

**ALTERAÇÕES GÊNICAS EM MESOTELIOMAS MALIGNO  
E IMPORTÂNCIA DA PROTEÍNA BAP-1 PARA O  
PROCESSO TUMORAL**

**CAROLINA HARUMI CAVARSON**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente para  
obtenção de Título de Mestre em Ciências**

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Glauca Noeli Maroso Hajj**

**Co-orientador: Dr. Vladmir Cordeiro Cordeiro de Lima**

**São Paulo**

**2021**

## FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente\***

C377a Cavarson, Carolina Harumi.

**Alterações gênicas em mesoteliomas maligno e importância da proteína BAP-para o processo tumoral** / Carolina Harumi Cavarson - São Paulo, 2021.  
87p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Glaucia Noeli Maroso Hajj

Descritores. 1. Asbesto/Asbestos 2. Oncologia Molecular/Molecular Oncoogy.  
3. Diagnóstico Histopatológico/Histopathological Diagnosis.

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

\*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

*“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”*

Carl Sagan

## **SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio financeiro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), através do auxílio a pesquisa, processo nº 88887.308764/2018-00.

Este trabalho recebeu apoio financeiro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Oncogenômica e Inovação Terapêutica (INCiTO-INOTE).

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao A.C.Camargo Cancer Center/Fundação Antônio Prudente, pela oportunidade de fazer parte de um excelente programa de pós graduação.

Ao INCiTO e ao CNPQ pela bolsa e auxílio financeiro para que esta pesquisa fosse possível.

À minha orientadora, Dra. Glauca Hajj por toda a dedicação a este trabalho, pela paciência, confiança e apoio. Sou muito grata pela oportunidade e pelo grande aprendizado nesses anos, que contribuiu para o meu crescimento pessoal e acadêmico.

Ao Dr. Vladimir Cordeiro pela colaboração neste trabalho e pelas discussões enriquecedoras.

À Dra. Vilma Martins e aos demais pesquisadores do grupo, toda colaboração foi importante para que este trabalho fosse desenvolvido.

Ao Dr. Clóvis Antonio Lopes Pinto e a Dra. Stephania Martins Bezerra do departamento de patologia pela colaboração à este projeto.

À equipe do *Core Facility* do A.C.Camargo Cancer Center, em especial ao laboratório de imunohistoquímica e ao Biobanco (Lais, Elô, Keila, Nath, Seven, Rafa, Ana Paula e Louise).

Aos técnicos do laboratório de biologia tumoral e biomarcadores, Julia, Felipe, Danilo e Ederson, por toda a assistência em experimentos, sobretudo pela amizade, companheirismo e ombro amigo.

À Dayane, Amanda, às Paulas (Borzino e Ribeiro), Emne, Pedro, Leticia, Julia e José Gabriel, pela amizade, apoio, cumplicidade, incentivo, ensinamentos e por todas as trocas desde o início deste mestrado, dentro e fora do laboratório. Espero levar vocês por toda a vida, a presença de vocês tornou esse período tão desafiador muito mais leve e alegre.

Aos meus colegas de laboratório, Barbara, Fernandas (Lupinacci e Ferreira), Julia, Denise, Dimas, Ariane, Ethiene, Alexcia pelos ensinamentos, parcerias e apoio.

À todos os funcionários do CIPE e da Pós graduação, em especial à Luciana Pitombeira e a Virgínia, que me acolheram quando mais precisei e estão sempre dispostas a ajudar todos os alunos e com certeza fazem muito mais do que “apenas” seu trabalho.

À todos pesquisadores do programa de pós graduação do A.C.Camargo, pelas aulas, ensinamentos, e treinamentos.

À todos meus professores do curso de Biotecnologia, da UFGD, sem os quais minha formação com certeza não seria a mesma. Em especial à Prof. Dra. Claudia Damiani e Prof. Dra. Lilian Cândido.

Ao meu psiquiatra, Dr. Allan Santos, que sempre me incentivou e acreditou em mim quando nem eu acreditei.

À todos meus amigos, sejam de Dourados, de São Paulo, ou do Mundo! Por me fazerem bem, me apoiarem e sempre demonstrar orgulho de mim.

E por último, mas não menos importante, à minha Mãe, Emília, e meus avós (ditchan e batchan), por me permitir realizar o sonho de uma pós graduação em uma instituição renomada em outra cidade, e estado. Pelos sacrifícios, pelo apoio financeiro e emocional, pelas incontáveis ligações, vídeo chamadas, conversas de *whatsapp*, e encomendas pelo *ifood*. Sem vocês nada disso teria sido possível. Vocês são a minha vida! Obrigada por sonharem comigo e tornar tudo isso realidade!

## RESUMO

Cavarson CH. **Alterações gênicas em mesoteliomas maligno e importância da proteína BAP-1 para o processo tumoral.** [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

O asbesto apresenta grande utilidade comercial, no entanto, é o mais importante carcinógeno ocupacional. O mesotelioma maligno é o tumor mais frequente causado pela exposição ao asbesto, porém devido ao tempo de latência entre a exposição e o desenvolvimento da doença pode chegar a 30 anos, o desenvolvimento de políticas de prevenção é muito difícil. Além disso, as dificuldades de diagnóstico e ausência de terapias específicas, fazem com que este tumor tenha altas taxas de mortalidade, com sobrevida estimada em 8 meses. Estima-se que o Brasil ainda deverá observar um aumento na incidência deste tipo de tumor, resultado das décadas de exposição de trabalhadores da indústria do asbesto. Portanto, compreender os mecanismos moleculares associados ao mesotelioma maligno é fundamental para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas e de diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil epidemiológico dos pacientes acometidos com mesotelioma maligno atendidos na instituição, caracterizar a via de sinalização PI3K/AKT/mtor, assim como identificar as alterações gênicas em amostras de mesotelioma disponíveis. O perfil epidemiológico encontrado do portador de mesotelioma pleural maligno é: homem, ECOG1, diagnosticado entre 65-74 anos, sem exposição ao asbesto, de estágio IV, tabagista, com tumor epitelióide, tratados com cirurgia e quimioterapia, sem histórico familiar de cancer, e com histórico pessoal de neoplasia, com progressão local e recidiva da doença. Enquanto o perfil do portador de mesotelioma peritoneal maligno é: mulher, ECOG 1, diagnosticado entre 21 e 44 anos, sem exposição ao asbesto, estágio IV, não fumante, não etilista, apresentando tumor de histologia epitelióide, tratado com quimioterapia, sem histórico familiar de câncer, sem progressão da doença e sem recidiva, e com histórico de neoplasia anterior. A partir dos dados clínicos encontramos: indicativos de predominância de síndrome hereditária, relação entre expressão de BAP-1 e sobrevida global, expressão de BAP-1 e histologia dos tumores, e ausência de correlação entre a expressão de BAP-1 e a topografia do tumor. Foram coletados fragmentos de espécimes cirúrgicos de tumor de 5 pacientes para o

estabelecimento de linhagens celulares. As células tumorais cultivadas apresentaram preservação de marcadores de mesotelioma como citoqueratina AE1/AE3, podoplanina e WT-1; e ativação das vias PI3K/AKT/mTOR. Destes 5 casos de mesotelioma maligno, conseguimos estabelecer com sucesso 3 linhagens celulares humana e 2 linhagens de xenoenxerto murinho. A partir do sequenciamento destas 3 linhagens encontramos 1220 alterações gênicas, dentre elas 81 inéditas e de potencialmente maligno. Encontramos também 11 alterações correspondentes com as 20 mais encontradas em mesotelioma maligno de acordo com o *The Cancer Genome Atlas* TCGA. Entretanto, apenas uma alteração em *BAP1* foi identificada. Os resultados deste trabalho permitirão realizar futuros ensaios funcionais *in vivo* e *in vitro* para elucidar os mecanismos envolvidos no processo tumoral do mesotelioma maligno.

**Descritores:** Asbesto; Oncologia Molecular; Diagnóstico Histopatológico.



## ABSTRACT

Cavarson CH. **[Genetic alterations in malignant mesotheliomas and the importance of BAP-1 protein for the tumoral process]**. [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

The asbestos has great commercial utility. However, they are the most important occupational carcinogens. The malignant mesothelioma is the most common tumor caused by asbestos' exposure, however due to the latency time between exposure and the development of the disease can take up to 30 years, the development of prevention policies is very difficult. In addition, the difficulties of diagnosis and the absence of specific therapies, cause this tumor to have high mortality rates, with an estimated survival of 8 months. It is estimated that Brazil will still see an increase in the incidence of this type of tumor, as the result of decades of exposure of workers in the asbestos industry. Therefore, understanding the molecular mechanisms associated with malignant mesothelioma is essential for the development of new therapeutic and diagnostic strategies. The objective of this work was to characterize the epidemiological profile of patients affected with malignant mesothelioma treated at the institution, to characterize the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, as well as to identify the genetic alterations in available mesothelioma samples. The epidemiological profile found malignant pleural mesothelioma patients is: male, ECOG1, diagnosed between 65-74 years old, without exposure to asbestos, stage IV, smoker, with epithelioid tumor, treated with surgery and chemotherapy, without family history of cancer, and with a personal history of neoplasia, with local progression and disease recurrence. While the profile of malignant peritoneal mesothelioma patient is: woman, ECOG 1, diagnosed between 21 and 44 years old, without exposure to asbestos, stage IV, non-smoker, non-alcoholic, presenting epithelioid histology tumor, treated with chemotherapy, without family history of cancer, without progression of the disease and without recurrence, and with a history of previous neoplasia. From the clinical data we found: indicative of predominance of hereditary syndrome, relationship between BAP-1 expression and overall survival, BAP-1 expression and tumor histology, and absence of correlation between BAP-1 expression and the topography of the tumor in our cohort. Fragments of surgical specimens of tumor were

collected from 5 patients for the establishment of cell lines. Cultured tumor cells showed preservation of mesothelioma markers such as cytokeratin AE1/AE3, podoplanin and WT-1; and activation of PI3K/AKT/mTOR pathway. Among these 5 cases of malignant mesothelioma, we were able to successfully establish 3 human cell lines and 2 murine xenograft lines. From the sequencing of these 3 lines we found 1220 gene alterations, 81 of them were unpublished and potentially malignant. We also found 11 changes corresponding to the 20 most commonly found in malignant mesothelioma according to the TCGA. However, only one change in *BAP1* was identified. The results of this study will allow future tests *in vivo* and *in vitro* to elucidate the components involved in the malignant mesothelioma tumor process.

**Keywords:** Asbestos; Molecular Oncology; Histopathological Diagnosis

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Alterações genéticas no mesotelioma pleural maligno.....	7
<b>Figura 2</b>	Sinalização intracelular através da via PI3K/AKT/mTOR.....	8
<b>Figura 3</b>	Fosforilação de rpS6 através da via de sinalização PI3K/ATK/mTORC1 .....	9
<b>Figura 4</b>	Genes e proteínas envolvidos no desenvolvimento de mesotelioma maligno .....	10
<b>Figura 5</b>	Fluxograma demonstrativo do estudo retrospectivo .....	16
<b>Figura 6</b>	Fluxograma demonstrativo do estudo prospectivo.....	17
<b>Figura 7</b>	Visão geral do fluxo de trabalho XenofilterR .....	25
<b>Figura 8</b>	Distribuição do tipo histológico de mesotelioma maligno encontrado neste estudo .....	29
<b>Figura 9</b>	Gráfico de sobrevida global tipo por topografia.....	32
<b>Figura 10</b>	Gráfico de sobrevida global por tipo histológico .....	33
<b>Figura 11</b>	Gráfico de sobrevida global de pacientes portadores por estadiamento ....	34
<b>Figura 12</b>	Imagem ilustrativa de expressão nuclear de BAP-1 .....	35
<b>Figura 13</b>	Imagem ilustrativa de perda de expressão nuclear de BAP-1 .....	35
<b>Figura 14</b>	Sobrevida Global em meses de acordo com o resultado da avaliação de BAP-1.....	37

<b>Figura 15</b>	Ilustração da padronagem papilífera em mesotelioma maligno de histologia epitelióide com expressão preservada de BAP-1.....	38
<b>Figura 16</b>	Fragmentos de peças cirúrgicas em diferentes estágios de adesão à placa de cultura.....	39
<b>Figura 17</b>	Células de cultura primária de mesotelioma maligno pleural epitelióide coradas com hematoxilina .....	39
<b>Figura 18</b>	Reações IHC em tecido humano e PDX.....	40
<b>Figura 19</b>	<i>Western Blot</i> das células de mesotelioma caso 1 (PDX).....	42
<b>Figura 20</b>	<i>Western Blot</i> das células de mesotelioma caso 2.....	43
<b>Figura 21</b>	<i>Western Blot</i> do extrato celular das células de mesotelioma caso 5 .....	44
<b>Figura 22</b>	<i>Western Blot</i> de extratos celulares de todos os casos de mesotelioma maligno em cultura .....	45
<b>Figura 23</b>	Número de mutações totais por caso versus que atendem aos critérios ....	46
<b>Figura 24</b>	Distribuição dos genes frequentemente alterados em casos de mesotelioma disponíveis no TCGA .....	47
<b>Figura 25</b>	Número total de mutações por gene (somatória dos três casos) encontrados neste trabalho em relação aos 20 genes mais frequentemente alterados de acordo com TCGA.....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Revisão das principais descobertas gênicas sobre mesotelioma maligno disponíveis na literatura.....	5
<b>Tabela 2</b>	Biomarcadores utilizados no diagnóstico diferencial do Mesotelioma Maligno .....	12
<b>Tabela 3</b>	Anticorpos e condições utilizadas nas reações de confirmação do diagnóstico imunohistopatológico realizadas no Ventana em amostras fixadas em blocos de parafina .....	21
<b>Tabela 4</b>	Anticorpos utilizados nos ensaios de westen blot, número de catálogo, diluições e espécie fonte.....	24
<b>Tabela 5</b>	Resultado da coleta de dados epidemiológicos em pacientes portadores de mesotelioma maligno atendidos no A.C.Camargo Cancer Center.....	31
<b>Tabela 6</b>	Tempo médio e máximo de sobrevida global (em dias) segmentado por tipo histológico do tumor .....	33
<b>Tabela 7</b>	Resultado da coleta de dados imunohistoquímicos em pacientes portadores de mesotelioma maligno atendidos no A.C.Camargo Cancer Center.....	36
<b>Tabela 8</b>	Relação entre dados clínicos e expressão da proteína BAP-1 .....	37
<b>Tabela 9</b>	Alterações gênicas encontradas por sequenciamento do caso 1 que se enquadravam nos critérios de inclusão .....	48
<b>Tabela 10</b>	Alterações gênicas encontradas por sequenciamento do caso 2 que se enquadravam nos critérios de inclusão .....	52
<b>Tabela 11</b>	Alterações gênicas encontradas por sequenciamento do caso 5 que se enquadravam nos critérios de inclusão .....	53

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>BAP1</b>	Gene codificador da proteína-1 associada ao BRCA1
<b>BAP-1</b>	Proteína-1 associada ao BRCA1
<b>CDK</b>	Quinase dependente de ciclina
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>CGH</b>	Comparative genomic hybridization
<b>CK5/6</b>	Citoqueratina 5 e 6
<b>COSMIC</b>	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>ECOG</b>	<i>Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status</i>
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FISH</b>	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
<b>GATK</b>	<i>Genome Analysis Tool Kit</i>
<b>HIPEC</b>	Quimioterapia intraperitoneal hipertérmica
<b>IARC</b>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
<b>IHC</b>	Imunohistoquímica
<b>Inserm</b>	<i>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale</i>
<b>NCCN</b>	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PDX</b>	<i>Patient derived xenograft</i>
<b>PET</b>	Tomografia por emissão de pósitrons
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>RT-PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction - Reverse Transcriptase</i>
<b>SEER</b>	<i>Survival Epidemiology and End Results</i>
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SNV</b>	Single nucleotide variant
<b>SSCP</b>	Sums of Squares and Cross Products
<b>TCGA</b>	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
<b>TMA</b>	<i>Tissue Microarray</i>
<b>WT1</b>	Proteína tumoral de Wilms

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	O Mesotelioma Maligno .....	1
1.2	A Relação entre Asbesto e o Mesotelioma Maligno .....	3
1.3	Alterações Gênicas no Mesotelioma Maligno .....	4
1.4	O Papel do Gene BAP1 no Mesotelioma Maligno .....	11
1.5	Biomarcadores para o Mesotelioma Maligno .....	11
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1	Objetivo Geral .....	15
2.2	Objetivos Específicos .....	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>16</b>
3.1	Construção da Coorte .....	17
3.1.1	Casuística .....	17
3.1.2	Critérios de inclusão .....	18
3.1.3	Critérios de exclusão.....	18
3.2	Avaliação Histopatológica e Caracterização da Amostra .....	18
3.3	Técnica de Tissue Microarray (TMA) .....	19
3.4	Confirmação Imunohistoquímica .....	19
3.5	Geração de Cultivo de Modelos Celulares de Mesotelioma .....	21
3.6	Estudo de Vias de Sinalização .....	22
3.7	Sequenciamento de Amostras e Análise de Sequenciamento .....	24
3.8	Análise Estatística .....	27
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>28</b>
4.1	Construção de Coorte e Avaliação Clínica e Epidemiológica.....	28
4.1.1	Avaliar a perda de expressão da proteína BAP-1 no TMA e outros biomarcadores	34
4.1.2	Sequenciamento das amostras.....	45

<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>59</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>61</b>

## **ANEXO**

**Anexo 1** Artigo submetido



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O MESOTELIOMA MALIGNO

O mesotelioma maligno é um tumor considerado raro, com prevalência inferior a 1 em 20 milhões de indivíduos, que afeta superfícies serosas, como a pleura (cerca de 80% dos casos), peritônio (11% dos casos) e menos comumente o pericárdio e a túnica vaginalis <sup>1</sup>. Apesar de sua raridade, seu impacto socioeconômico é dado pela associação causal entre exposição intermitente e progressiva a compostos derivados de fibras amiantoides, como asbesto, com desenvolvimento tardio da doença em 80% dos casos após período latente de 20 a 40 anos <sup>2,3</sup>. Os dados epidemiológicos da base de dados *Survival Epidemiology and End Results-SEER* estimam cerca de 3000 casos novos diagnosticados por ano nos Estados Unidos, afetando predominantemente homens acima de 65 anos, correspondente a 0,1% dos óbitos nos Estados Unidos da América-EUA <sup>4</sup>. No Brasil, assim como em outros países em desenvolvimento, estima-se subnotificação da doença, com 3718 óbitos relatados entre 1980 a 2010 <sup>2</sup>. Em vista de seu período de latência e do auge da produção de amianto na década de 1980 no Brasil, estimam-se picos de incidência nas próximas duas décadas. O mesotelioma peritoneal maligno é responsável por aproximadamente entre 10-30% de todos os casos de mesotelioma maligno em todo o mundo <sup>5</sup>. A mediana de idade ao diagnóstico em comparação ao mesotelioma pleural maligno é de 63 *versus* 71 anos, além de apresentar uma associação menor com a exposição ao asbesto de 33-50% quando comparado ao pleural que apresenta aproximadamente 80% de associação <sup>5</sup>.

O mesotelioma maligno é também um dos cânceres mais letais, em parte devido a uma alta dificuldade diagnóstica, que se dá pela demora da ocorrência da manifestação de sintomas (podendo levar até 30 anos) e presença de sintomas não específicos como tosse seca, dispneia, dor torácica, fraqueza e emagrecimento. Em virtude do seu difícil diagnóstico, é necessária a realização de exames de imagem como tomografia computadorizada, tomografia por emissão de pósitrons -PET- e ressonância magnética de imagem.

