai MA, Capelozzi VL, Parra ER. The Immunological Landscape of M1 and M2 Macrophages and Their Spatial Distribution in Patients with Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancers (Basel)*. (2023) <https://doi.org/10.3390/cancers15215116>
- [58] Xia W, Zhang X, Wang Y, Huang Z, Guo X, Fang L. Progress in targeting tumor-associated macrophages in cancer immunotherapy. *Front Immunol*. (2025) <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1658795>
- [59] Cassetta L, Fragkogianni S, Sims AH, Swierczak A, Forrester LM, Zhang H, Soong DYH, Cotechini T, Anur P, Lin EY, Fidanza A, Lopez-Yrigoyen M, Millar MR, Urman A, Ai Z, Spellman PT, Hwang ES, Dixon JM, Wiechmann L, Coussens LM, Smith HO, Pollard JW. Human Tumor-Associated Macrophage and Monocyte Transcriptional Landscapes Reveal Cancer-Specific Reprogramming, Biomarkers, and Therapeutic Targets. *Cancer Cell*. (2019) <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.02.009>
- [60] Oelschlaegel D, Weiss Sadan T, Salpeter S, Krug S, Blum G, Schmitz W, Schulze A, Michl P. Cathepsin Inhibition Modulates Metabolism and Polarization of Tumor-Associated Macrophages. *Cancers (Basel)*. (2020) <https://doi.org/10.3390/cancers12092579>
- [61] Li M, He L, Zhu J, Zhang P, Liang S. Targeting tumor-associated macrophages for cancer treatment. *Cell Biosci*. (2022) <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00823-5>
- [62] Xu D, Gao Y, Yang H, Spils M, Marti TM, Losmanová T, Su M, Wang W, Zhou Q, Dorn P, Shu Y, Peng RW. BAP1 Deficiency Inflames the Tumor Immune Microenvironment and Is a Candidate Biomarker for Immunotherapy Response in

Malignant Pleural Mesothelioma. *JTO Clin Res Rep.* (2024) <https://doi.org/10.1016/j.jtocrr.2024.100672>

[63] Jube S, Rivera ZS, Bianchi ME, Powers A, Wang E, Pagano I, Pass HI, Gaudino G, Carbone M, Yang H. Cancer cell secretion of the DAMP protein HMGB1 supports progression in malignant mesothelioma. *Cancer Res.* (2012) <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3481>

[64] Yang H, Bocchetta M, Kroczyńska B, Elmishad AG, Chen Y, Liu Z, Bubici C, Mossman BT, Pass HI, Testa JR, Franzoso G, Carbone M. TNF- α inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF- κ B-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2006) <https://doi.org/10.1073/pnas.0604008103>

[65] Park MH, Hong JT. Roles of NF- κ B in Cancer and Inflammatory Diseases and Their Therapeutic Approaches. *Cells.* (2016) <https://doi.org/10.3390/cells5020015>

[66] Pedra JH, Cassel SL, Sutterwala FS. Sensing pathogens and danger signals by the inflammasome. *Curr Opin Immunol.* (2009) <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.01.006>

[67] Willingham SB, Bergstralh DT, O'Connor W, Morrison AC, Taxman DJ, Duncan JA, Barnoy S, Venkatesan MM, Flavell RA, Deshmukh M, Hoffman HM, Ting JP. Microbial pathogen-induced necrotic cell death mediated by the inflammasome components CIAS1/cryopyrin/NLRP3 and ASC. *Cell Host Microbe.* (2007) <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.07.009>

[68] Kelley N, Jeltema D, Duan Y, He Y. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *Int J Mol Sci.* (2019) <https://doi.org/10.3390/ijms20133328>

[69] Blevins HM, Xu Y, Biby S, Zhang S. The NLRP3 Inflammasome Pathway: A Review of Mechanisms and Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Aging Neurosci.* (2022) <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.879021>

[70] Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science.* (2008) <https://doi.org/10.1126/science.1156995>

- [71] Shukla A, Miller JM, Hillegass JM, MacPherson MB, Beuschel SL., Pass HI, Mossman BT. Role of the NLRP3 inflammasome in the development and drug resistance of malignant mesothelioma. *Cancer Research*. (2012) <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2012-5461>
- [72] *Asbestos exposure protein study*. University of Hawai'i News. (2023) <https://www.hawaii.edu/news/2023/09/20/asbestos-exposure-protein-study/>
- [73] Liu JY, Brass DM, Hoyle GW, Brody AR. TNF-alpha receptor knockout mice are protected from the fibroproliferative effects of inhaled asbestos fibers. *Am J Pathol*. (1998) [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)65698-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)65698-2)
- [74] Yaeger R, Corcoran RB. Targeting Alterations in the RAF-MEK Pathway. *Cancer Discov*. (2019) <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-1321>
- [75] Patel MR, Jacobson BA, De A, Frizelle SP, Janne P, Thumma SC, Whitson BA, Farassati F, Kratzke RA. Ras pathway activation in malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol*. (2007) <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e318145af6c>
- [76] Yang H, Gao Y, Xu D, Xu K, Liang SQ, Yang Z, Scherz A, Hall SRR, Forster S, Berezowska S, Yao F, Ochsenbein AF, Marti TM, Kocher GJ, Schmid RA, Dorn P, Peng RW. MEK1 drives oncogenic signaling and interacts with PARP1 for genomic and metabolic homeostasis in malignant pleural mesothelioma. *Cell Death Discov*. (2023) <https://doi.org/10.1038/s41420-023-01307-2>
- [77] Malakoti F, Targhazeh N, Abadifard E, Zarezadeh R, Samemaleki S, Asemi Z, Younesi S, Mohammadnejad R, Hadi Hossini S, Karimian A, Alemi F, Yousefi B. DNA repair and damage pathways in mesothelioma development and therapy. *Cancer Cell Int*. (2022) <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02597-9>
- [78] Dolly SO, Migali C, Tunariu N, Della-Pepa C, Khakoo S, Hazell S, de Bono JS, Kaye SB, Banerjee S. Indolent peritoneal mesothelioma: PI3K-mTOR inhibitors as a novel therapeutic strategy. *ESMO Open*. (2017) <https://doi.org/10.1136/esmoopen-2016-000101>
- [79] Sun L, Li C, Gao S. Diffuse malignant peritoneal mesothelioma: A review. *Front Surg*. (2023) <https://doi.org/10.3389/fsurg.2022.1015884>

- [80] Martinotti S, Patrone M, Moccia F, Ranzato E. Targeting Calcium Signalling in Malignant Mesothelioma. *Cancers* (Basel). (2019) <https://doi.org/10.3390/cancers11121839>
- [81] Blum W, Henzi T, Châtel-Soulet HE, Pecze L, Rodriguez JW, Vrugt B, Schwaller B. Absence of calretinin protein expression in malignant mesotheliomas from asbestos-exposed NF2^{+/-} mice and mouse mesothelioma cell lines from various mouse strains. *Biomark Res.* (2018) <https://doi.org/10.1186/s40364-018-0132-0>
- [82] Kobrinski DA, Yang H, Kittaneh M. BAP1: role in carcinogenesis and clinical implications. *Transl Lung Cancer Res.* (2020) <https://doi.org/10.21037/tlcr.2019.11.24>
- [83] Kim MC, Hwang SH, Kim NY, Lee HS, Ji S, Yang Y, Kim Y. Hypoxia promotes acquisition of aggressive phenotypes in human malignant mesothelioma. *BMC Cancer.* (2018) <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4733-9>
- [84] Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med.* (2013)
- [85] Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* (2007) <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9055-1>
- [86] 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) <https://doi.org/10.3390/cells13010084>
- [87] Sui X, Chen R, Wang Z, Huang Z, Kong N, Zhang M, Han W, Lou F, Yang J, Zhang Q, Wang X, He C, Pan H. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. *Cell Death Dis.* (2013) <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.350>
- [88] Cannito S, Novo E, di Bonzo LV, Busletta C, Colombatto S, Parola M. Epithelial-mesenchymal transition: from molecular mechanisms, redox regulation to implications in human health and disease. *Antioxid Redox Signal.* (2010) <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2890>