Adicionalmente, outras análises histopatológicas podem ser feitas para confirmar o diagnóstico. A Organização Mundial de Saúde-OMS consolidou em 2015 a existência de três

padrões histológicos em mesotelioma maligno: epitelial, sarcomatoso e bifásico (ou misto). Esta determinação histológica pode auxiliar no diagnóstico diferencial do paciente, assim como na seleção de marcadores apropriados. Os mesoteliomas malignos epiteliais são compostos por células poligonais, ovais ou cuboides e são o tipo mais frequente, os sarcomatosos apresentam células fusiformes e os bifásicos apresentam ambas morfologias celulares no mesmo sítio tumoral. Após o diagnóstico, o paciente apresenta sobrevida mediana de aproximadamente 8 a 12 meses <sup>6</sup>.

O mesotelioma possui alto grau de malignidade, apresentando invasão local de partes moles e pode derivar metástases para os pulmões, fígado, pâncreas, rins, glândulas suprarrenais e medula óssea <sup>7</sup>. Os tipos de tratamentos e terapias a serem utilizadas depende de fatores como estágio tumoral, se o mesmo é ressecável ou não (remoção cirúrgica de células tumorais), e as condições físicas gerais do paciente. O tratamento pode envolver ressecção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia. Recentemente também foi incorporado no tratamento do mesotelioma maligno, a imunoterapia com associação de agentes anti-PD-L1 e anti-CTLA4.

No mesotelioma peritoneal maligno, a prevalência entre homens e mulheres é a mesma, com faixa etária mais recorrente em jovens, e estima-se que a cada ano 400 novos casos são diagnosticados nos Estados Unidos <sup>8</sup>. Como não existem sintomas clínicos específicos para o mesotelioma peritoneal maligno <sup>9</sup>, os pacientes geralmente apresentam sintomas vagos e inespecíficos que incluem distensão abdominal, dor e perda de peso. Assim o diagnóstico é frequentemente feito de forma tardia e o prognóstico geralmente é ruim (10 a 12 meses) <sup>10</sup>. Ainda de acordo com Lin et al. <sup>9</sup>, muitos casos permanecem assintomáticos até que o tumor preencha a cavidade abdominal. Outro fator agravante para o diagnóstico diferencial entre mesotelioma peritoneal e outros tumores peritoneais é a similaridade clínica, padrões de imagem e aparência histológica. No Brasil, é esperado um aumento na incidência de mesotelioma maligno na próxima década e sabendo que o seu prognóstico é limitado torna-se essencial a ampliação do conhecimento dos mecanismos moleculares associados a esta patologia e a busca por novas abordagens terapêuticas.

Segundo as diretrizes do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), os tratamentos de primeira linha incluem imunoterapia e drogas a base de platina em associação com pemetrexede ou gemcitabina. Pacientes com estadiamento I a III, com bom ECOG (a escala de desempenho ECOG descreve o nível de funcionamento de um paciente

em termos de sua capacidade de cuidar de si mesmo, atividade diária e capacidade física como caminhar, trabalhar, etc) e que possuem tumor ressecável, são candidatos à terapia multimodal <sup>11</sup>. Nas últimas quatro décadas foi visto um aumento no tempo médio de sobrevida <sup>12</sup>, entretanto, a eficácia dos tratamentos disponíveis ainda é limitada devido ao diagnóstico tardio da doença, levando a um prognóstico desfavorável. Entre os fatores utilizados para determinar o prognóstico do paciente estão os achados clínicos, hematológicos, patológicos, moleculares e de imagem <sup>13</sup>.

A taxa de sobrevivência de cinco anos para pacientes com mesotelioma maligno é de aproximadamente 12%. Cerca de 40% dos pacientes com a doença sobrevivem pelo menos um ano após o diagnóstico. A taxa de sobrevivência de um ano é de aproximadamente 73% para mesotelioma pleural e 92% para mesotelioma peritoneal <sup>14</sup>.

## **1.2 A RELAÇÃO ENTRE ASBESTO E O MESOTELIOMA MALIGNO**

Asbesto é o nome designado para um grupo de minerais silicatos fibrosos muito utilizados na construção civil e outros setores industriais devido ao seu baixo valor relativo de mercado, e suas propriedades físico-químicas. Podemos classificar o asbesto nos seguintes grupos: serpentina (crisotila - amianto branco), anfibólios (amosita, actinolita - amianto marrom), e antofilita, crocidolita e tremolita (amianto azul) <sup>15</sup>. De acordo com Koller et al. <sup>6</sup>, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de amianto, utilizando 40% de sua produção no mercado interno. A extração do amianto ocorre em minas a céu aberto e expõe anualmente milhões de trabalhadores ao contato com suas partículas.

O asbesto é composto por fibras microscópicas que podem facilmente ser inaladas e ficam retidas nos tecidos pulmonares e outras regiões do trato respiratório. A associação entre exposição ao asbesto e o surgimento do mesotelioma foi caracterizada em 1960 e levou ao início da regulação do uso do mineral <sup>16</sup>. Foi comprovado ainda que a exposição ao asbesto pode causar inflamações agudas que levam ao desenvolvimento de pneumotórax, efusão pleural, verrugas ou asbestose. Além de situações agudas, a exposição crônica ao asbesto está relacionada com o desenvolvimento de neoplasias pulmonares e das camadas pleurais (mesotélio e submesotélio), sendo considerado pelo IARC um carcinógeno do tipo 1, isto é, com evidências suficientes de carcinogenicidade em humanos e em modelos animais (mesothelioma awareness center) <sup>17,18</sup>.

O asbesto são minerais pouco solúveis tanto na natureza quanto no corpo humano. Os fatores determinantes de toxicidade são o formato e tamanho das fibras, a composição das superfícies de contato e a biopersistência (tempo de permanência das fibras nos pulmões); a estrutura do mineral, sua composição química, origem e associação de outros minerais; assim como contaminantes, moduladores químicos de superfície; e transformação, translocação e solubilidade das fibras nos fluidos humanos influencia a biopersistência do asbesto: um fator que modula a exposição cumulativa <sup>17</sup>.

### 1.3 ALTERAÇÕES GÊNICAS NO MESOTELIOMA MALIGNO

A compreensão dos mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento do mesotelioma foi impulsionada pelo descobrimento de alterações gênicas frequentes nesse tipo tumoral <sup>19-21</sup>. Segundo Quetel et al. <sup>22</sup>, os 22 genes com maior frequência de alterações em mesotelioma pleurais malignos são: *BAP1*, *NF2*, promotor de *TERT*, *TP53*, *SETD2*, *LATS2*, *ARID2*, *CTNNB1*, *CDKN2A*, *ARID1A*, *TERT*, *INP4B*, *KMT2D*, *BRAF*, *NRAS*, *CUL1*, *KRAS*, *EGFR*, *SMARCA4*, *CDK2NB*, *RBFOX1* e *HRAS* (Figura 1). Entre os supressores de tumor mais frequentemente alterados estão os inibidores de *CDKs* (quinase dependente de ciclina), *CDKN2A* (inibidor de quinase dependente de ciclina 2A) *BAP1* (proteína-1 associada ao *BRCA1*) e *NF2* (neurofibromina 2) <sup>19,23,24</sup>. A perda de *CDKN2A* está associada a histologia não epitelióide <sup>25</sup> e conseqüentemente, a uma pior sobrevida <sup>26-28</sup> (Tabela 1). Em modelos animais, a co-deleção de *CDKN2A* e *NF2* promove o surgimento de mais tumores e é um marcador de pior prognóstico, em comparação com a co-deleção de *NF2* e *TP53* <sup>29</sup>. Aproximadamente 20% a 40% dos mesoteliomas possuem deleções ou mutações do gene supressor tumoral *BAP1* <sup>19,30,31</sup> e, interessante, a mutação germinativa de *BAP1* confere ao indivíduo maior risco de desenvolver o mesotelioma <sup>32</sup>. Em modelos murinos, a inativação de um único alelo de *BAP1* aumenta a tumorigenicidade do amianto <sup>32</sup>.

**Tabela 1** - Revisão das principais descobertas gênicas sobre mesotelioma maligno disponíveis na literatura.

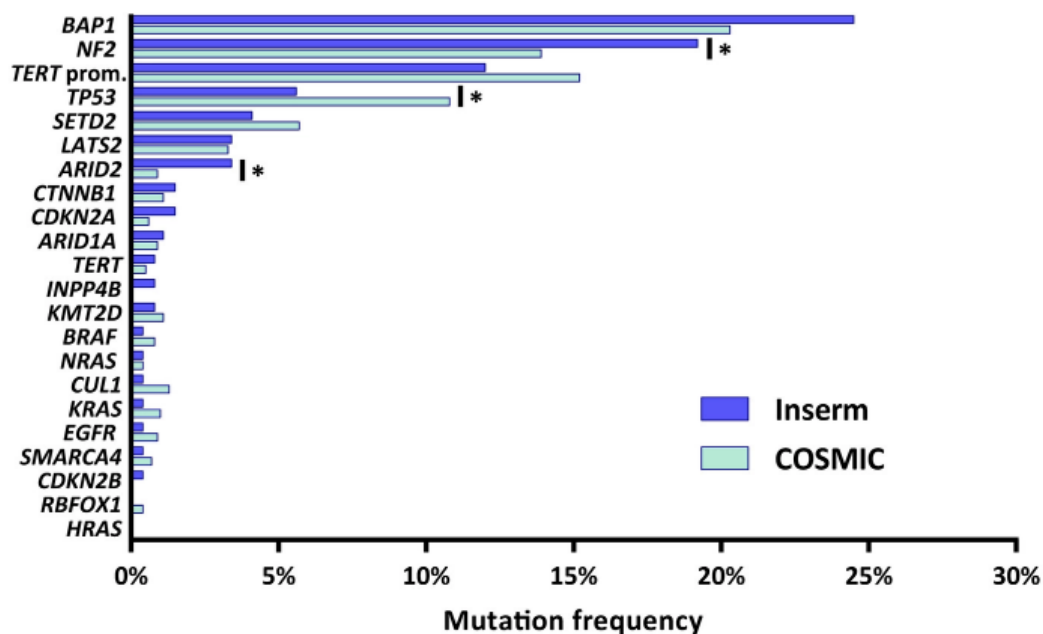
Referência	Número de casos	Técnicas utilizadas	Principais descobertas
Cheng et al. 1994	40 linhagens celulares e 23 tumores primários de 42 pacientes.	PCR; Southern e Northern Blot; Sequenciamento.	Ocorrência de deleções homozigotas em p16 e outros loci em 9p21-22.
Xio et al. 1995	50 casos de Mesoteliomas Primários.	FISH.	Deleção total de p15 e p16 com ausência de deleção citogenética do braço curto do cromossomo 9.
Sekido Y. et al. 1995	75 casos de câncer de pulmão e 17 de mesoteliomas	PCR; SSCP; Southern e Northern Blot	Deleção do gene <i>NF2</i> .
Kratzke et al. 1995	12 mesoteliomas torácicos e 15 linhagens celulares de mesotelioma	Imunohistoquímica; Western Blot	A inativação de <i>CDKN2</i> .
Bianchi et al. 1995	15 linhagens celulares de mesoteliomas	PCR; SSCP; sequenciamento.	Relação de <i>NF2</i> na oncogênese de mesotelioma malignos através do cromossomo 22.
Bjorkqvist et al. 1998	34 mesoteliomas malignos.	Extração de DNA; análise de CGH; Southern Blot	Alteração de número de cópias entre mesotelioma e câncer de pulmão.
Prins et al. 1998	12 linhagens celulares de mesoteliomas malignos.	PCR; FISH	Deleções do cromossomo 9, incluindo <i>CDKN2A</i> mas não <i>CDKN2B</i> .
Taniguchi et al. 2006.	17 tumores primários e 9 linhagens celulares de mesotelioma	Análise de CGH; Southern Blot; PCR em tempo real; Sequenciamento; Mapeamento de deleção.	Regiões com ganhos em mais de 20% dos pacientes foram 1q, 5p, 7p, 8q24 e 20p; Com perdas de regiões foram 1p36.33, 1p36.1, 1p21.3, 3p21.3, 4q22, 4q34-qter, 6q25, 9p21.3, 10p, 13q33.2, 14q32.13, 18q e22q.
Takeda et al. 2010	40 casos de mesoteliomas malignos, 12 lesões mesoteliais benignas e 13 pleurites.	Imunohistoquímica; FISH	Deleção do 9p21 como marcador para distinguir mesotelioma maligno do mesotelioma benigno e da proliferação mesotelial reativa.
Bott et al. 2011	53 Mesoteliomas Malignos Pleurais	FISH; Imunohistoquímica; Sequenciamento; RT-PCR; Imunofluorescência; análise de AMC ubiquitina;	Ligases de ubiquitinas e hidrolases de ubiquitinas.
Guo et al. 2015	22 tumores (3 bifásicos; 1 sarcomatóide e 18 epiteliais)	Sequenciamento; mapeamento e análise de cópia numérica.	Genes com maiores alterações no número de cópias: <i>BAP1</i> , <i>NF2</i> , <i>CDKN2A</i> e <i>CUL1</i> .

Cont/ Tabela 1

Referência	Número de casos	Técnicas utilizadas	Principais descobertas
Kato et al. 2016	42 casos de mesoteliomas	Extração de DNA; Sequenciamento; teste de fisher	Alterações mais comuns foram em <i>BAP1</i> (47,6%), <i>NF2</i> (38,1%) e <i>CDKN2A/B</i> (35,7%).
Ugurluer et al. 2016	11 casos de mesotelioma	Sequenciamento de próxima geração	Os genes <i>BAP1</i> , <i>CDKN2A/B</i> e <i>NF2</i> são os mutados com mais frequência.
Chirac et al. 2016	35 amostras de mesoteliomas pleurais congelados (29 epiteliais; 2 sarcomatóides e 4 bifásicos)	Extração de DNA; análise de CGH; hibridização <i>in situ</i>	Perda de regiões cromossômicas 3p21, 9p21 e 22q12; e alteração de cópias numéricas em 15q26.2 e 8p11.22.
Kim et al. 2017	13 Mesoteliomas malignos; 8 Mesoteliomas Benignos; 6 mesoteliomas peritoniais bem diferenciado; 16 tumores adenomatoides 12 carcinomas de ovário	Extração de DNA; Sequenciamento de próxima geração; imunohistoquímica	A alteração mais frequente são as inativações bi alélicas de outros genes mutados com frequência foram <i>NF2</i> ; <i>SETD2</i> e <i>DDX3X</i> .
Zangh et al. 2018	Estudo de caso de 1 paciente.	Sequenciamento	Amplificação de cópia numérica nos cromossomos 1 e 12. Mutações em genes <i>KIF25</i> , <i>AHNAK</i> e <i>PRDM2</i> .
Hmeljak et al. 2018	74 tumores primários	Sequenciamento exomal, análise de variação de cópia numérica	Alterações inativadas por mutações e alteração de cópia numérica em <i>BAP1</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>NF2</i> , <i>TP53</i> , <i>LATS2</i> e <i>SETD2</i> . Novo subtipo molecular em 3% dos casos: mutações específicas em <i>TP53</i> e <i>SETDB1</i> .
Hassan et al. 2019	239 DNAs genômicos de portadores de mesotelioma maligno	Sequenciamento de nova geração em 73 genes	Mutações germinativas em 12% dos casos em: <i>BAP1</i> , <i>CHEK2</i> , <i>PALB2</i> , <i>BRCA2</i> , <i>MLH1</i> , <i>POT1</i> , <i>TP53</i> e <i>MRE11A</i> . Deleção de <i>CDKN2A</i> em 60% dos tumores; <i>BAP1</i> mutado ou deletado em 54%; amplificação de <i>RASSF7</i> em 33%; deleção ou alteração de <i>RB1</i> em 26%; <i>NF2</i> mutado em 20%; <i>TP53</i> mutado em 8%; <i>SETD2</i> alterado em 6%; <i>DDX3X</i> em 5% e <i>LATS2</i> em 5%.
Nastase et al. 2020	121 tumores primários	Sequenciamento exomal, análise de variação de cópia numérica	Mutações em <i>TP53</i> , <i>NF2</i> e na região promotora <i>TERT</i> são associados a um pior prognóstico.
Quetel et al. 2020	266 tumores primários	Sequenciamento de nova geração em 21 genes	

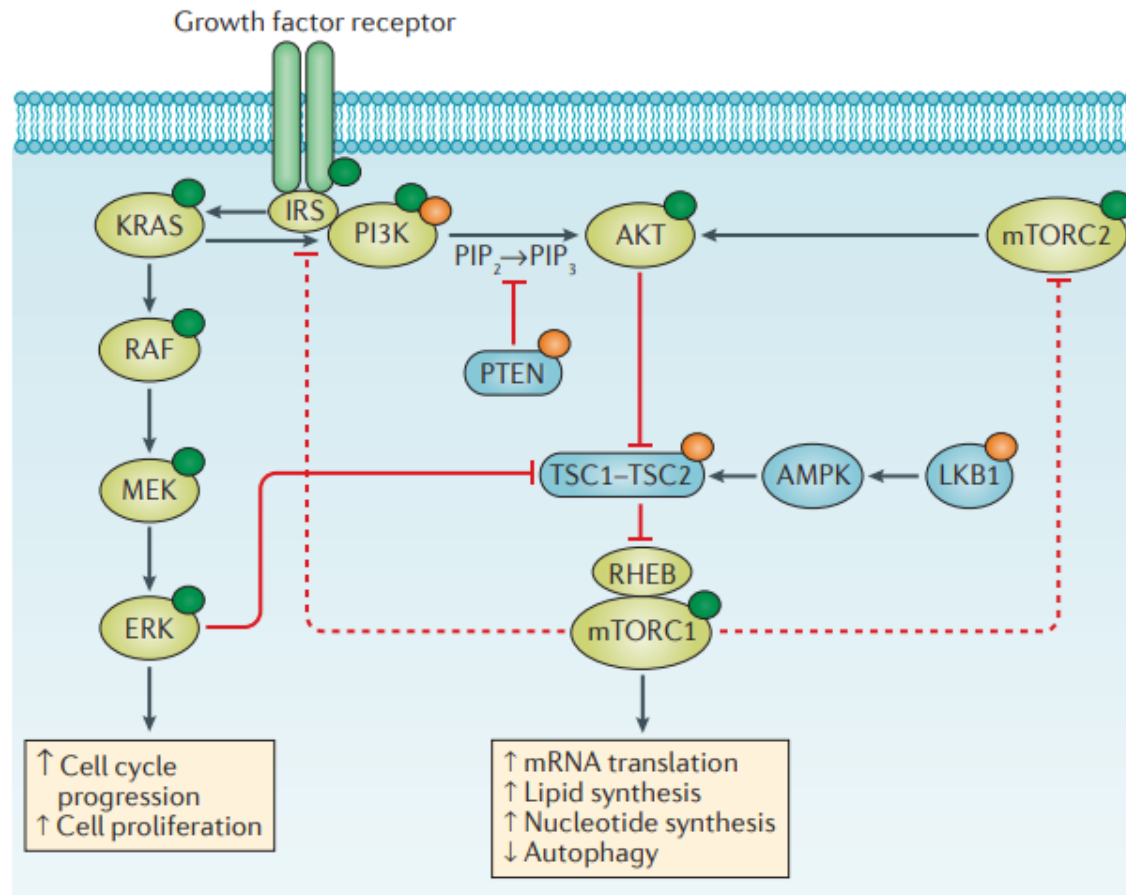
PCR - Polimerase Chain Reaction; SSCP - Single-strand conformational polymorphism; CGH - Comparative genomic hybridization; FISH - Fluorescence in situ hybridization; RT-PCR - Reverse transcriptase Polimerase Chain Reaction

Em termos de vias de sinalização alteradas, as células mesoteliais malignas, assim como outras células tumorais, apresentam superativação de vias como Ras/ERK1/2 e PI3K-AKT-mTOR<sup>33</sup> (Figura 2). A fosforilação de uma proteína pode muitas vezes significar que ela se encontra ativada. A ativação da via PI3K/AKT/mTOR acontece por diferentes mecanismos como pela amplificação de genes codificadores dos componentes da via, ou perda de *PTEN*. A via PI3K também pode ser ativada por alterações gênicas e/ou amplificação upstream das RTKs, e possivelmente por Ras mutado. O mecanismo da ativação de PI3K em um câncer sugere seu uso como alvo terapêutico para diminuir o crescimento tumoral<sup>34</sup>. Uma outra maneira pela qual os fatores de crescimento e mitógenos promovem o crescimento e a proliferação celular é pela *upregulation* da tradução do mRNA<sup>35,36</sup>. Estes fatores induzem a ativação da p70 S6 quinase e a subsequente fosforilação da proteína ribossomal S6. A fosforilação desta proteína está correlacionada com um aumento na transcrição de mRNA. Esses transcritos de mRNA codificam proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular, bem como proteínas ribossômicas e fatores de transcrição<sup>36,37</sup>. Os importantes sítios de fosforilação da rpS6 incluem vários resíduos (Figura 3) (Ser235, Ser236, Ser240 e Ser244) localizados dentro de uma pequena região carboxi-terminal da proteína S6<sup>38,39</sup>.



Fonte: Quetel et al.<sup>22</sup>

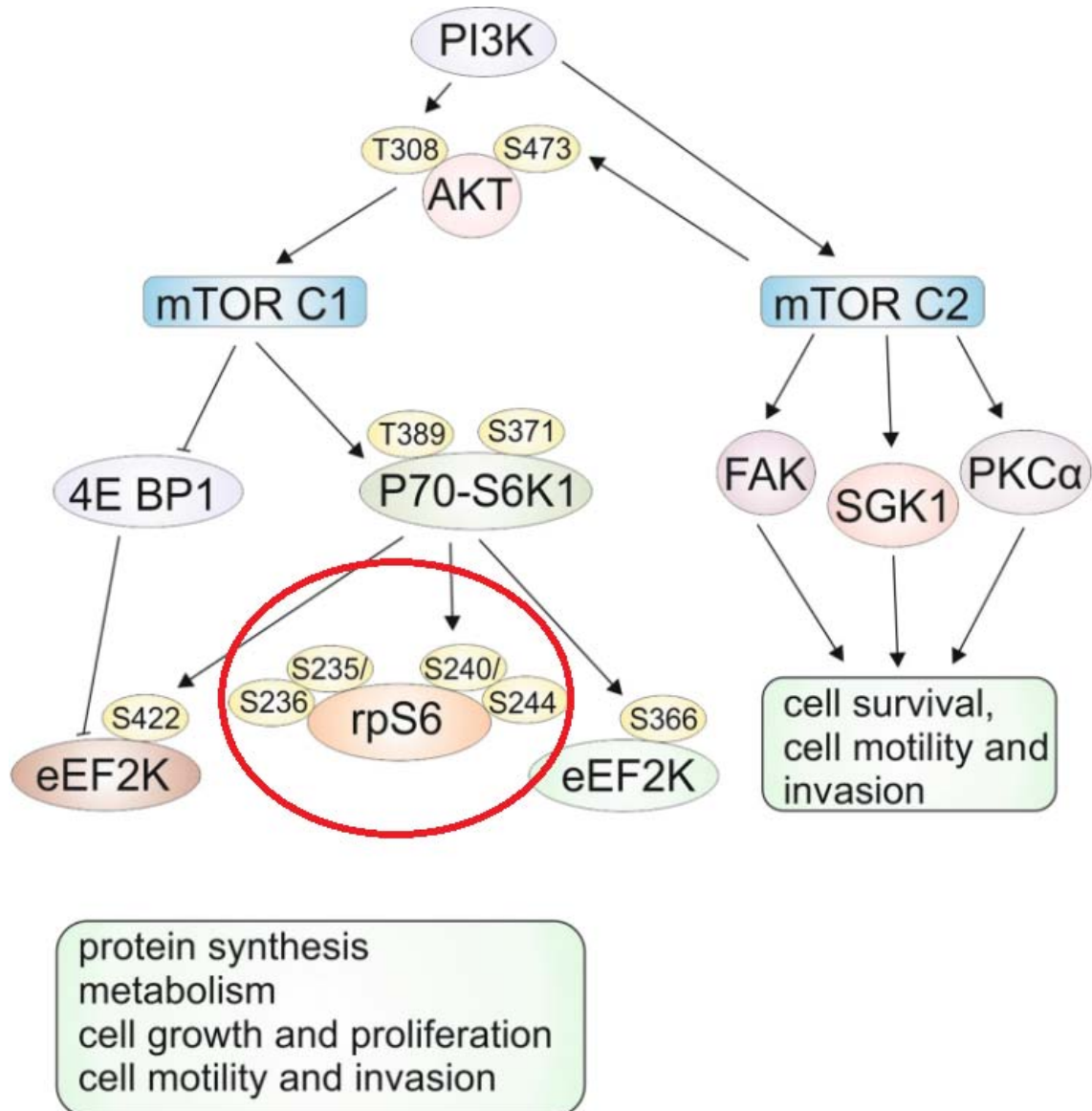
**Figura 1** - Alterações genéticas no mesotelioma pleural maligno. Frequências de mutação nos bancos de dados Inserm e COSMIC. Os valores de P foram determinados pelo teste exato de Fisher (\* P < 0,05).



Fonte: Adaptado de Janku et al. <sup>40</sup>

**Figura 2** - Sinalização intracelular através da via PI3K/AKT/mTOR. A via PI3K/AKT/mTOR é desencadeada pela ativação de várias tirosina-quinases do receptor do fator de crescimento ou receptores acoplados à proteína G. As proteínas PI3K de classe I são recrutadas para a membrana plasmática por proteínas adaptadoras, como membros da família do substrato do receptor de insulina (IRS), que interagem com esses receptores ativados da superfície celular, levando à fosforilação do 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol 4,5 (PIP<sub>2</sub>) para gerar fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). O PIP<sub>3</sub> é um segundo mensageiro que ativa as AKT quinases, capazes de fosforilar a proteína 1 da esclerose tuberosa (TSC1) e TSC2 e, assim, dissociar o complexo TSC1-TSC2. O complexo TSC1-TSC2 regula negativamente a atividade da quinase mTOR; portanto, o AKT resulta na ativação do complexo mTOR 1 (mTORC1) e, portanto, no aumento da síntese proteica e lipídica e na diminuição da autofagia, o que auxilia no crescimento e na proliferação celular. mTORC1 está envolvido em um loop de feedback negativo que serve para impedir a superativação do AKT (linhas vermelhas tracejadas). A via PI3K/AKT/mTOR pode ser aumentada através da ativação de alterações moleculares nas subunidades PI3K, AKT e mTOR (representado por círculos verdes) ou por alterações de perda de função nas subunidades reguladoras do PI3K, PTEN, TSC1, TSC2 e LKB (representado por círculos laranja). Paralelamente, a ativação do receptor do fator de crescimento tirosina quinases e receptores acoplados à proteína G induz a sinalização KRAS/RAF/MEK/ERK, e a ativação de ERK pode contribuir ainda mais para a ativação do mTORC1 através da dissociação do complexo TSC1 - TSC2. O KRAS também pode reforçar a ativação do PI3K. Notavelmente, a via KRAS/RAF/MEK/ERK também pode ser ativada constitutivamente por alterações de ganho de função nas quinases ou nos receptores de superfície celular (círculos verdes).

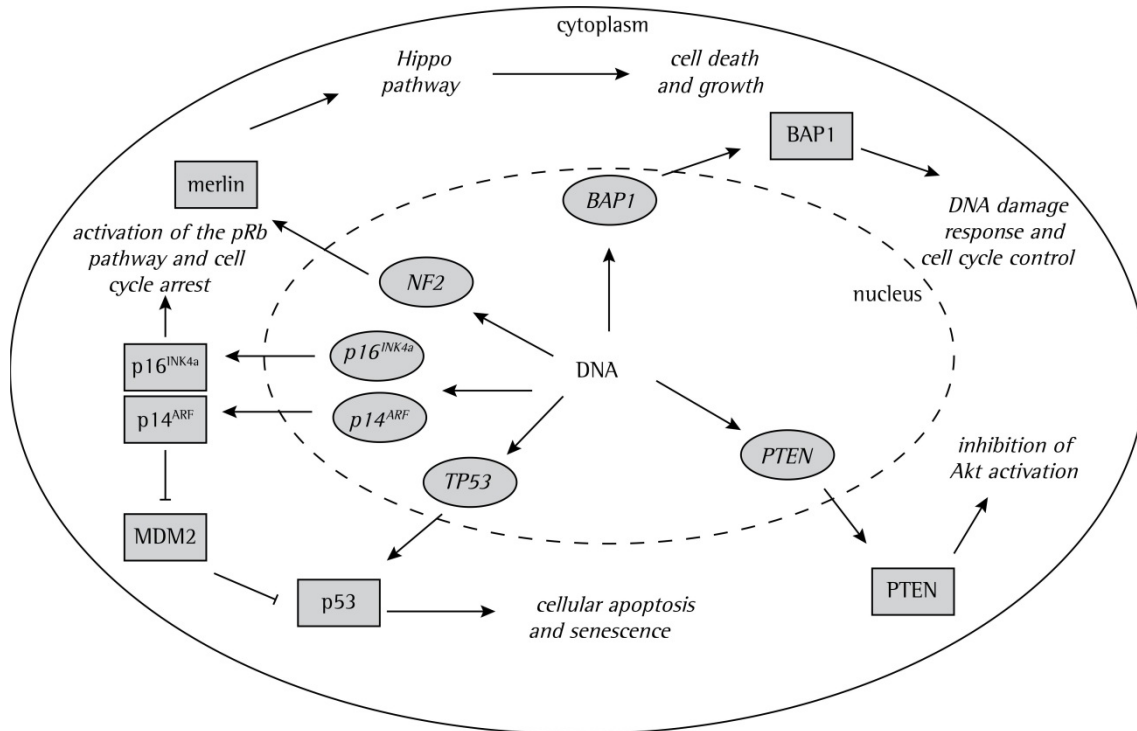




Fonte: Adaptado de Ciołczyk-Wierzbicka<sup>41</sup>

**Figura 3** - Fosforilação de rpS6 através da via de sinalização PI3K/ATK/mTORC1.

Outro modo de ativação destas vias foram observados no mesotelioma entre eles, a mutação e deleção de *NF2* (inibidor de Ras) e *INK4a* (inibidor de ciclinas também chamado de *p16*) (Figura 4).



Fonte: Assis e Isoldi <sup>42</sup>

**Figura 4** - Genes e proteínas envolvidos no desenvolvimento de mesotelioma maligno. A proteína p16<sup>INK4a</sup> ativa a via da proteína retinoblastoma (pRb) e a proteína p14<sup>ARF</sup> modula a p53. O gene *NF2* codifica a proteína merlin, que atua como um regulador da via Hippo. O gene *BAP1* desempenha um papel na resposta a danos no DNA e no controle do ciclo celular. O gene *PTEN* codifica a proteína PTEN, que é um importante regulador negativo da via PI3K/AKT. A proteína p53 desempenha um papel fundamental no controle da apoptose e na senescência celular.

A comparação entre mesotelioma pleural maligno e mesotelioma peritoneal maligno é inevitável, e muito a respeito das informações moleculares sobre o mesotelioma peritoneal advém do que se sabe do mesotelioma pleural <sup>43</sup>. Porém quando fala-se em exposição ao asbesto, a relação com o desenvolvimento de mesotelioma pleural é quase linear, enquanto no mesotelioma peritoneal é não linear <sup>9</sup>. Assim como o mesotelioma pleural, o peritoneal exibe deleções ou perdas em *CDKN2A*, *NF2* e *BAP1*. Entretanto, a prevalência da deleção homocigota de *CDKN2A* e perda hemizigota de *NF2* no mesotelioma peritoneal é menor do que o reportado em mesotelioma pleural <sup>10</sup>. O entendimento molecular do mesotelioma peritoneal tem apresentado crescimento, mas ainda não foi capaz de alcançar uma terapia alvo efetiva. Segundo Kim et al. <sup>8</sup>, uma recente análise genômica em 12 casos de mesotelioma peritoneal encontrou alterações em *BAP1* em 7 casos, e nenhum caso com alterações em *CDKN2A* e *NF2*; Kim et al. <sup>8</sup> ainda afirmam que a perda específica da proteína BAP-1 é um importante marcador para o diagnóstico histopatológico de mesotelioma peritoneal. Assim, podemos ver que, embora já sejam

bastante conhecidas as alterações moleculares relacionadas ao mesotelioma maligno pleural, para os subtipos mais raros como o mesotelioma peritoneal existem poucos trabalhos disponíveis. Deste modo, conhecer mais sobre os subtipos raros de mesotelioma e integrar dados moleculares, clínicos e patológicos, pode contribuir para um melhor entendimento da patologia como um todo, bem como sugerir estratégias terapêuticas direcionadas aos subtipos raros.

#### **1.4 O PAPEL DO GENE BAP1 NO MESOTELIOMA MALIGNO**

O principal gene supressor investigado em pesquisas sobre mesotelioma maligno é o BAP1, localizado no cromossomo 3p21.2 que codifica a proteína BAP-1, que é uma enzima envolvida na remoção da ubiquitina das proteínas. Esta enzima se liga à proteína do tipo 1 de suscetibilidade ao câncer de mama (*BRCA1*) e age como um supressor tumoral <sup>43</sup>. Além disso, esta enzima pode estar relacionada a vários processos celulares como remodelação da cromatina, progressão do ciclo celular, diferenciação celular e reparo de DNA <sup>44</sup>. Sabe-se que a proteína BAP-1 também desempenha um papel importante como inibidora de apoptoses causada pelo estresse metabólico <sup>45</sup>.

Grande parte das mutações no gene *BAP1* são do tipo *frameshift* e *missense*, o que leva a uma perda de expressão da proteína, efeito análogo à perda de cópias do gene, também frequentemente observada neste tipo tumoral. A proteína BAP-1 localiza-se no núcleo e no citoplasma. No núcleo, BAP-1 regula o reparo do DNA por recombinação homóloga. A perda da expressão de BAP-1 sustenta um diagnóstico de malignidade. No entanto, também estão presentes em *BAP1* mutações pontuais que levam à troca de um aminoácido. O efeito destas mutações sobre a atividade da proteína nem sempre é óbvio. Por exemplo, as mutações I47F, F81V, A95D e G178V levam a perda da estabilidade proteica e agregação amiloide <sup>46</sup>. Por outro lado, mutações como A95D, Y724X e 10 F679LfsX37 levam a alteração da localização subcelular de nuclear para citoplasmática <sup>47</sup>.

#### **1.5 BIOMARCADORES PARA O MESOTELIOMA MALIGNO**

Os biomarcadores são úteis no manejo de três aspectos clínicos do mesotelioma: diagnóstico precoce, prognóstico e previsão dos resultados do tratamento. Devido à

raridade da doença e o pequeno número de pacientes, combinado com a baixa acessibilidade a uma população uniforme, a busca por um biomarcador específico se torna muito difícil <sup>48</sup>. Para o diagnóstico precoce, o biomarcador sérico ideal para mesotelioma deve prever o desenvolvimento de mesotelioma em indivíduos expostos ao amianto, diferenciar mesotelioma de doença benigna da pleura/peritônio ou câncer metastático, ser útil para todos os subtipos patológicos e se correlacionar com a extensão da doença para monitorar a resposta ao tratamento e prever o prognóstico <sup>49</sup>.

O ensaio de imunohistoquímica é atualmente um dos métodos de utilizados para a determinação do tipo de câncer devido à simplicidade e facilidade desta técnica. Não existe um marcador conhecido com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade para mesotelioma, por isso a necessidade de painéis de anticorpos para células mesoteliais a fim de se complementar o diagnóstico. Portanto, recomenda-se a utilização de painéis de anticorpos com marcadores positivos e negativos para obter um resultado mais específico (Tabela 2) <sup>50</sup>.

**Tabela 2** - Biomarcadores utilizados no diagnóstico diferencial do Mesotelioma Maligno

<b>Marcadores mesoteliais</b>		
<b>Marcadores</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade contra adenocarcinoma de pulmão</b>
<b>Calretinina</b>	> 90%	90%-95%
<b>WT1</b>	70%-95%	~100%
<b>Podoplanina (D2-40)</b>	90%-100%	85%
<b>Adenocarcinoma (Marcadores epiteliais positivos)</b>		
<b>Marcadores</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Especificidade contra mesotelioma maligno</b>
<b>MOC31</b>	95%-100%	85%-98%
<b>BerEP4</b>	95%-100%	74%-87%
<b>BG8 (Lewis Y)</b>	90%-100%	93%-97%
<b>B72.3</b>	25%-85%	> 95%
<b>Monoclonal</b>	80%-100%	> 95%

Fonte: Adaptado de Henderson et al. <sup>50</sup>

A circunstância mais comum em que a IHC favorece o diagnóstico de mesotelioma pleural maligno é a separação da variante epitelióide de outros carcinomas que podem envolver a pleura. Devido à sua especificidade e sensibilidade, calretinina, citoqueratinas 5/6, WT-1 e D2-40 são usadas como marcadores mesoteliais, e antígeno carcinoembrionário (CEA), B72.3, Bg8, BerEP4 e MOC-31 como marcadores de carcinoma. Nessa situação, é recomendado o uso de pelo menos dois desses marcadores mesoteliais e dois desses marcadores de carcinoma, além do TTF-1 <sup>51</sup>.

Em um estudo com 244 casos de mesotelioma peritoneal maligno, Tandon et al. <sup>52</sup> avaliou em um painel imunohistoquímico proteínas que pudessem estar alteradas em casos de mesotelioma, e encontraram alterações em: calretinina (100%), WT1 (proteína tumoral de Wilms) (94%) e CK5/6 (citoqueratina 5 e 6) (89%), enquanto podoplanina foi positiva em 80% dos casos. Para diagnóstico histopatológico, o A.C. Camargo Cancer Center utiliza um painel com marcadores imunohistoquímicos composto pelas proteínas WT1, p53, BerEP4, podoplanina e citoqueratina AE1/AE3.

O gene *WT1* é um supressor tumoral, normalmente expresso em órgãos em fase de desenvolvimento e superexpresso em casos de leucemia e alguns tumores sólidos, como o mesotelioma maligno. O gene *WT1* codifica uma proteína nuclear, onde o papel de supressão depende da presença de p53 selvagem, em sua ausência a proteína WT1 age como um ativador. A proteína WT1 é comumente utilizada para diferenciar mesotelioma maligno de adenocarcinoma de pulmão <sup>53</sup>. Em 2012, Scattone et al. <sup>54</sup> destacaram que o gene *WT1* pode ser um potencial alvo terapêutico em casos de mesotelioma maligno, assim como um fator prognóstico negativo em mesoteliomas peritoneais malignos.

O papel do gene supressor tumoral *p53* em neoplasias é bem estabelecido na literatura. Em seu estado selvagem o gene é ativado como resposta a danos celulares, porém quando alterado pode atuar como oncogene <sup>55</sup>. Em 1992, Kafiri et al. <sup>56</sup>, reportou a imunorreatividade de p53 em 70% dos mesoteliomas, porém destacando que *p53* não possui papel diferenciador entre tumores. Estudos *in silico* também sugerem a utilização de *p53* como alvo terapêutico em casos de mesoteliomas maligno, uma vez que alterações da via de sinalização de *p53* e de hipóxia podem levar a resistência a tratamentos <sup>57</sup>.

Ber-EP4 é um marcador de glicoproteína presente na superfície e citoplasma de células epiteliais. É uma proteína utilizada no diagnóstico para distinguir adenocarcinoma metastático de mesotelioma. Seu papel no diagnóstico diferencial deve-se à coloração

imunohistoquímica somente em casos de adenocarcinoma, enquanto no mesotelioma maligno tem papel de marcador negativo <sup>58</sup>.

A podoplanina é uma sialoglicoproteína encontrada em podócitos, expressa em vários tecidos saudáveis (incluindo o mesotélio). Segundo Panou et al. <sup>53</sup>, seu uso serve para diferenciar mesotelioma pleural maligno de adenocarcinoma. Estudos sugerem que seu uso é limitado quando tratamos de mesotelioma maligno de histologia não epitelíode <sup>59-61</sup>.