- [89] Magouliotis DE, Minervini F, Cioffi U, De Simone M, Patrini D, Scarci M. The Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Malignant Pleural Mesothelioma: From Pathogenesis to Diagnosis and Treatment. *Cells*. (2025) <https://doi.org/10.3390/cells14080585>
- [90] Celià-Terrassa T, Kang Y. How important is EMT for cancer metastasis? *PLoS Biol*. (2024) <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3002487>
- [91] Wei X, Chen Y, Jiang X, Peng M, Liu Y, Mo Y, Ren D, Hua Y, Yu B, Zhou Y, Liao Q, Wang H, Xiang B, Zhou M, Li X, Li G, Li Y, Xiong W, Zeng Z. Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments. *Mol Cancer*. (2021) <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01288-1>
- [92] Cho ES, Kang HE, Kim NH, Yook JI. Therapeutic implications of cancer epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Arch Pharm Res*. (2019) <https://doi.org/10.1007/s12272-018-01108-7>
- [93] Ohar JA, Cheung M, Talarchek J, Howard SE, Howard TD, Hesdorffer M, Peng H, Rauscher FJ, Testa JR. Germline BAP1 Mutational Landscape of Asbestos-Exposed Malignant Mesothelioma Patients with Family History of Cancer. *Cancer Res*. (2016) <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0295>
- [94] *Amianto*. Occupational Safety & Health Administration. (2014) <http://www.osha.gov/Publications/OSHA3507.pdf>
- [95] Carbone M, Adusumilli PS, Alexander HR Jr, Baas P, Bardelli F, Bononi A, Bueno R, Felley-Bosco E, Galateau-Salle F, Jablons D, Mansfield AS, Minaai M, de Perrot M, Pesavento P, Rusch V, Severson DT, Taioli E, Tsao A, Woodard G, Yang H, Zauderer MG, Pass HI. Mesothelioma: Scientific clues for prevention, diagnosis, and therapy. *CA Cancer J Clin*. (2019) <https://doi.org/10.3322/caac.21572>
- [96] Cedres S, Valdivia A, Priano I, Rocha P, Iranzo P, Pardo N, Martinez-Marti A, Felip E. BAP1 Mutations and Pleural Mesothelioma: Genetic Insights, Clinical Implications, and Therapeutic Perspectives. *Cancers* (Basel). (2025) <https://doi.org/10.3390/cancers17091581>
- [97] Carbone M, Minaai M, Kittaneh M, Krausz T, Miettinen MM, Pan Hammarström Q, Hammarström L, Abolhassani H, Pagano I, Xu R, Novelli F, Gaudino G, Pastorino S, Sarin KY, Ripley RT, Pass HI, Schrupp DS, Yang H. Clinical and Pathologic

Phenotyping of Mesotheliomas Developing in Carriers of Germline BAP1 Mutations. *J Thorac Oncol.* (2025) DOI: [10.1016/j.jtho.2025.06.020](https://doi.org/10.1016/j.jtho.2025.06.020)

[98] Zhang M, Luo JL, Sun Q, Harber J, Dawson AG, Nakas A, Busacca S, Sharkey AJ, Waller D, Sheaff MT, Richards C, Wells-Jordan P, Gaba A, Poile C, Baitei EY, Bzura A, Dzialo J, Jama M, Le Quesne J, Bajaj A, Martinson L, Shaw JA, Pritchard C, Kamata T, Kuse N, Brannan L, De Philip Zhang P, Yang H, Griffiths G, Wilson G, Swanton C, Dudbridge F, Hollox EJ, Fennell DA. Clonal architecture in mesothelioma is prognostic and shapes the tumour microenvironment. *Nat Commun.* (2021) <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21798-w>

[99] Carbone M, Flores EG, Emi M, Johnson TA, Tsunoda T, Behner D, Hoffman H, Hesdorffer M, Nasu M, Napolitano A, Powers A, Minaai M, Baumann F, Bryant-Greenwood P, Lauk O, Kirschner MB, Weder W, Opitz I, Pass HI, Gaudino G, Pastorino S, Yang H. Combined Genetic and Genealogic Studies Uncover a Large BAP1 Cancer Syndrome Kindred Tracing Back Nine Generations to a Common Ancestor from the 1700s. *PLoS Genet.* (2015) <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005633>

[100] Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa JR, Gaudino G. BAP1 and cancer. *Nat Rev Cancer.* (2013) <https://doi.org/10.1038/nrc3459>

[101] Singh A, Busacca S, Gaba A, Sheaff M, Poile C, Nakas A, Dzialo J, Bzura A, Dawson AG, Fennell DA, Fry AM. BAP1 loss induces mitotic defects in mesothelioma cells through BRCA1-dependent and independent mechanisms. *Oncogene.* (2023) <https://doi.org/10.1038/s41388-022-02577-3>

[102] Szczepanski AP, Wang L. Emerging multifaceted roles of BAP1 complexes in biological processes. *Cell Death Discov.* (2021) <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00406-2>

[103] Elsayed AM, Kittaneh M, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH. An overview of BAP1 biological functions and current therapeutics. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* (2025) <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2025.189267>

[104] Cheung M, Testa JR. *BAP1*, a tumor suppressor gene driving malignant mesothelioma. *Transl Lung Cancer Res.* (2017) <https://doi.org/10.21037/tlcr.2017.05.03>