A citoqueratina AE1/AE3 é uma mistura de citoqueratinas de baixo e alto peso molecular, capaz de detectar as citoqueratinas ácidas (AE1) e neutras (AE3). Sua marcação é citoplasmática, e sua função é reconhecer polipeptídeos de citoqueratina de quase todos os epitélios, sendo útil para diferenciar tumores epiteliais de tumores não epiteliais <sup>62</sup>.

Em nosso estudo, propomos utilizar também BAP-1 como biomarcador.

Neste estudo caracterizamos o perfil epidemiológico dos portadores de mesotelioma maligno atendidos no A.C.Camargo Cancer Center através de coleta retrospectiva de prontuários; Criamos e caracterizamos modelos celulares de diferentes tipos de mesotelioma maligno oriundos de pacientes portadores da doença atendidos na instituição e também caracterizamos a ativação das vias de sinalizações destas linhagens celulares; Identificamos as alterações gênicas presentes em fragmentos cirúrgicos coletados de pacientes da instituição; E acompanhamos a construção do novo TMA de mesotelioma, assim como a reação de imunohistoquímica para BAP-1 nesta coorte.

Este estudo é relevante para o estabelecimento de novas terapias alvo e/ou biomarcadores, devido a determinação de alterações gênicas frequentes. Os achados mais importantes poderão ser utilizados e amostras adicionais e em projetos futuros.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Criar e caracterizar modelos de estudo a partir dos casos de mesoteliomas malignos de pacientes atendidos no A.C.Camargo Cancer Center e correlacioná-los com aspectos clínicos e histopatológicos, assim como identificar a presença de alterações em *BAP1* em amostras de tecido parafinado com qualquer topografia ou subtipo histológico.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ **Objetivo específico 1 - Construção de coorte e avaliação clínica e epidemiológica.**

Realizar o levantamento de dados de pacientes portadores de mesotelioma maligno atendidos durante o período de 1989 até 2020 no A.C.Camargo Cancer Center, criando um banco de dados com aspectos clínicos. Acompanhar a revisão histológica e imunohistoquímica para reclassificação da casuística;

✓ **Objetivo específico 2 - Avaliar a perda de expressão da proteína BAP-1 na coorte de mesoteliomas malignos.**

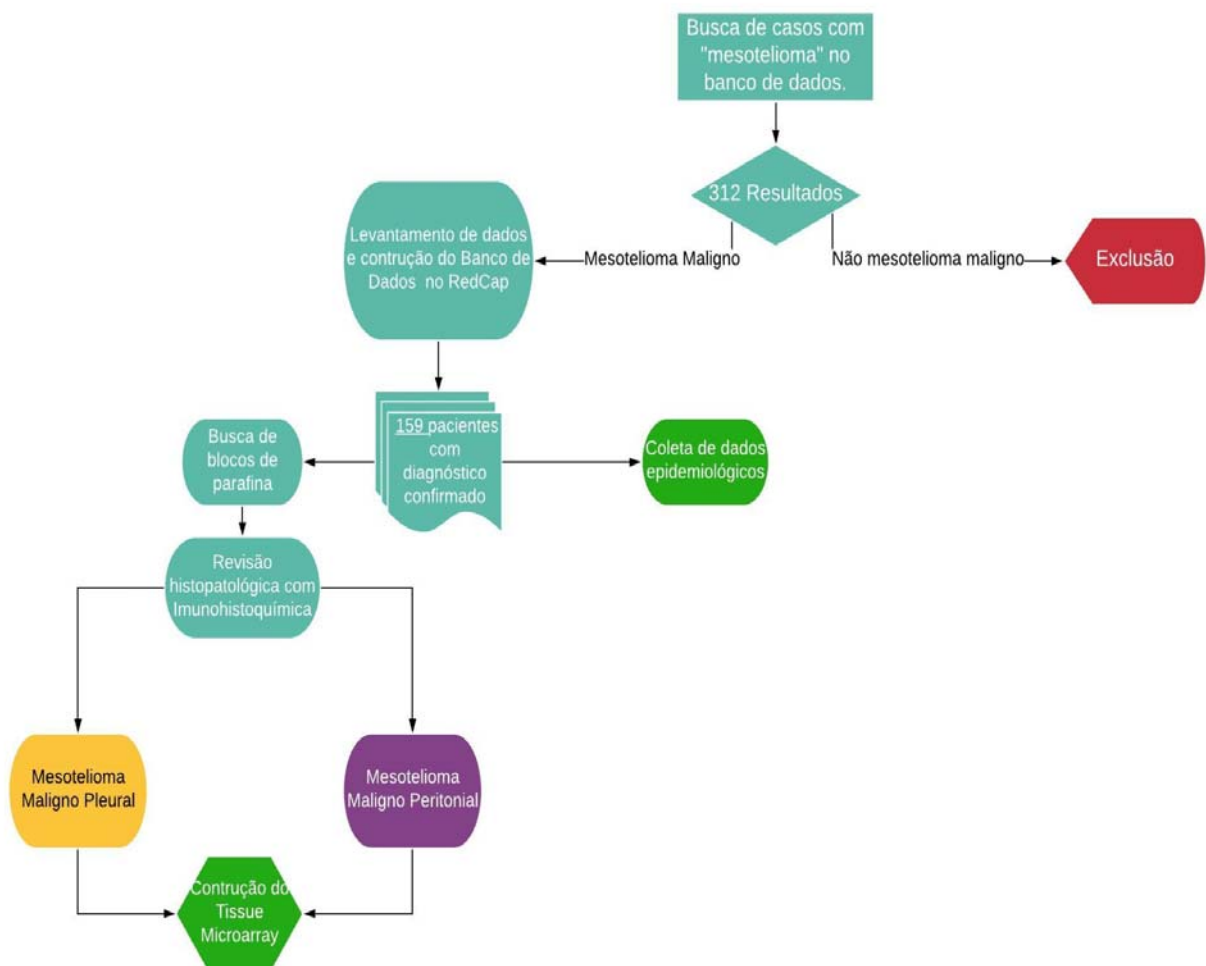
Acompanhar a construção de TMA contendo todos os tecidos de mesotelioma maligno disponíveis na instituição, incluindo pleural e peritoneal de todos os subtipos histológicos. Realizar a reação de imunohistoquímica para a proteína BAP-1 no TMA e avaliar quanto a preservação ou perda de expressão proteica;

✓ **Objetivo específico 3 - Criar e caracterizar linhagem de mesotelioma para estudos moleculares.**

Identificar mutações presentes e caracterizar a ativação de vias de sinalização nas linhagens celulares primárias de mesotelioma oriundas de fragmentos cirúrgicos coletados de pacientes portadores de mesotelioma maligno que passaram por cirurgia no A.C.Camargo Cancer Center.

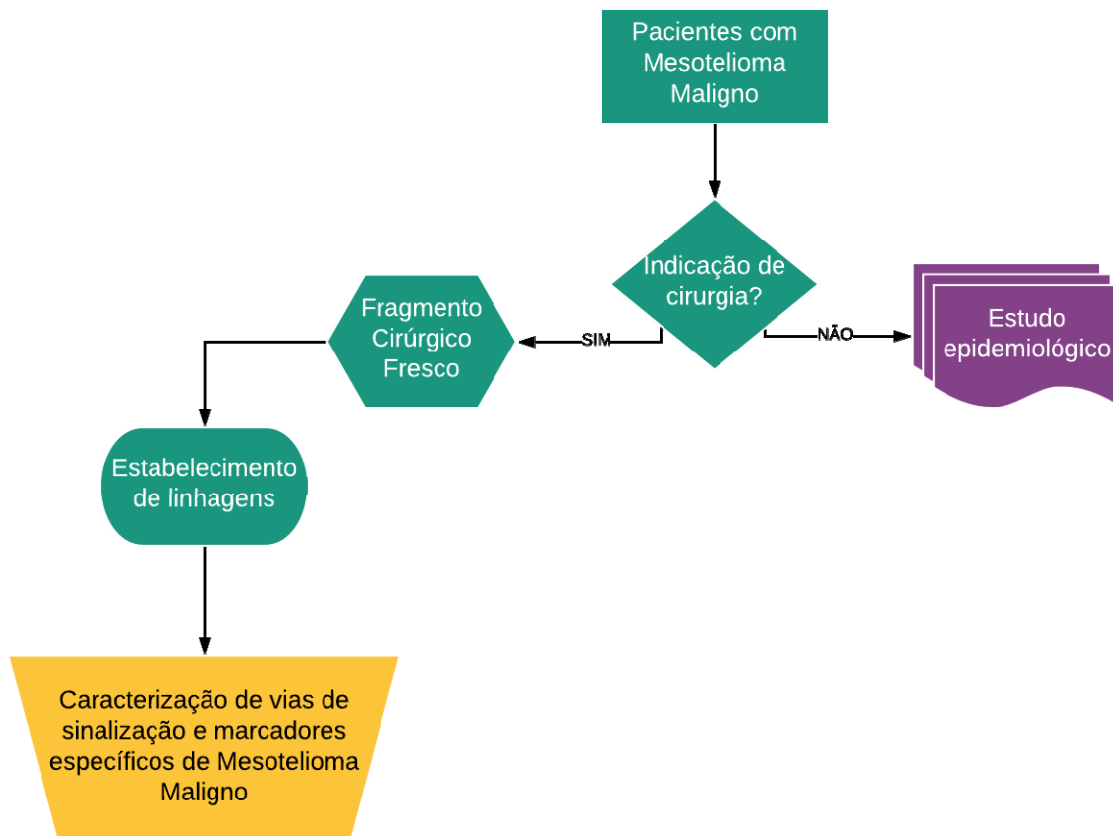
### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa conteve duas vertentes: o estudo retrospectivo, que consistiu na coleta de dados através de prontuários de pacientes atendidos no A.C.Camargo Cancer Center para a elaboração de um perfil epidemiológico, confirmação histopatológica através da técnica de imunohistoquímica e construção do TMA (Figura 5); e o estudo prospectivo, que abrangeu o estabelecimento de linhagens primárias de mesotelioma maligno de diferentes histologias e topografias, o estudo das vias de sinalização destes tumores, e o sequenciamento destas mesmas amostras (Figura 6).



**Figura 5** - Fluxograma demonstrativo do estudo retrospectivo. Os casos de mesotelioma maligno confirmados foram utilizados para o levantamento clínico e epidemiológico. As características demográficas, epidemiológicas e clínicas foram obtidas através de análise retrospectiva dos prontuários.





**Figura 6** - Fluxograma demonstrativo do estudo prospectivo. Fragmentos cirúrgicos obtidos de pacientes que passaram por cirurgia de citorredução no A.C.Camargo Cancer Center foram coletados para ensaios atuais e futuros.

### 3.1 CONSTRUÇÃO DA COORTE

#### 3.1.1 Casuística

A coleta de dados e busca de material foi realizada durante o período de agosto/2018 até janeiro/2020, para todos os casos de mesotelioma maligno atendidos no A.C.Camargo Cancer Center, de dezembro/1989 até janeiro/2020. Em análise preliminar, foram levantados aproximadamente 300 casos, que após a aplicação dos filtros e critérios de inclusão/exclusão, totalizaram 159 casos. As características demográficas, epidemiológicas e clínicas foram obtidas através de análise retrospectiva de prontuários.

Foram coletados e avaliados os seguintes dados: sexo, data de nascimento, etnia, ocupação, idade ao diagnóstico, comorbidades, neoplasia anterior, perda de peso, método de diagnóstico por imagem, ECOG, mediastinoscopia, data da primeira consulta, data do diagnóstico clínico, data do diagnóstico patológico, data da última cirurgia, exposição ao

amianto (em anos), tabagismo, etilismo, principais sintomas iniciais, topografia do tumor primário, histologia do tumor, tratamentos realizados, ressecabilidade do tumor, tipo de cirurgia, quimioterápicos utilizados, número de abordagens quimioterápicas, objetivo da quimioterapia, data de início e término da quimioterapia, número total de ciclos de quimioterapia, redução da dose de quimioterapia, interrupção definitiva do tratamento, resistência a quimioterápico, radioterapia, técnica de radioterapia, número de ciclos e radioterapia, resposta geral aos tratamentos oncológicos, diagnóstico CID10 do familiar, idade do familiar ao diagnóstico, topografia do tumor do familiar, parentesco de primeiro grau, método de avaliação de metástase no sistema nervoso central, estadiamento TNM, método de avaliação da resposta geral aos tratamentos oncológicos, resultados dos testes bioquímicos e imunohistoquímicos, cirurgia anterior, sítio de metástase no sistema nervoso central ao diagnóstico, data da recidiva, status do último segmento e data do último segmento.

### **3.1.2 Critérios de inclusão**

Foram incluídos neste estudo casos de mesotelioma maligno de qualquer topografia; casos revisados e confirmados histopatologicamente como mesotelioma maligno; casos onde foram possíveis resgatar e coletar dados de prontuários nos bancos de dados da instituição; casos com amostras de fragmento cirúrgico fresco ou parafinizado disponíveis.

### **3.1.3 Critérios de exclusão**

Foram excluídos do estudo casos de mesotelioma não maligno e outras neoplasias mesoteliais; casos onde não houve material biológico disponível armazenado em bloco de parafina disponível na instituição; casos onde a qualidade e/ou quantidade do material armazenado não foram suficientes para os estudos biológicos; e casos onde não foi possível extrair dados de prontuário.

## **3.2 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

Os casos com material biológico disponível foram revistos e reclassificados de acordo com a classificação da OMS, 2015, a fim de confirmar o diagnóstico de mesotelioma maligno.

Os casos de mesotelioma maligno confirmados foram utilizados para o levantamento clínico e epidemiológico (Figura 6).

### 3.3 TÉCNICA DE TISSUE MICROARRAY (TMA)

A utilização de TMAs possibilita o estudo da expressão proteica de tumores em larga escala através de ensaios de IHQ, com uma acurácia comprovada. Seu emprego é justificado uma vez que oferece vantagens de custo e tempo para pesquisas em grandes centros com grandes bancos de dados <sup>63,64</sup>. A construção do TMA foi realizada após ser escolhida e identificada, por um patologista, a área adequada na neoplasia através de uma marcação circular em cada nova lâmina de vidro na região mais representativa do tumor e correspondente ao bloco de parafina escolhido. Usando o *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland) a área de interesse foi retirada com um “core” de 0,6mm de cada bloco doador e transferido para outro bloco chamado de receptor. O TMA foi montado com 107 amostras em duplicata. A partir desse novo bloco foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro cortadas através de microtomia mecânica na espessura de 4µm. Estas lâminas foram examinadas no microscópio óptico para observar a representatividade das células neoplásicas. A avaliação da representação celular da neoplasia foi definida como aproveitamento do TMA. Para uma amostragem ser considerada satisfatória foi necessária uma representação de pelo menos 10% de área circular do core de 0,6mm após uma análise no microscópio óptico de vários níveis de corte.

### 3.4 CONFIRMAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a reação de imunohistoquímica, foram utilizados um painel de marcadores compostos pelas proteínas WT1, p53, BerEP4, podoplanina e citoqueratina AE1/AE3. A revisão das lâminas foi realizada pelo patologista colaborador deste projeto Dr. Clóvis Antônio Pinto.

Os procedimentos de imunohistoquímica e histologia foram realizados no *Core Facility* de Histologia-IHQ-TMA do A.C.Camargo Cancer Center. As amostras de mesotelioma maligno foram seccionados no micrótomo (Leica, RM2255) na espessura de 4 µm. As lâminas foram posteriormente incubadas (Tabela 3) com os anticorpos anti-p53 (ready-to-use, cat.

IR616, Dako), anti-citoqueratina (ready-to-use, cat. IR053, Dako), anti-antígeno 20pithelial (ready-to-use, cat. IR637, Dako), anti-podoplanina (ready-to-use, cat. IS072, Dako) e anti-WT1 (ready-to-use, cat. IR055, Dako) através dos kits de detecção *Ultraview* (cat. 760-500, Ventana Medical Systems) ou *OptiView DAB IHC Detection Kit* (cat. 760-700, Ventana Medical Systems).

As reações foram realizadas no sistema automatizado *Ventana BenchMark XT* (Ventana Medical Systems) seguindo as instruções do fabricante. As lâminas foram desparafinizadas utilizando a solução *Ezprep* (cat. 950-102, Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA). As recuperações antigênica foram feitas com os reagentes *cell conditioning 1* (cat. 950-224, Ventana Medical Systems, Inc.) ou *cell conditioning 2* (cat. 950-223, Ventana Medical Systems, Inc.) a 95°C. A especificação do kit de detecção, recuperação e diluição de cada anticorpo está descrito na Tabela 3. Após o ensaio de imunohistoquímica, as lâminas foram montadas com meio de montagem *Entellan* (cat. 107961, Merck).

Para BAP-1, os cortes foram seccionados no micrótomo (Leica, RM2255) na espessura de 4 µm e as lâminas foram incubadas com o anticorpo anti-BAP1 (ready-to-use, cat. sc-28383, Santa Cruz). As reações foram realizadas manualmente, com o kit Novolink (Leica, RE7161) e kit Novocasta (Leica, RE7159). Brevemente, as lâminas foram desparafinizadas. A recuperação antigênica foi feita em Banho maria (Fisher Scientific, ISOTEMP105) em solução Citrato pH 6.0 a 95°. A especificação do kit de detecção e recuperação cada anticorpo está descrito na tabela abaixo. Após o ensaio de imunohistoquímica, as lâminas foram montadas com meio de montagem *Entellan* (cat. 107961, Merck) e entregues para avaliação histopatológica. Os controles testados foram Melanoma, Rim normal, Testículo normal e Mesotelioma.

**Tabela 3** - Anticorpos e condições utilizadas nas reações de confirmação do diagnóstico imunohistopatológico realizadas no Ventana em amostras fixadas em blocos de parafina.

Anticorpo	Recuperação	Tempo de incubação	Kit de detecção
Anti-p53	30 min CC1	60 min	Ultraview
Anti-citoqueratina AE1/AE3	30 min CC1	60 min	Ultraview
Anti-antígeno epitelial (BerEP4)	60 min CC2	120 min	Ultraview
Anti-podoplanina	30 min CC1	120 min	Ultraview
Anti-WT1	64 min CC1	120 min	Optiview
Anti-BAP1	40 min	60min	Novolink e Novocastra

A avaliação da perda de expressão ou preservação da expressão proteica de BAP-1 foi feita de maneira qualitativa. *BAP1* foi considerado preservado quando uma positividade nuclear foi vista em qualquer quantidade de células, independentemente da reatividade citoplasmática. A completa ausência de marcação nuclear foi considerada como negativa (quando houve perda de expressão) na presença de células não neoplásicas (endotélio, células inflamatórias, etc) com marcação nuclear, que atuaram como controle endógeno positivo<sup>65-67</sup>.

### 3.5 GERAÇÃO DE CULTIVO DE MODELOS CELULARES DE MESOTELIOMA

Para a geração de linhagens celulares em cultura oriundas de pacientes atendidos pelo A.C.Camargo Cancer Center, utilizamos um protocolo adaptado de Valente et al.<sup>68</sup> e Xia et al.<sup>69</sup>. Como se pode observar nas Figuras 17 e 18, o tumor recebido foi fragmentado em uma placa de petri contendo PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) com auxílio de um bisturi e uma pinça (ambos estéreis) em tamanho aproximado de 2 x 2 mm. Os cortes foram transferidos juntamente com o PBS para um tubo de 15mL e centrifuga-se por 3 minutos a 15.000rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e os fragmentos passam então para a digestão enzimática com tripsina-EDTA, 0,1% colagenase e 0,15M DNase em PBS. Os fragmentos ficam incubados por 1 hora a 37°C, com agitação constante de 600rpm. Após incubação, centrifugou-se o tubo por 10 minutos a 15.000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, e o pellet ressuscitado com o meio DMEM/F-12 (Gibco™) suplementado com 20% de soro fetal

bovino. As células foram mantidas durante o tempo do experimento em estufa com 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub> a 37°C e congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido seguindo o protocolo de congelamento adotado no laboratório de biologia tumoral e biomarcadores.

### 3.6 ESTUDO DE VIAS DE SINALIZAÇÃO

Neste trabalho realizamos estudos de vias de sinalização através da técnica de análise de proteínas por *western blot*. As proteínas alvos deste estudo foram aquelas envolvidas no ciclo celular, e assim avaliamos a expressão proteica e ativação de determinadas vias de sinalização. Para estimular a ativação das vias de interesse, as células passaram por três tratamentos: 1-células mantidas em soro fetal bovino (SFB) 20% para considerar crescimento exponencial; 2-células carenciadas por 48 horas; 3-células carenciadas por 48 horas e reestimulada com SFB 20%. Em condições normais de expressão proteica, os resultados esperados em relação à expressão proteica (visualizado através de quimiluminescência) seriam os seguintes: maior expressão em células carenciadas e reestimuladas com SFB; expressão mediana em células em crescimento exponencial; e pouca ou nenhuma expressão em células carenciadas.

Para o ensaio de *western blot* foram plaqueadas aproximadamente  $1.10^6$  células, no dia seguinte foram lavadas com PBS gelado duas vezes e mantidas em gelo. O PBS foi retirado e as células foram lisadas com 60ul de tampão de lise (1M Tris-HCl, 3M NaCl, 500mM EDTA, 500nM EGTA, 10% NP-40, 10% Na-deoxcholate, *cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail (Roche)*, *Halt™ Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific™)*). As placas foram raspadas o extrato foi coletado e armazenado em tubos de 1,5mL previamente etiquetados. Os extratos foram centrifugados a 4°C por 15 minutos a 14.000rpm. Coletou-se o sobrenadante em um novo tubo identificado, e o restante foi desprezado.

Para a realização da quantificação proteica no extrato celular utilizamos o reagente *Bradford™* (Bio-Rad), que tem por base o azul de *Coomassie*, possui faixa de detecção entre 20 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e utiliza a albumina do soro bovino (BSA) como padrão. O procedimento consistiu em realizar a leitura de diferentes concentrações conhecidas de BSA para elaboração de curva padrão a partir da equação da reta e cálculo da quantidade de proteína presente. A comparação dos resultados com valores de concentrações conhecidos da curva padrão permitiu a determinação da concentração da proteína nas amostras em estudo.

Para a separação por SDS-PAGE, 15µg ou 30 µg de proteína foram adicionados ao volume correspondente de tampão Laemmli. As amostras foram incubadas a 95°C por 5 min, e mantidas no gelo até o momento da aplicação no gel. O gel de SDS-PAGE foi confeccionado desde 6% até 12% de acrilamida a depender do peso molecular da proteína a ser investigada. Para a eletroforese, o gel foi retirado do molde e encaixado na cuba, e em seguida adicionou-se tampão de corrida (25mM Tris; 191mM Glicina; SDS 10%) na cuba. As amostras foram aplicadas nos poços, assim como o peso molecular. A fonte com voltagem constante foi ajustada em duas fases: a primeira em 65V por 20min; e a segunda a 120V por aproximadamente 1 hora e 30min.

Para a transferência para a membrana o papel filtro e membrana de nitrocelulose foram cortadas nas dimensões do gel (7,5 x 10 cm). O gel foi retirado da cuba de corrida e colocado em imersão no tampão de transferência (191mM Glicina, 25mM Tris, SDS 10%, Metanol 20%) para equilibrar, assim como o papel filtro, a membrana de nitrocelulose e as espumas de apoio. Após a montagem do sistema no molde, o molde contendo o gel e a membrana foi colocado em uma cuba específica para transferência com o tampão de transferência e uma placa de gelo; a cuba estava dentro de um isopor contendo gelo. Então, a voltagem foi ajustada para 100V por 1 hora a 4°C. O sucesso da transferência foi verificado através a coloração por *Ponceau*. Para isso, a membrana foi retirada da cuba de transferência e colocada em um recipiente limpo com água destilada. Descartou-se a água e colocou-se a solução *Ponceau* (1% CH<sub>3</sub>COOH; *Ponceau S Staining Solution* 25%) para a visualização de proteínas totais. A membrana foi lavada com água destilada novamente para remoção do *Ponceau*.

Para a reação de *immunoblot*, a membrana foi primeiramente bloqueada em solução de 5% de leite em pó desnatado em TBS-T (150mM NaCl; 20mM Tris; Tween 0,1%) e incubada por uma hora em temperatura ambiente sob agitação. Após este período a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos com TBS-T. O anticorpo primário (vide Tabela 4) foi incubado diluído em TBS-T-BSA 5% sob agitação a 4°C *overnight*. O anticorpo primário foi retirado e realizou-se novamente três lavagens de 5 minutos cada com TBS-T. Adicionou-se então o anticorpo secundário (anti-coelho ou anti-camundongo acoplado a HRP diluído em TBS-T 5% de leite em pó desnatado na proporção 1:2500 e incubado por uma hora sob agitação em temperatura ambiente. Realizou-se então três lavagens de 5 minutos cada com TBS-T. A reação luminosa foi revelada utilizando o kit *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate*

(Thermo Scientific), cuja solução foi aplicada sobre a membrana. A quantificação da luminosidade foi obtida no fotodocumentador Uvitec Cambridge™.

As proteínas de interesse investigadas pertencem à via PI3K/AKT/mTOR envolvidas no ciclo celular: pAKT (T308), pAKT (S473), AKT total, p(S235/6) rpS6, rpS6 total, P70 total, pERK, ERK 1/2, RSK1 total, RSK 2 total, PTEN, BAP1 e beta actina/GAPDH (Tabela 4).

**Tabela 4** - Anticorpos utilizados nos ensaios de *western blot*, número de catálogo, diluições e espécie fonte.

Proteína	Marca/Catálogo	Diluição	Espécie Fonte
P(Thr202/Y204)-ERK1/2	Cell Signaling/#9101	1:1000	Rabbit
ERK1/2	Cell Signaling/#9102	1:2000	Rabbit
P(Ser235/236)-rpS6	Cell Signaling/#4856	1:1000	Rabbit
rpS6	Santa Cruz/sc-74459	1:500	Mouse
p-Akt (T308)	Cell Signaling/#4056	1:1000	Rabbit
p-Akt (S473)	Cell Signaling/#9271	1:1000	Rabbit
AKT	Cell Signaling/#9272	1:1000	Rabbit
BAP-1	St. Cruz/sc-28383	1:500	Mouse

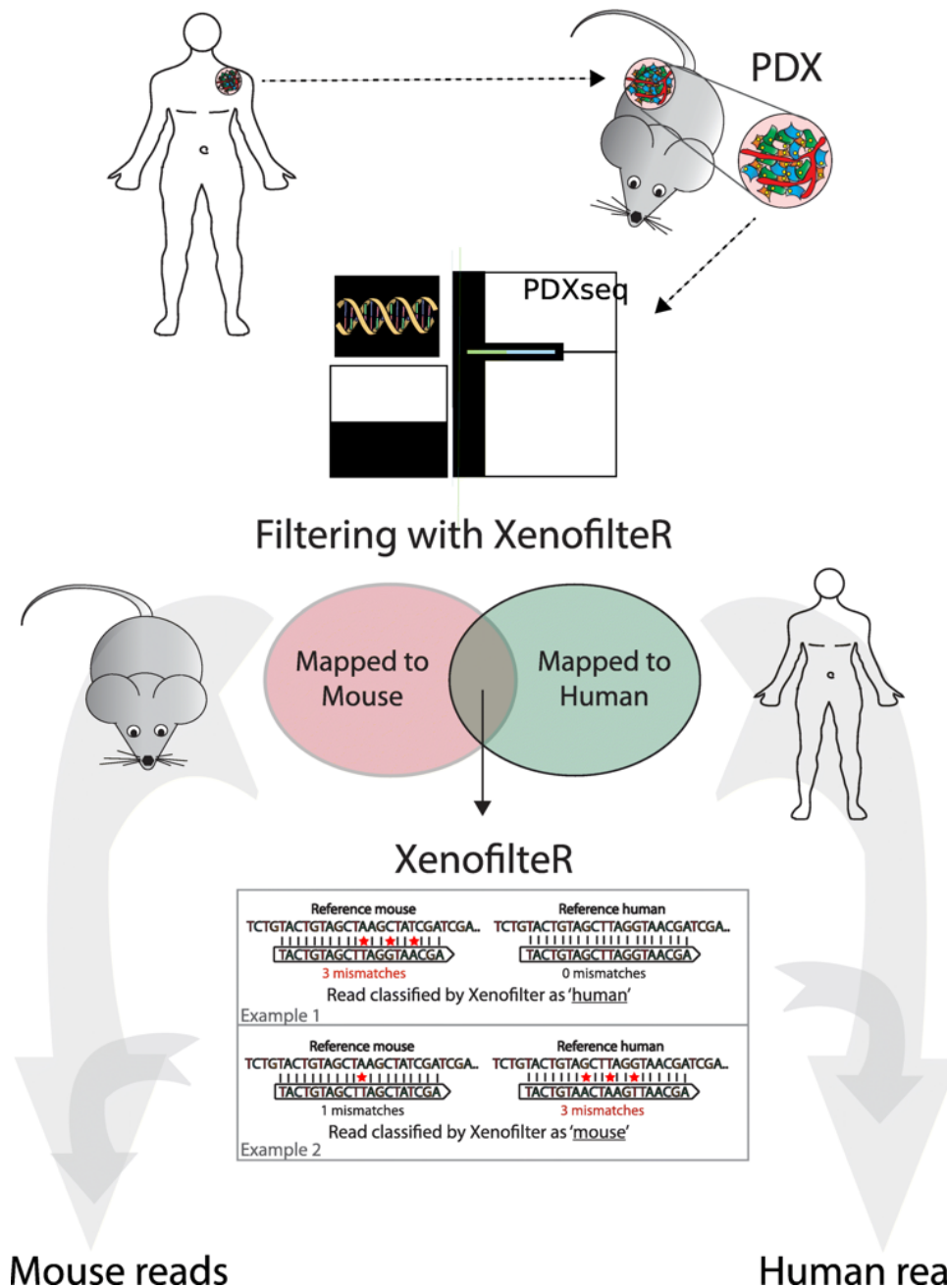
### 3.7 SEQUENCIAMENTO DE AMOSTRAS E ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO

Foram enviadas para sequenciamento de exoma amostras contendo diferentes tipos de material biológico de cada caso de mesotelioma maligno que passou por cirurgia no A.C.Camargo Cancer Center desde janeiro de 2018 para a empresa MacroGen (Coreia do Sul), e sequenciada pela plataforma Illumina. Foram sequenciados 3 casos de mesotelioma maligno, para cada caso foram enviados três tipos de materiais diferentes (DNA do tumor original, DNA extraído de cultura celular derivada do tumor original, e DNA do xenoinxerto), afim de se observar as alterações gênicas presentes em cada amostra e comparar a preservação destas alterações em cada tipo de material biológico.

A análise dos dados obtidos a partir do sequenciamento foi realizada pelo Alexandre Defelicibus, do departamento de bioinformática da instituição. Para isto, foram realizadas a chamada de variante (PDX) e abordagem das variantes somáticas. Foi o filtro Xenofilter<sup>70</sup>, que realizou a deconvolução computacional de leituras de camundongos e humanos em dados de sequência de xenoinxerto do tumor (Figura 7).



## Sequencing of xenograft samples (RNA/DNA)



Fonte: Kluin et al.<sup>70</sup>

**Figura 7** - Visão geral do fluxo de trabalho XenofilterR. As leituras de sequência (fastq) de PDX são mapeadas com um alinhador apropriado para um genoma de referência humano e de camundongo. A sequência lê apenas o mapa para um único genoma de referência e o classifica para esse organismo específico. Para leituras de sequência que mapeiam para o genoma de referência humano e de camundongo, a distância de edição é calculada pelo número de pares de bases diferentes entre a sequência lida e o genoma de referência. Em seguida, o XenofilterR classifica a sequência lida como 'humana' ou 'animal' com base na distância de edição.

Com as leituras restantes do filtro aplicado no passo anterior, foi realizada a chamada de variante somática. Os parâmetros da análise foram definidos baseados nos bancos de dados dbNSFP, gnomAD, ExAC, dbSNP e snpEff. A análise de variante somática para os dados de sequenciamento de exoma foi executada de acordo com as boas práticas do *Genome Analysis Toolkit* (GATK) <sup>71</sup>, as quais compreende as etapas de alinhamento, pré-processamento e chamada de variante. Resumidamente, o software BWA versão 0.7.17-r1188, no modo *MEM*, foi utilizado para alinhamento dos arquivos FASTQ (*reads*) contra a sequência de referência do genoma humano, na versão GRCh38 (hg38). O BWA foi executado com os parâmetros padrões, exceto para o número de *threads* que foi definido para 8 para um processamento mais rápido.

Os arquivos alinhados (BAMs) foram pré-processados utilizando o GATK versão 3.8, seguindo os passos: *MarkDuplicates*, *BaseRecalibrator* e *PrintReads*. O programa *MarkDuplicates* foi executado com os parâmetros padrões e esse passo consiste na identificação de pares de *reads* que podem ter sido geradas a partir de duplicatas dos mesmos fragmentos de DNA. Os programas *BaseRecalibrator* e *PrintReads* foram executados com os parâmetros padrões, exceto para o número de *threads* que foi definido para 8 para um processamento mais rápido, e esse passo consiste na aplicação de um algoritmo de *machine learning* para detectar e corrigir erros nos valores da qualidade de cada base gerado pelo sequenciador.

Para a chamada de variante somática, foi utilizado o método *mutect2*, com os parâmetros padrões, exceto para os parâmetros *-max\_alt\_alleles\_in\_normal\_count 7-max\_alt\_allele\_in\_normal\_fraction 0.05*, no modo pareado (tumor x normal), onde as variantes encontradas na amostra normal eram filtradas e não consideradas como somáticas. Como amostra normal, foi considerada um *pool* de leucócitos que foi sequenciado com o DNA de 3 amostras. Os bancos dbSNP <sup>72</sup> e ExAC foram utilizados para filtro de polimorfismo. Demais filtros foram realizados utilizando a abordagem de *hard filtering* do GATK3 descrito no tutorial do GATK. A variável “*impacto*” presente nas tabelas 9, 10 e 11 é baseada na probabilidade de alteração da proteína a ser codificada.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando SPSS versão 18 (Inc., padrão, mínimo, máximo e quartis) para dados quantitativos e tabelas de frequência para o qualitativo. A associação entre tipos histológicos, dados demográficos, perfil celular e molecular foi primeiramente comparada usando o teste exato de Fisher ou teste qui-quadrado de Pearson. A sobrevida global foi avaliada quanto ao sexo, idade, estadiamento, tipos histológicos, e expressão de BAP-1 pelas curvas de sobrevida de *Kaplan-Meier* e o teste *Log-rank* para examinar as diferenças nas curvas de sobrevivência. A robustez das variáveis significantes obtidas pela análise univariada foram testadas pelo modelo de regressão de Cox. Para alguns testes epidemiológicos existem dados omissos que não considerados. O valor de  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo para todos os testes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CONSTRUÇÃO DE COORTE E AVALIAÇÃO CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA

Durante os meses de execução deste projeto, trabalhamos para a aprovação do projeto no CEP institucional (número 2501-18B) e realizamos o levantamento de dados de 159 pacientes portadores de mesotelioma maligno atendidos no A.C.Camargo Cancer Center, utilizando os sistemas internos *Recruit* e H2TC. Com os dados coletados foi elaborada uma coorte utilizando o sistema online de construção de banco de dados *RedCap*, com auxílio da equipe de Informática Médica da instituição.

Quando analisamos o perfil epidemiológico de nossa coorte independente de topografia, temos os seguintes resultados (tabela 5): 50% dos pacientes (N=77) são do sexo feminino, e 50% do sexo masculino - não foi possível recuperar dados de 1% (N=2) dos pacientes em relação a esta variável.

Na escala de performance ECOG, 57,4% pacientes (N=66) se encontram na escala 1, que por definição é apresentada como *“Atividade física extenuante restrita; totalmente ambulatorial e capaz de realizar trabalhos leves”*.

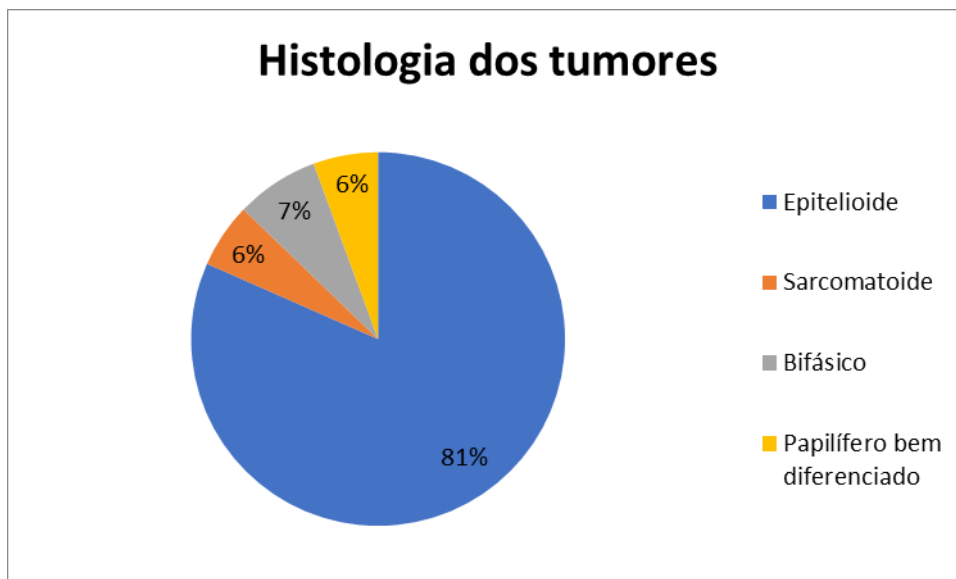
A média de idade ao diagnóstico encontrada foi de 55,94 anos; o paciente mais novo em nossa coorte a ser diagnosticado possuía 21 anos e o mais velho 84 anos, enquanto o valor da mediana em nosso estudo foi de 57 anos.

Apenas 16,3% dos pacientes (N=17) afirmaram estar cientes da exposição prévia aos asbestos. Dados da literatura reportaram a que porcentagem de pessoas diagnosticadas com algum tipo de mesotelioma maligno e exposição prévia ao asbesto relatada pode chegar a até 80%<sup>2,18,73,74</sup>.

Embora não tenha sido possível obter dados de 35,94% de nossa coorte em relação ao estadiamento durante o diagnóstico, a maioria dos pacientes foram classificados em estágios avançados III e IV (37,6% e 51,2% respectivamente).

Em relação aos principais carcinógenos tabaco e álcool a maioria dos pacientes nega contato, vemos que 57,3% (N=67) dos pacientes não são tabagistas e 66% (N=70) não se consideram etilistas.

O tipo histológico mais encontrado deste tumor foi o epitelioide, presente em 81,6% (N=102) dos pacientes (Figura 8). Surpreendentemente, em nossos bancos de dados encontramos 13 casos diagnosticados como mesotelioma papilífero bem diferenciado, um tipo histológico tão raro que não possui epidemiologia descrita. Para confirmação desta histologia os possíveis casos de mesotelioma papilífero bem diferenciado passaram por revisão histológica pelo patologista afiliado à este trabalho e 7 deles foram considerados de fato papilífero bem diferenciado.



**Figura 8** - Distribuição do tipo histológico de mesotelioma maligno encontrado neste estudo.

Na Tabela 5 destacamos também as porcentagens das topografias encontradas em nosso estudo 48,42% peritoneal e 47,16% pleural. O departamento de cirurgia pélvica do A.C.Camargo Cancer Center é um centro de referência nacional, e, por este motivo inúmeros pacientes portadores de mesotelioma maligno peritoneal de várias regiões do Brasil são encaminhados para este centro a fim de passarem por cirurgia citorrredutora durante o tratamento. Por este motivo existe um número similar entre as topografias encontradas entre nossos pacientes, apesar do mesotelioma maligno pleural ser o mais incidente mundialmente <sup>75</sup>.