- [105] Hino O, Kobayashi T. Mourning Dr. Alfred G. Knudson: the two-hit hypothesis, tumor suppressor genes, and the tuberous sclerosis complex. *Cancer Sci.* (2017) <https://doi.org/10.1111/cas.13116>
- [106] Chial, H. Tumor suppressor (TS) genes and the two-hit hypothesis. (2008)
- [107] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK390611/>
- [108] Napolitano A, Pellegrini L, Dey A, Larson D, Tanji M, Flores EG, Kendrick B, Lapid D, Powers A, Kanodia S, Pastorino S, Pass HI, Dixit V, Yang H, Carbone M. Minimal asbestos exposure in germline BAP1 heterozygous mice is associated with deregulated inflammatory response and increased risk of mesothelioma. *Oncogene.* (2016) <https://doi.org/10.1038/onc.2015.243>
- [109] https://www.ilgazzettino.it/lealtre/tumori_svelato_mecanismo_fa_perdere_funzionalita_bap1_lo_studio_13_luglio-6078249.html
- [110] Carbone M, Emri S, Dogan AU, Steele I, Tuncer M, Pass HI, Baris YI. A mesothelioma epidemic in Cappadocia: scientific developments and unexpected social outcomes. *Nat Rev Cancer.* (2007) <https://doi.org/10.1038/nrc2068>
- [111] Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell.* (2012) <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.07.029>
- [112] Yu H, Pak H, Hammond-Martel I, Ghram M, Rodrigue A, Daou S, Barbour H, Corbeil L, Hébert J, Drobetsky E, Masson JY, Di Noia JM, Affar el B. Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2014) <https://doi.org/10.1073/pnas.1309085110>
- [113] Tyagi S, Chabes AL, Wysocka J, Herr W. E2F activation of S phase promoters via association with HCF-1 and the MLL family of histone H3K4 methyltransferases. *Mol Cell.* (2007) <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.030>
- [114] Eletr ZM, Wilkinson KD. An emerging model for BAP1's role in regulating cell cycle progression. *Cell Biochem Biophys.* (2011)
- [115] Caporali S, Butera A, Amelio I. BAP1 in cancer: epigenetic stability and genome integrity. *Discov Oncol.* (2022) <https://doi.org/10.1007/s12672-022-00579-x>

- [116] Carbone M, Harbour JW, Brugarolas J, Bononi A, Pagano I, Dey A, Krausz T, Pass HI, Yang H, Gaudino G. Biological Mechanisms and Clinical Significance of *BAP1* Mutations in Human Cancer. *Cancer Discov.* (2020) <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-19-1220>
- [117] Bononi A, Giorgi C, Patergnani S, Larson D, Verbruggen K, Tanji M, Pellegrini L, Signorato V, Olivetto F, Pastorino S, Nasu M, Napolitano A, Gaudino G, Morris P, Sakamoto G, Ferris LK, Danese A, Raimondi A, Tacchetti C, Kuchay S, Pass HI, Affar EB, Yang H, Pinton P, Carbone M. BAP1 regulates IP3R3-mediated Ca²⁺ flux to mitochondria suppressing cell transformation. *Nature.* (2017) <https://doi.org/10.1038/nature22359>
- [118] Zhang Y, Shi J, Liu X, Feng L, Gong Z, Koppula P, Sirohi K, Li X, Wei Y, Lee H, Zhuang L, Chen G, Xiao ZD, Hung MC, Chen J, Huang P, Li W, Gan B. BAP1 links metabolic regulation of ferroptosis to tumour suppression. *Nat Cell Biol.* (2018) <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0178-0>
- [119] Dai F, Lee H, Zhang Y, Zhuang L, Yao H, Xi Y, Xiao ZD, You MJ, Li W, Su X, Gan B. BAP1 inhibits the ER stress gene regulatory network and modulates metabolic stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2017) <https://doi.org/10.1073/pnas.1619588114>
- [120] Bononi A, Yang H, Giorgi C, Patergnani S, Pellegrini L, Su M, Xie G, Signorato V, Pastorino S, Morris P, Sakamoto G, Kuchay S, Gaudino G, Pass HI, Napolitano A, Pinton P, Jia W, Carbone M. Germline BAP1 mutations induce a Warburg effect. *Cell Death Differ.* (2017) <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.95>
- [121] Baughman JM, Rose CM, Kolumam G, Webster JD, Wilkerson EM, Merrill AE, Rhoads TW, Noubade R, Katavolos P, Lesch J, Stapleton DS, Rabaglia ME, Schueler KL, Asuncion R, Domeyer M, Zavala-Solorio J, Reich M, DeVoss J, Keller MP, Attie AD, Hebert AS, Westphall MS, Coon JJ, Kirkpatrick DS, Dey A. NeuCode Proteomics Reveals Bap1 Regulation of Metabolism. *Cell Rep.* (2016) <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.016>
- [122] Wu X, Hernandez FV, Wang H, Wang R, Shiffka S, Shah N, Carr SR, Hoang CD, Blakely AM, Lebensohn A, Mishra K, Xi S, Zhang MR, Tolunay T, Gara S, Absher A, Francis D, Rowland A, Connolly M, Jacobs S, Orfgen S, Driscoll K, Ghafoor A, Lu X, Malouf GG, Yang H, Carbone M, Hassan R, Jones E, Miettinen M, Schrupp DS.