Quanto a escolha de tratamento adequada, os pacientes de mesotelioma maligno podem ter passado por apenas uma das opções de tratamento ou por uma combinação deles. Nossa análise revelou que 68,2% (N=105) dos pacientes passaram por algum tipo de cirurgia, enquanto 61% (N=94) passaram por tratamento quimioterápico.

Quando indagados sobre histórico familiar de câncer, 59,5% (N=66) afirmaram a existência de tumores malignos em familiares consanguíneos, enquanto 22,3% (N=27) dos pacientes relataram o diagnóstico de outra neoplasia anterior ao diagnóstico de mesotelioma maligno.

Em 31,8% (N=49) dos pacientes foram constatados a progressão local da doença, enquanto 24% (N=37) apresentaram metástase. Quanto a recidiva do tumor, vimos que 55,6% (N=50) dos pacientes tiveram o retorno da doença, após um tratamento bem sucedido.

Ao separarmos as topografias para análise, conseguimos diferenciar o perfil epidemiológico do mesotelioma maligno pleural do mesotelioma maligno peritoneal.

Com os dados que disponíveis em nossos prontuários, observamos que no mesotelioma pleural maligno a maioria dos pacientes são homens (62,3%), apresentam ECOG 1 (69,6%), idade ao diagnóstico entre 65-74 anos (34,2%), não reportaram exposição ao asbesto (72,5%), estadiamento III e IV (48%), com histórico de tabagismo (54,2%) e sem histórico de etilismo (59,6%). O tipo histológico mais prevalente encontrado nesta topografia foi o epitelioide (83,3%), 55,8% dos pacientes passaram por algum tipo de cirurgia e 57,1% fizeram algum tipo de quimioterapia. Reportaram histórico familiar de câncer em 51,9% dos casos, e 72,9% dos pacientes negou o diagnóstico de uma outra neoplasia anterior ao diagnóstico de mesotelioma maligno. A progressão foi local foi vista em 37,7% de nossa coorte e 69% dos pacientes apresentaram recidiva do tumor.

Enquanto no mesotelioma peritoneal maligno encontramos o seguinte perfil epidemiológico: 62,3% (N=48) pertencem ao sexo feminino, 45,8% (N= 27) apresentaram ECOG 1, 33,8% (N=25) foram diagnosticado entre 21 e 44 anos, 94,3% (N=50) negaram o conhecimento de exposição ao asbesto, a maioria dos pacientes (54,9% (N=28)) foram diagnosticadas em estágio avançado da doença - estadiamento IV, sem histórico de tabagismo ou etilismo (57,3%, N=67; 72,2%, N=39 respectivamente), a histologia epitelioide foi a mais prevalente, sendo encontrada em 80% (N= 52) dos casos, 80,5% (N=62) dos pacientes passaram por algum tipo de tratamento cirúrgico, 66,1% (N=39) relatou a presença de histórico familiar de câncer, a maior parte (82,3%, N=51)) desta população não apresentou outra neoplasia anterior ao diagnóstico de mesotelioma maligno, 29,9%(N=23) não apresentou progressão e nem recidiva da doença (56,3%, N=27).

**Tabela 5** - Resultado da coleta de dados epidemiológicos em pacientes portadores de mesotelioma maligno atendidos no A.C.Camargo Cancer Center.

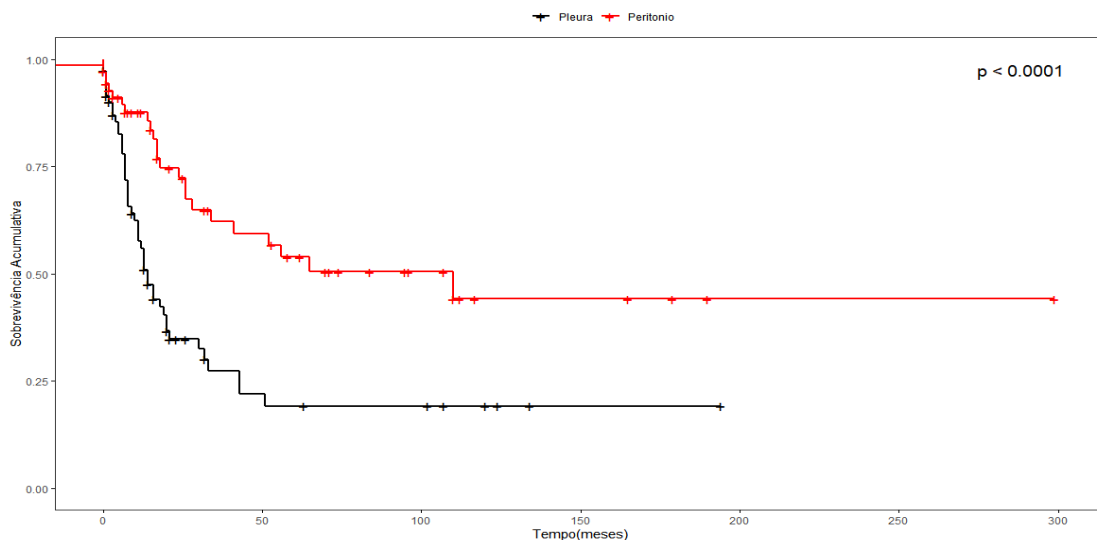
Variável	Categoria	Pleural (N=75)		Peritoneal (N=77)		Total*		Teste X <sup>2</sup>
		N	%	N	%	N	%	<i>p-value**</i>
<b>Sexo</b>	Feminino	29	37,7%	48	62,3%	77	50%	<b>0,004</b>
	Masculino	48	62,3%	29	37,7%	77	50%	
	Total	77	100%	77	100%	154	100%	
<b>ECOG</b>	0	8	14,3%	26	44,1%	34	29,6%	<b>0,001</b>
	1	39	69,6%	27	45,8%	66	57,4%	
	2	7	12,5%	5	8,5%	12	10,4%	
	3	2	3,6%	0	-	2	3,6%	
	4	0	-	1	1,7%	1	0,9%	
	Total	56	100%	59	100%	115	100%	
<b>Idade ao diagnóstico</b>	21-44	8	11%	25	33,8%	33	22,4%	<b>&lt;0,001</b>
	45-54	9	12,3%	21	28,4%	30	20,4%	
	55-64	19	26%	14	18,9%	33	22,4%	
	65-74	25	34,2%	10	13,5%	35	23,8%	
	75+	12	16,4%	4	5,4%	16	10,9%	
	Total	73	100%	74	100%	147	100%	
<b>Exposição ao asbesto</b>	Sim	14	27,5%	3	5,7%	17	16,3%	<b>0,006</b>
	Não	37	72,5%	50	94,3%	91	83,7%	
	Total	51	100%	53	100%	104	100%	
<b>Estadiamento</b>	I	0	-	6	11,8%	6	5,9%	<b>0,018</b>
	II	2	4%	3	5,9%	5	5%	
	III	24	48%	14	27,5%	38	37,6%	
	IV	24	48%	28	54,9%	52	51,2%	
	Total	50	100%	51	100%	101	100%	
<b>Tabagismo</b>	Sim	32	54,2%	18	31%	50	42,7%	<b>0,019</b>
	Não	27	45,8%	40	69%	67	57,3%	
	Total	59	100%	58	100%	117	100%	
<b>Etilismo</b>	Sim	21	40,4%	15	27,8%	36	34%	0,244
	Não	31	59,6%	39	72,2%	70	66%	
	Total	52	100%	54	100%	106	100%	
<b>Histologia</b>	Epiteloide	50	83,3%	52	80%	102	81,6%	0,757
	Sarcomatoide	4	6,7%	3	4,6%	7	5,6%	
	Bifásico	4	6,7%	5	7,7%	9	7,2%	
	Papilífero bem diferenciado	2	3,3%	5	7,7%	7	5,6%	
	Total	60	100%	65	100%	125	100%	
<b>Tratamento</b>	Cirurgia	43	55,8%	62	80,5%	105	68,2%	<b>0,002</b>
	Quimioterapia	44	57,1%	50	64,9%	94	61%	
	Radioterapia	24	31,2%	2	2,6%	26	16,9%	
<b>Histórico familiar de câncer</b>	Sim	27	51,9%	39	66,1%	66	59,5%	0,185
	Não	25	48,1%	20	33,9%	45	40,5%	
	Total	52	100%	59	100%	111	100%	
<b>Neoplasia anterior</b>	Sim	16	27,1%	11	17,7%	27	22,3%	0,391
	Não	43	72,9%	51	82,3%	94	77,7%	
	Total	59	100%	62	100%	121	100%	

## Cont/ Tabela 5

Variável	Categoria	Pleural (N=75)		Peritoneal (N=77)		Total*		Teste X <sup>2</sup>
Progressão	Local	29	37,7%	20	26%	49	31,8%	0,166
	A distância	18	23,4%	19	24,7%	37	24%	1
	Sem progressão	12	15,6%	23	29,9%	35	22,7%	<b>0,054</b>
Recidiva	Sim	29	69%	21	43,8%	50	55,6%	
	Não	13	31%	27	56,3%	40	44,4%	<b>0,028</b>
	Total	42	100%	48	100%	90	100%	

Resultados separados em suas duas principais topografias: pleural e peritoneal. Dados apresentados em porcentagem e em números absolutos para facilitar a compreensão. Ignorados= dados não recuperados e/ou ignorados durante anamnese. \*O total de casos neste estudo foi de 159 pacientes, entretanto devido a ausência de determinadas informações em prontuário o N total pode sofrer variação de acordo com cada variável. \*\*p-value do teste de qui-quadrado de Fisher. Valores significantes estatisticamente ( $p < 0.05$ ) se encontram em negrito.

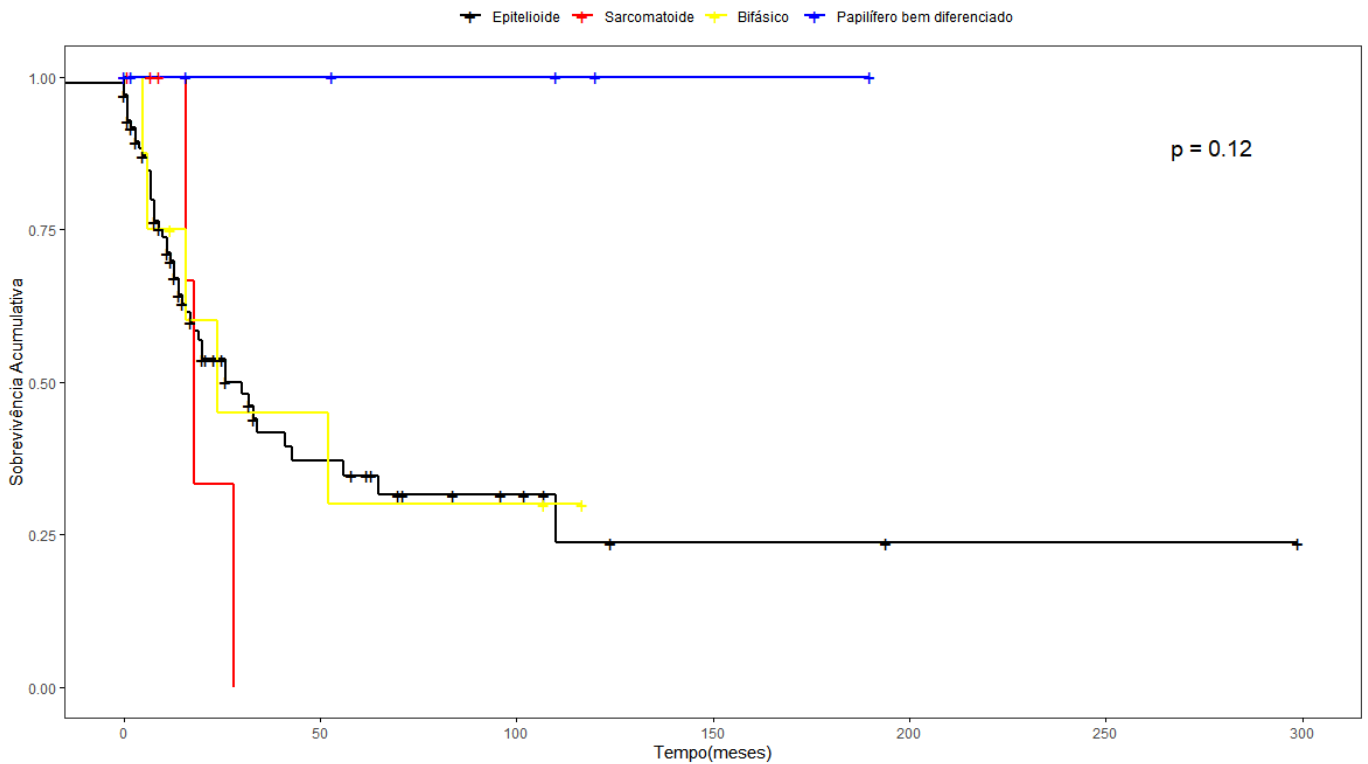
Abaixo, pode-se observar um gráfico do tipo Kaplan-Meier, com dados de sobrevida global dos pacientes. Nele compara-se o tempo de sobrevida global em meses em pacientes acometidos pelo mesotelioma maligno de topografias pleural *versus* peritoneal (Figura 9). Os portadores de mesotelioma pleural maligno possuem uma mediana de sobrevida global de 11,6 meses, enquanto os pacientes com mesotelioma peritoneal maligno apresentam uma mediana de sobrevida global, de 17,9 meses.



**Figura 9** - Gráfico de sobrevida global tipo por topografia, comparando o tempo de sobrevida em meses entre os pacientes participantes do estudo, acometidos pelo mesotelioma maligno pleural x mesotelioma maligno peritoneal. P-value obtido através do teste de Log-Rank no SPSS, consideramos como estatisticamente significantes  $p < 0.05$ .



Quando a mesma análise é estratificada por tipos histológicos (Figura 10 e Tabela 6) observamos a seguinte mediana de sobrevida global em meses: epitelioide 13,86 meses; sarcomatoide 9,86 meses; bifásico 20,61 meses; e papilífero bem diferenciado de 54,36 meses.

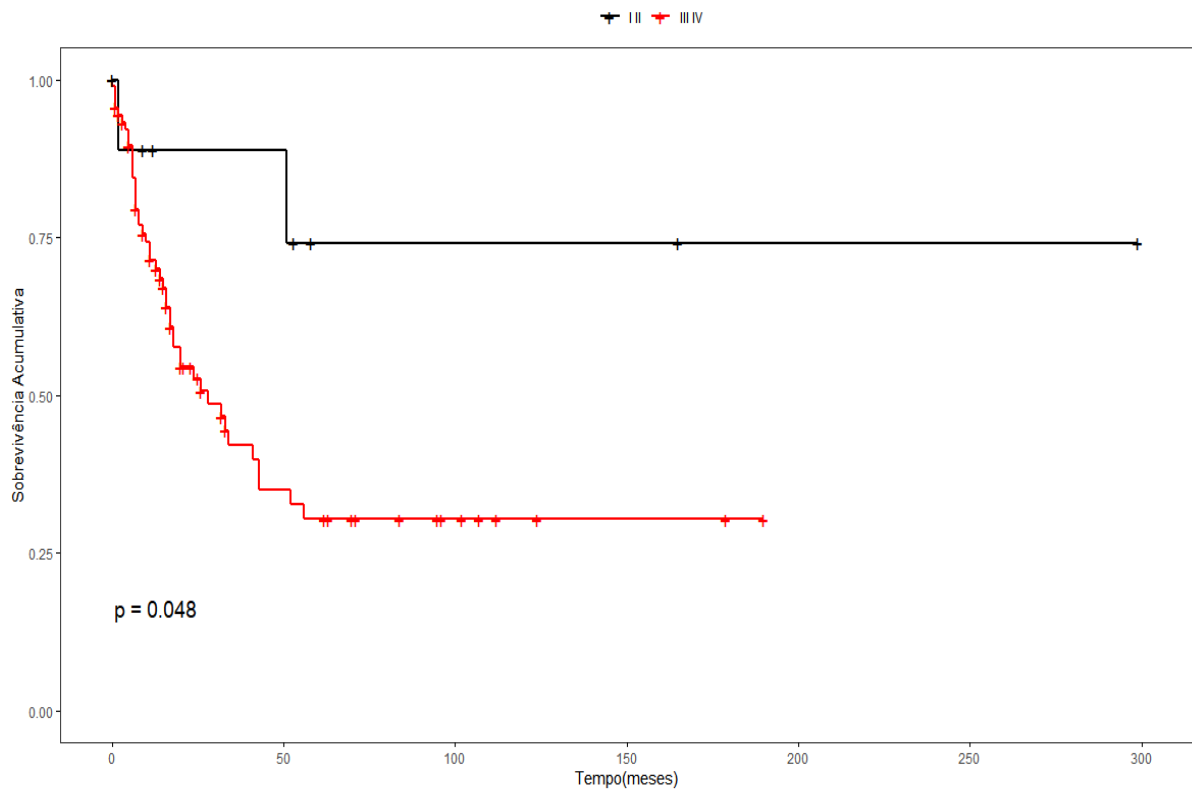


**Figura 10** - Gráfico de sobrevida global por tipo histológico, comparando o tempo de sobrevida global em meses entre os pacientes participantes do estudo. *P-value obtido através do teste de Log-Rank no SPSS, consideramos como estatisticamente significantes  $p < 0.05$ .*

**Tabela 6** - Tempo médio e máximo de sobrevida global (em meses) segmentado por tipo histológico do tumor.

Histologia	Mediana (meses)
Epitelioide	13,86
Sarcomatoide	9,86
Bifásico	20,61
Papilífero bem diferenciado	54,36

Ao analisarmos a sobrevida global dos portadores de mesotelioma maligno por estadiamento (Figura 11) vemos as seguintes médias: Estágio I - 54,36 meses; estágio II - 72,78 meses; estágio III - 29,13 meses; estágio IV - 28,31 meses. Em suma, nossos dados mostram que pacientes com estágios I e II da doença possuem maior média de sobrevida global.

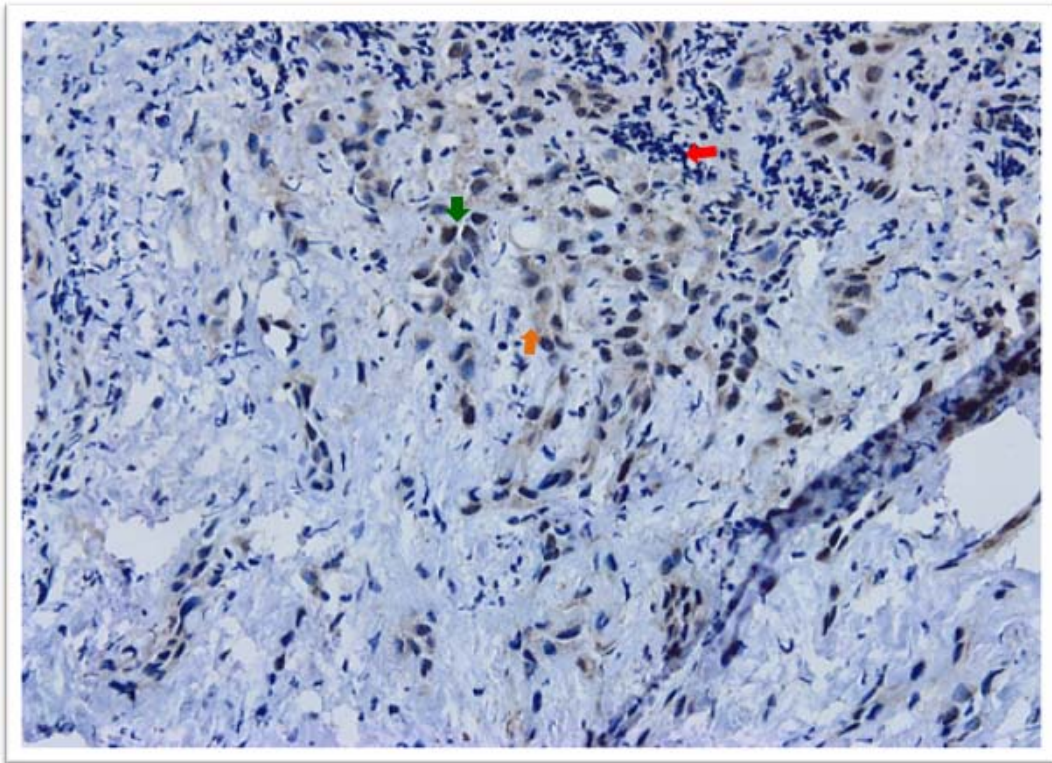


**Figura 11** - Gráfico de sobrevivência global de pacientes portadores de mesotelioma maligno por estadiamento (I + II; e III + IV). *p*-value obtido através do teste de Log-Rank no SPSS, consideramos como estatisticamente significantes  $p < 0.05$ .

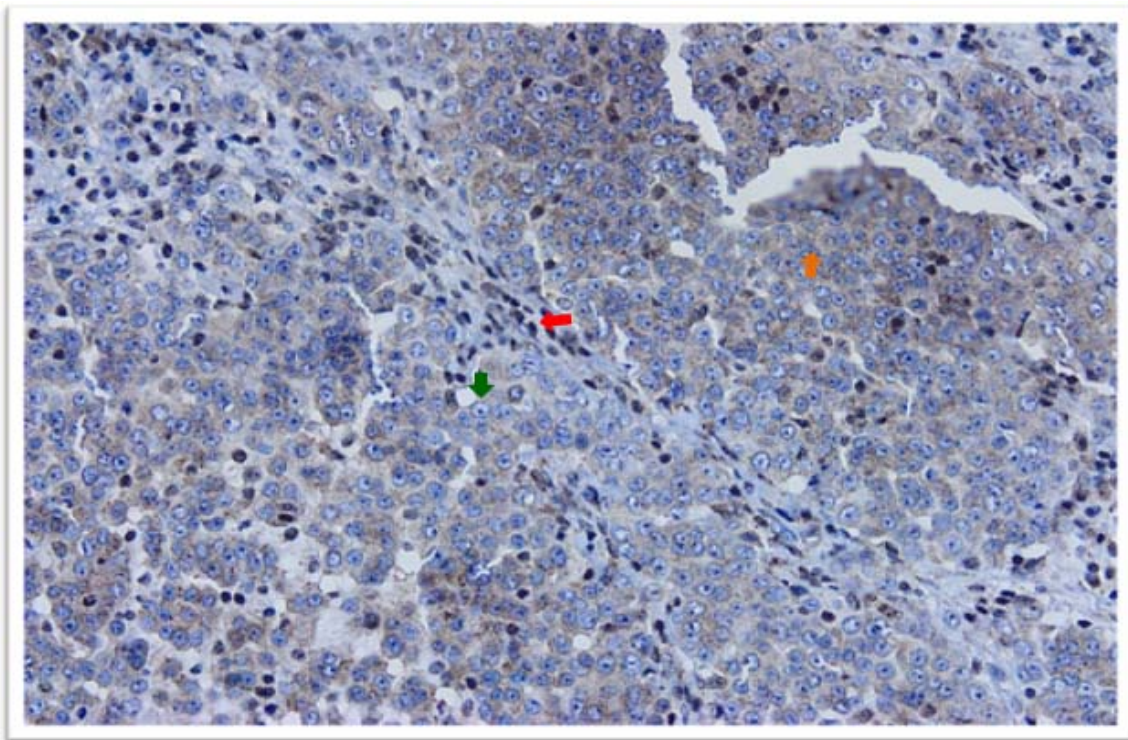
#### 4.1.1 Avaliar a perda de expressão da proteína BAP-1 no TMA e outros biomarcadores

Para a construção do TMA, foi possível recuperar 107 blocos de parafina com amostras de tecidos tumorais (cirurgia e/ou biópsia). Alguns impasses foram levados em consideração ao montar e trabalhar com este TMA: a dificuldade em rastrear e resgatar as amostras parafinadas de todos os pacientes que compõe nossa coorte, o tempo de armazenamento do material parafinado (que pode influencia diretamente na qualidade destes), e materiais externos com diferentes protocolos para confecção dos blocos e armazenamento.

Uma vez que o TMA se encontrou pronto, realizamos a reação de IHQ para BAP-1. Nela, de 107 amostras: 48 apresentaram expressão da proteína BAP-1 preservada (ilustrada na Figura 12), 35 apresentaram perda de expressão característica de alteração no gene *BAP1* (ilustrada na Figura 13) e 24 foram considerados indeterminados. É importante ressaltar a dificuldade em se trabalhar com este anticorpo, também reportado por outros autores<sup>65-67</sup>.



**Figura 12** - Imagem ilustrativa de expressão nuclear de BAP-1 preservada (seta verde), contendo marcação preservada nas células inflamatórias (utilizadas como controle endógeno) (seta vermelha), e background citoplasmático do anticorpo (seta laranja).



**Figura 13** - Imagem ilustrativa de perda de expressão nuclear de BAP-1 (seta verde), contendo marcação preservada nas células inflamatórias (utilizadas como controle endógeno) (seta vermelha), e background citoplasmático do anticorpo (seta laranja).

As demais reações de imunohistoquímica foram feitas antes da montagem do TMA e em lâminas individuais a partir de novos cortes dos blocos que tivemos acesso. Foram necessários realizar novas reações de imunohistoquímica com os 5 marcadores imunohistoquímicos utilizados pelo departamento de rotina de IHQ do hospital (WT-1, podoplanina, p53, antígeno epitelial - BerEP4, citoqueratina AE1/AE3) para 105 dos 159 casos de mesotelioma maligno que compõe nossa coorte, afim de se obter a confirmação diagnóstica (Tabela 7).

É possível observar que mais de 50% dos marcadores WT1, BerEP4 (marcador negativo) e podoplanina colaboraram para o indicativo de malignidade. A baixa frequência inicial (94,33%) das reações para BAP-1 na rotina da instituição nos incentivou a adicioná-lo nos objetivos do nosso trabalho.

**Tabela 7** - Resultado da coleta de dados imunohistoquímicos em pacientes portadores de mesotelioma maligno atendidos no A.C.Camargo Cancer Center. Dados apresentados em porcentagem e em números absolutos para facilitar a compreensão.

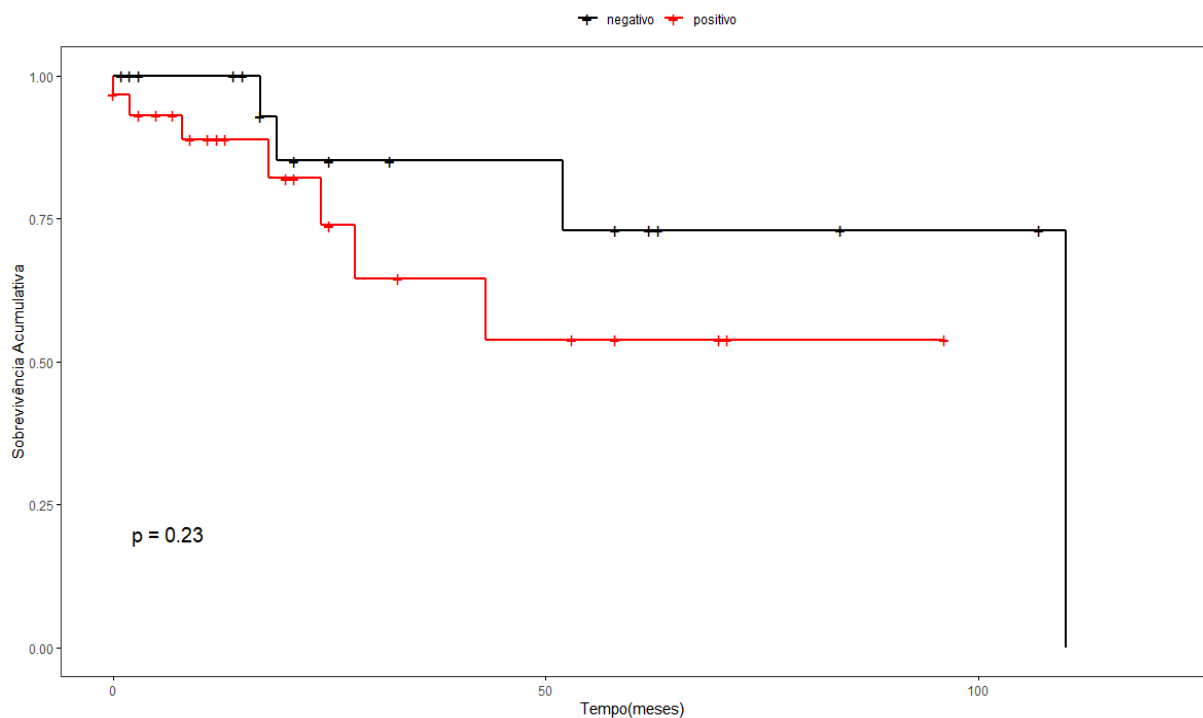
Proteína	Resultado	N	%
<b>WT1</b>	Positivo	87	79,81%
	Negativo	22	20,18%
<b>BerEP4</b>	Positivo	10	10,20%
	Negativo	88	89,79%
<b>P53</b>	Positivo	19	39,58%
	Negativo	29	60,41%
<b>Citoqueratina AE1/AE3</b>	Positivo	76	96,2%
	Negativo	3	3,79%
<b>BAP-1</b>	Positivo	30	58,82%
	Negativo	21	41,17%

Ao correlacionarmos a perda de expressão de BAP-1 com aspectos clínicos como histologia do tumor, tempo de sobrevida global e topografia do mesotelioma encontramos o seguinte (Tabela 8): 95,2% (N=20) dos casos em que houve perda de expressão de BAP-1 eram de histologia epitelioide; pacientes que apresentaram perda de expressão de BAP-1 tiveram maior mediana de sobrevida (38,44 meses) do que em pacientes que apresentaram expressão preservada da proteína (23,2 meses) (Figura 14). Quanto a topografia e BAP-1, essas variáveis não se correlacionam, uma vez que encontramos porcentagem similar tanto em casos de perda de expressão (75% peritoniais e 25% pleurais) como em casos de expressão preservada desta proteína (76,7% peritoniais e 23,3% pleurais), com p valor igual a 1.

**Tabela 8** - Relação entre dados clínicos e expressão da proteína BAP-1. Média de sobrevida global em dias, topografia e histologia em %, comparado com a ausência ou presença da expressão de BAP-1 pela reação de IHQ \*.

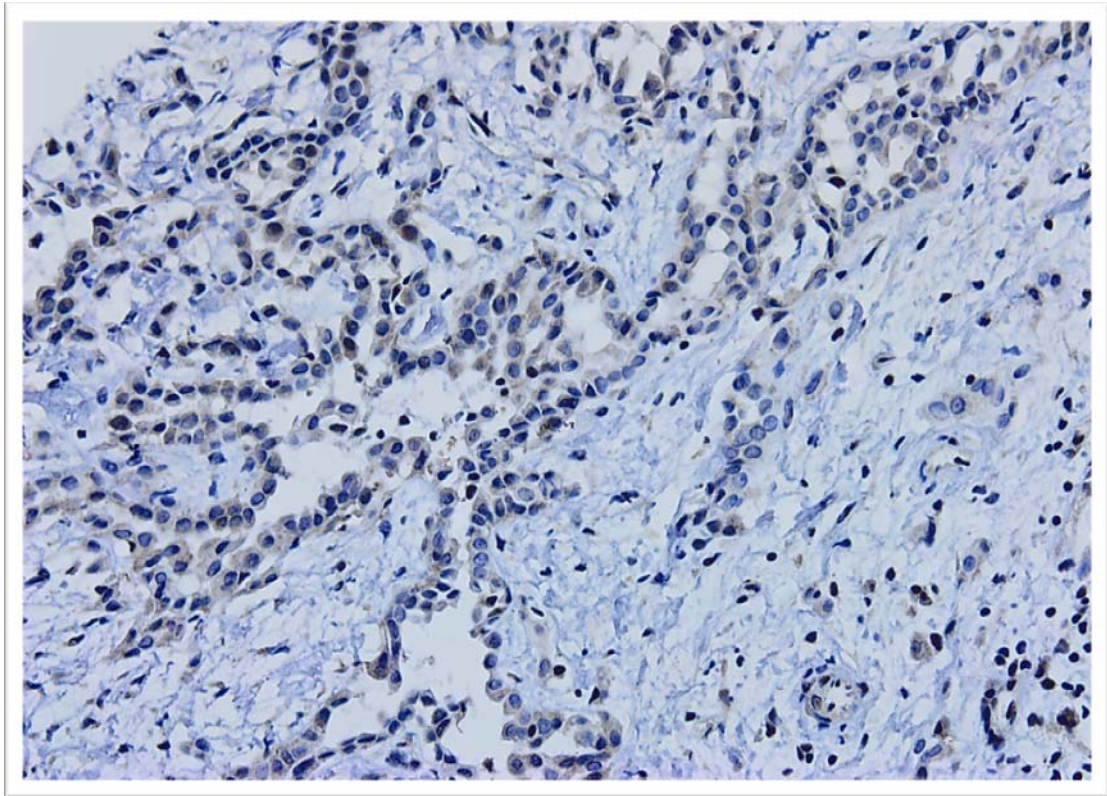
Relação entre dados clínicos e expressão da proteína BAP-1			
	Expressão preservada	Perda de expressão	Teste X <sup>2</sup> (p-value) *
<b>Mediana da sobrevida Global (Em meses)</b>	23,2	38,44	1.484
<b>Topografia (em %)</b>			
Pleural	23,3%	25%	1
Peritoniais	76,7%	75%	
<b>Histologia do Tumor (em %)</b>			
Epiteloide	83,3%	95,2%	0.692
Bifásico	6,7%	4,8%	
Sarcomatoide	6,7%	-	
Papilífero bem diferenciado	3,3%	-	

\*p-value do teste de qui-quadrado de Fisher ( $p < 0.05$ ).



**Figura 14** - Sobrevida Global em meses de acordo com o resultado da avaliação de BAP-1. p-value obtido através do teste de Log-Rank no SPSS, consideramos como estatisticamente significantes  $p < 0.05$ .

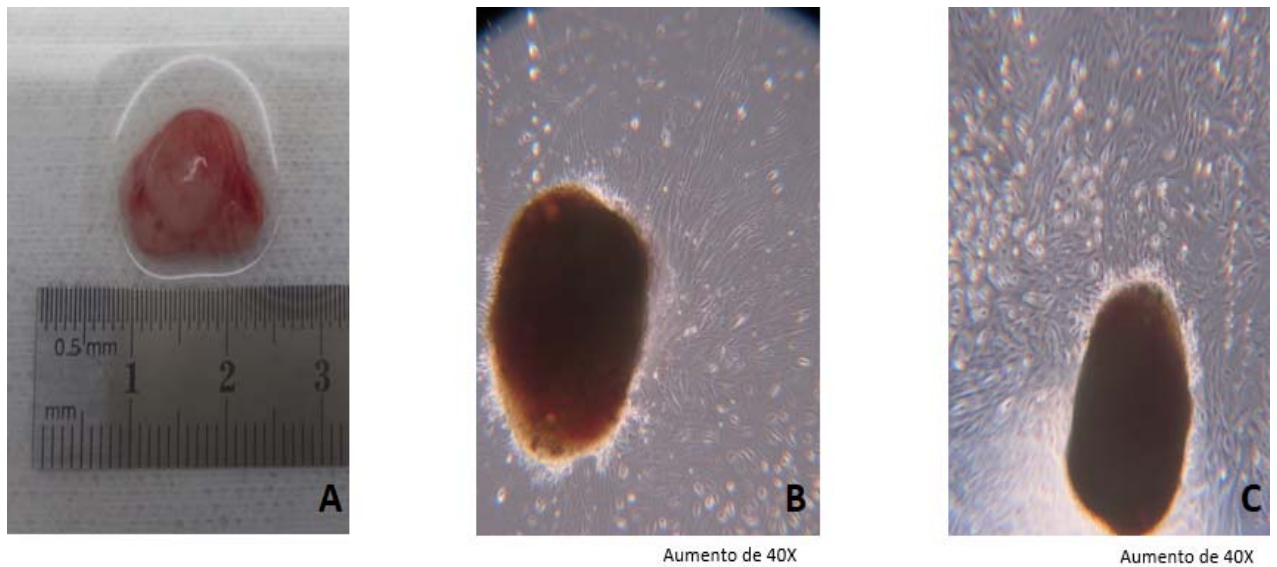
Curiosamente, durante nossa análise do TMA, nos deparamos com um padrão de preservação da expressão proteica de BAP-1 em subtipos histológicos epiteliais com padronagem papilífera (Figura 15). Entretanto, não encontramos descrições semelhantes na literatura.



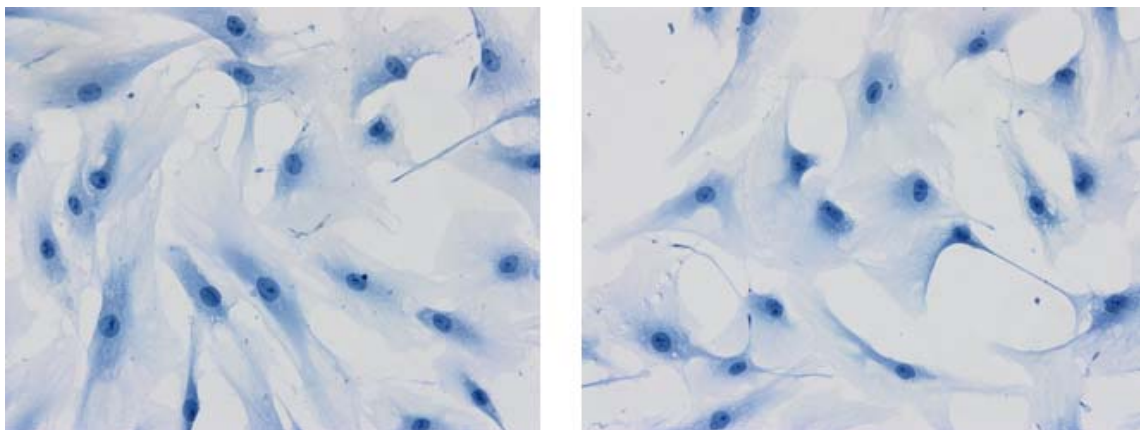
**Figura 15** - Ilustração da padronagem papilífera em mesotelioma maligno de histologia epitelioide com expressão preservada de BAP-1.

#### **Criar e caracterizar linhagem de mesotelioma para estudos moleculares e descrição dos casos prospectivos**

Para a utilização neste estudo foram coletados materiais de cinco casos de mesotelioma maligno atendidos e ressecados na instituição. Os fragmentos das peças cirúrgicas foram utilizados para a criação de xenoinxertos (projeto de mestrado do aluno de Adriano Beserra, do mesmo laboratório) e culturas celulares (Figuras 16 e 17). As amostras de tumores geraram mais de 3 fragmentos, sendo assim, alguns fragmentos foram congelados, quanto outros foram mantidos em cultura para a criação de linhagens celulares. As células foram avaliadas quanto à expressão de marcadores de mesotelioma, vias de sinalização, e aspectos morfológicos.



**Figura 16** - Fragmentos de peças cirúrgicas em diferentes estágios de adesão à placa de cultura. Em A vemos a amostra coletada e disponibilizada pelo centro cirúrgico. Em B e C vê-se a amostra já fragmentada, com o fragmento desagregando células em diferentes dias de cultivo.