Prospective Analysis of Mesotheliomas in Subjects With BAP1 Cancer Syndrome: Clinical Characteristics and Epigenetic Correlates of Disease. *J Thorac Oncol.* (2025)

[123] Bertoli E, De Carlo E, Bortolot M, Stanzione B, Del Conte A, Spina M, Bearz A. Targeted Therapy in Mesotheliomas: Uphill All the Way. *Cancers (Basel).* (2024) <https://doi.org/10.3390/cancers16111971>

[124] Ghafoor A, Hassan R. Somatic BAP1 Loss as a Predictive Biomarker of Overall Survival in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma Treated With Chemotherapy. *J Thorac Oncol.* (2022) <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2022.05.005>

[125] Hajj GNM, Cavarson CH, Pinto CAL, Venturi G, Navarro JR, Lima VCC. Malignant pleural mesothelioma: an update. *J Bras Pneumol.* (2021)

[126] Deiana C, Fabbri F, Tavolari S, Palloni A, Brandi G. Improvements in Systemic Therapies for Advanced Malignant Mesothelioma. *International Journal of Molecular Sciences.* (2023) <https://doi.org/10.3390/ijms241310415>

[127] Kato T, Tanaka I, Huang H, Okado S, Imamura Y, Nomata Y, Takenaka H, Watanabe H, Kawasumi Y, Nakanishi K, Kadomatsu Y, Ueno H, Nakamura S, Mizuno T, Chen-Yoshikawa TF. Molecular Mechanisms of Tumor Progression and Novel Therapeutic and Diagnostic Strategies in Mesothelioma. *Int J Mol Sci.* (2025) <https://doi.org/10.3390/ijms26094299>

[128] Fennell DA, Ewings S, Ottensmeier C, Califano R, Hanna GG, Hill K, Danson S, Steele N, Nye M, Johnson L, Lord J, Middleton C, Szlosarek P, Chan S, Gaba A, Darlison L, Wells-Jordan P, Richards C, Poile C, Lester JF, Griffiths G. CONFIRM trial investigators. Nivolumab versus placebo in patients with relapsed malignant mesothelioma (CONFIRM): a multicentre, double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* (2021) [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(21\)00471-X](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(21)00471-X)

[129] Gray S, Meirson T, Mutti L. Based on the Real-World Results From Australia, Immunotherapy Is Not a Good Option for Patients With Mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology* (2024) <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2024.01.016>

[130] Dietz MV, van Kooten JP, Paats MS, Aerts JGVJ, Verhoef C, Madsen EVE, Dubbink HJ, von der Thüsen JH. Molecular alterations and potential actionable mutations in peritoneal mesothelioma: a scoping review of high-throughput sequencing studies. *ESMO Open.* (2023) <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2023.101600>

[131] Mandelker D, Donoghue M, Talukdar S, Bandlamudi C, Srinivasan P, Vivek M, Jezdic S, Hanson H, Snape K, Kulkarni A, Hawkes L, Douillard JY, Wallace SE, Rial-Sebbag E, Meric-Bersntam F, George A, Chubb D, Loveday C, Ladanyi M, Berger MF, Taylor BS, Turnbull C. Germline-focussed analysis of tumour-only sequencing: recommendations from the ESMO Precision Medicine Working Group. *Ann Oncol.* (2019) <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz136>

[132] Guo M, Wang SM. The BRCAness Landscape of Cancer. *Cells.* (2022) <https://doi.org/10.3390/cells11233877>

[133] Borea F, Franczak MA, Garcia M, Perrino M, Cordua N, Smolenski RT, Peters GJ, Dziadziuszko R, Santoro A, Zucali PA, Giovannetti E. Target Therapy in Malignant Pleural Mesothelioma: Hope or Mirage? *Int J Mol Sci.* (2023) <https://doi.org/10.3390/ijms24119165>