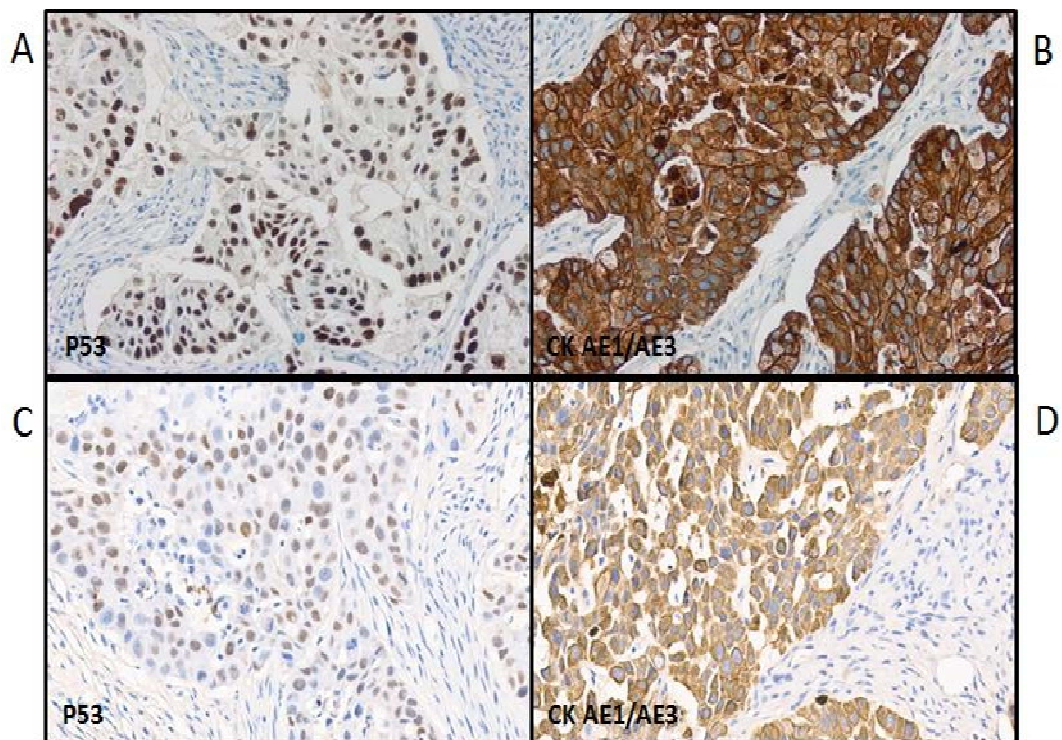
**Figura 17** - Células de cultura primária de mesotelioma maligno pleural epitelióide coradas com hematoxilina.

No braço prospectivo deste estudo contamos com 5 casos de mesoteliomas malignos com características diferentes entre si. A seguir descrevemos informações coletadas de laudos e prontuários que consideramos relevantes para a compreensão de cada caso. Em sequência também mostramos resultados dos ensaios de expressão proteica relativos a cada paciente.

**Caso 1:** Paciente do sexo feminino, autodeclarada parda, diagnosticada com mesotelioma pleural maligno de histologia epiteloide aos 61 anos de idade, sem exposição ao asbesto, sem histórico familiar de câncer, paciente desenvolveu outra neoplasia posterior ao diagnóstico (adenocarcinoma de pulmão), não relatou perda de peso, apresentou ECOG 2, ex-fumante, não etilista, relatou dor como sintoma inicial, portadora de cirrose biliar, estadiamento III, T3N0M0, passou por cirurgia, radioterapia e quimioterapia sistêmica (quatro ciclos de cisplatina + pemetrexed), apresentou recidiva e progressão local da doença, se encontrava viva no último segmento em 17/06/2020.

Quando avaliados em relação à expressão de biomarcadores imuno-histoquímicos, observou-se que citoqueratina 7, p63, calretinina, BAP-1 foram positivos.

Realizamos com sucesso o xenoenxerto em modelo murino e cultura primária de PDX desde 01/04/2017. Realizamos reações de IHC em xenoenxertos derivados de pacientes como pode-se observar na Figura 18, comparando as marcações de IHQ em tecido derivado diretamente do paciente (A e B) com a sexta passagem em um camundongo NSG (C e D), onde vemos a preservação da marcação original, porém em menor intensidade.



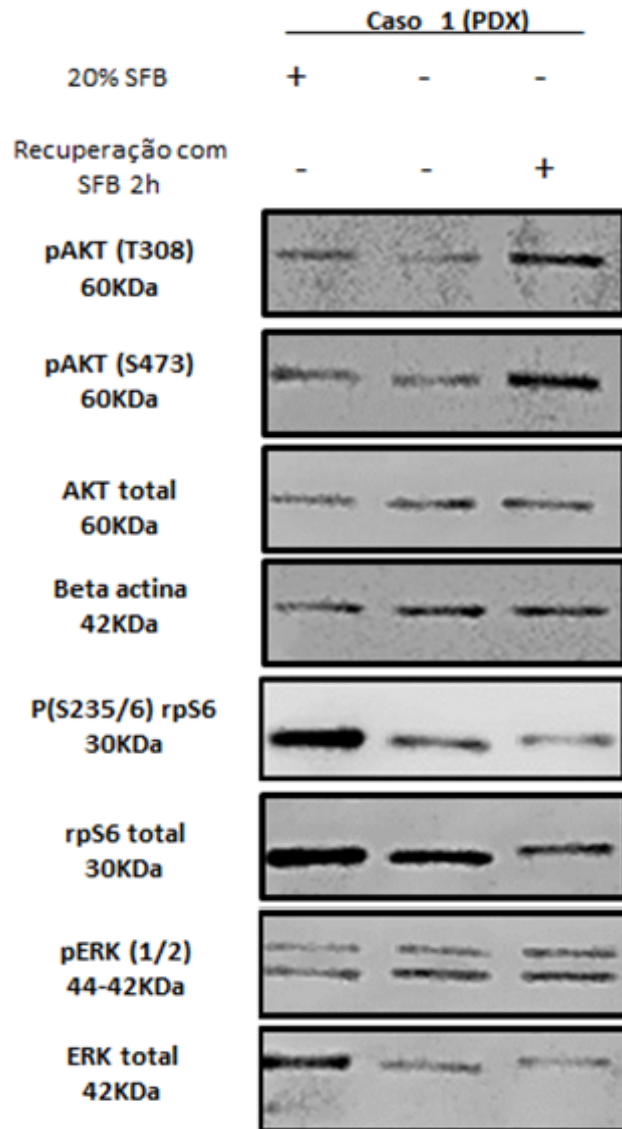
**Figura 18** - Reações IHC em tecido humano e PDX. A e B ilustram reações de imunohistoquímicas em tecido derivado diretamente de tumor, com marcação para P53 (A) e citoqueratina AE1/AE3 (B); e em C e D as mesmas reações em tecidos de camundongos NSG na sexta passagem do mesmo tumor, com os mesmos marcadores



A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR é alvo de diversos estudos na área de oncologia, pois a ativação desta via está diretamente relacionada à pontos importantes de tumorigênese como: na regulação do crescimento celular, biossíntese de proteínas, e proliferação celular.

As células do caso 1 foram submetidas a diferentes tratamentos para a determinação de expressão e ativação de proteínas relacionadas a processos biológicos importantes para a tumorigênese, como a sinalização celular. Em um primeiro momento, foram avaliadas proteínas da via de PI3K/mTOR em células em crescimento exponencial, privadas de fatores de crescimento (carenciadas) ou estimuladas com fatores de crescimento (SFB). O padrão esperado é que células normais apresentem uma redução na atividade das proteínas da via quando carenciadas e uma ativação da via de sinalização após o tratamento com SFB. Alterações neste padrão podem indicar falhas nos mecanismos de progressão, e regulação do ciclo celular.

No experimento relacionado ao caso 1 (Figura 19) observa-se que a expressão das proteínas pAKT (com ambos resíduos) e pERK foi maior quando recuperadas com SFB, indicando o funcionamento normal desta via. Entretanto, as proteínas relacionadas a rpS6, assim como ERK total, foram expressas em maiores quantidades quando estimuladas com SFB em estado de crescimento exponencial. Beta-actina foi utilizada como controle endógeno.



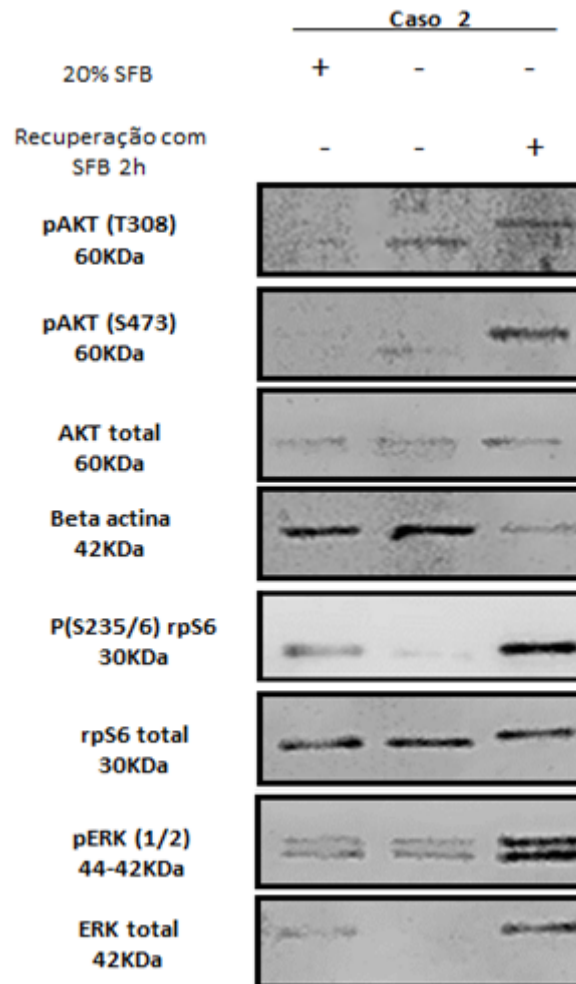
**Figura 19** - *Western Blot* das células de mesotelioma caso 1 (PDX) em três condições: crescimento exponencial; carenciadas; e recuperadas com soro fetal bovino por 2h. Todas amostras estavam na concentração de 15µg, gel de poliacrilamida a 10%.

**Caso 2:** Paciente do sexo masculino, autodeclarado branco, diagnosticado com mesotelioma pleural maligno de histologia epitelióide, aos 70 anos de idade, sem exposição ao asbesto, com histórico familiar de câncer (não mesotelioma), sem outras neoplasias, ECOG 1, ex-fumante, relatou tosse e achado radiológico como principais sintomas iniciais, hipertenso e portador de hiperuricemia, de estadiamento III, T4N2M0, passou por cirurgia e 2 linhas de tratamento quimioterápico (a primeira com quatro ciclos de cisplatina+ pemetrexed), sem recidiva, e com doença estável, se encontrava vivo no último segmento em 14/05/2019.

Quando avaliados em relação à expressão proteica, os marcadores imunohistoquímicos positivos foram: citoqueratina AE1/AE3, calretinina, podoplanina, WT-1, citoqueratina 7.

Realizamos com sucesso a cultura primária de células e xenoinxerto em modelo murino desde 20/04/2018.

No experimento relacionado ao caso 2 (Figura 20), vemos que as proteínas pAKT (T308), pAKT(S473), P(S235/6) rpS6, pERK e ERK total seguem o padrão de expressão esperado (mencionado anteriormente). Entretanto, não é possível afirmar o mesmo sobre a detecção de AKT total devido à qualidade das imagens. RpS6 total manteve o mesmo padrão de expressão proteica em todas as condições testadas.



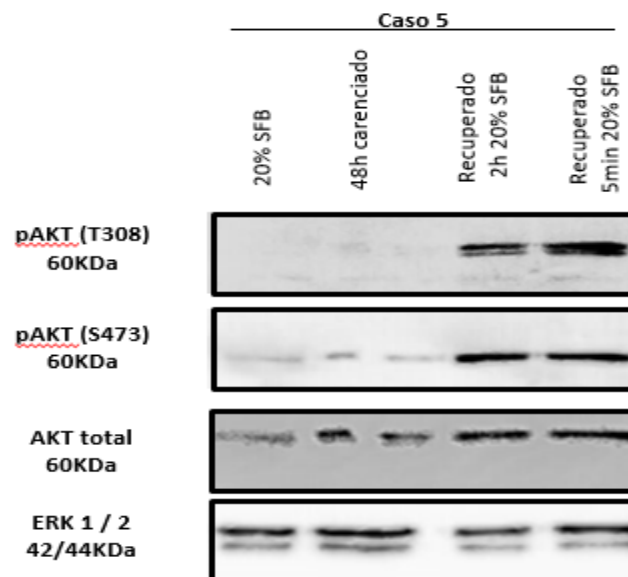
**Figura 20** - *Western Blot* das células de mesotelioma caso 2 em três condições: crescimento exponencial; carenciadas; e recuperadas com soro fetal bovino por 2h. Todas amostras estavam na concentração de 15µg, gel de poliacrilamida a 12%

**Caso 5:** Paciente do sexo feminino, autodeclarada branca, diagnosticada com mesotelioma peritoneal maligno de histologia epitelioide aos 52 anos de idade, sem exposição ao asbesto, sem histórico familiar de câncer, com presença de outra neoplasia benigna, apresentou perda de peso maior que 10%, ECOG 1, não tabagista, não etilista, relatou dor como sintoma inicial, hipertensa e portadora de dislipidemia, de estadiamento IV, passou por cirurgia e quimioterapia HIPEC (doxorrubicina + cisplatina), sem recidiva e sem progressão, apresentou resposta completa, se encontrava viva no último segmento em 03/08/2020.

Quando avaliados em relação à expressão proteica, os marcadores imunohistoquímicos positivos foram: calretinina, podoplanina, WT-1.

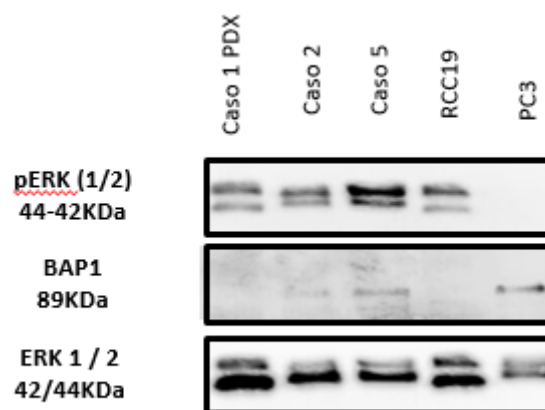
Realizamos a cultura primária de células e xenoenxerto em modelo murino desde 15/05/2019, porém obtivemos sucesso apenas no estabelecimento da cultura primária de células tumorais humana.

No experimento relacionado ao caso 5 (Figura 21), as proteínas AKT total e pAKT (em ambos resíduos) seguem o padrão de expressão esperado. Embora ERK1/2 tenha sido expresso da mesma forma nas três condições. Este experimento está incompleto e requer o estudo das demais proteínas citadas anteriormente.



**Figura 21** - *Western Blot* do extrato celular das células de mesotelioma caso 5 em três condições: crescimento exponencial; carenciadas por 45h; e recuperadas com soro fetal bovino por 2h e 5 minutos. Todas as amostras estavam na concentração de 15µg, gel de poliácilamida a 10%.

Para fins de comparação entre as linhagens estabelecidas em cultura em relação à expressão da proteína BAP-1, e para análise da integridade do gene *BAP1*, realizamos um ensaio de *western blot* com extrato celular de todas as células (Figura 22) e incubamos com anti-BAP1. Foi possível observar que o controle positivo (linhagem PC3) apresentou banda, assim como o caso 5 e o caso 2. É importante ressaltar que a mutação do gene *BAP1* geralmente implica na perda de expressão proteica, ou seja, a presença de banda implica na integridade do gene.



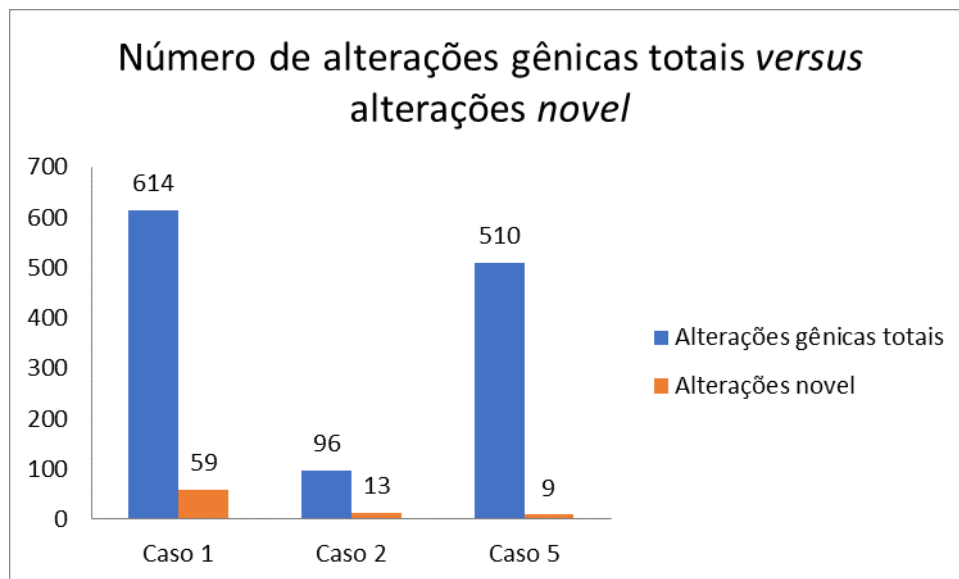
**Figura 22** - Western Blot de extratos celulares de todos os casos de mesotelioma maligno em cultura, em situação exponencial. Todas amostras estavam na concentração de 30µg, gel de poliacrilamida a 8%. RCC19= linhagem celular de carcinoma de células renais utilizada para testar a expressão de BAP1. PC3= linhagem celular controle para BAP1.

No tópico a seguir apresentamos os resultados do sequenciamento, que refletem diretamente os resultados dos ensaios de vias de sinalização. Então, com a ausência e/ou diminuição da expressão proteica de BAP-1 no caso 1 e no caso 2, esperava-se encontrar e identificar alguma alteração no gene *BAP*.

#### 4.1.2 Sequenciamento das amostras

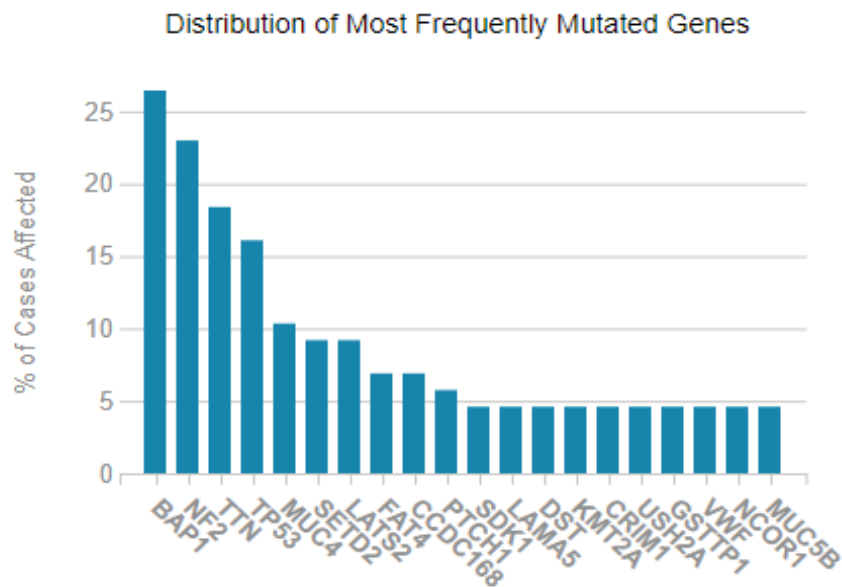
O resultado do sequenciamento de 3 casos (caso 1, caso 2 e caso 5) de mesoteliomas malignos que passaram por cirurgia no A.C.Camargo Cancer Center revelou inúmeras alterações somáticas.

A partir do resultado do sequenciamento, utilizamos 3 critérios de inclusão para a seleção de alterações genéticas (Figura 23) a serem destacadas neste trabalho (*novel* - inédita e não descrita; ter potencial maligno; estar presente em amostra de tecido e em células ou tecido e PDX). Os critérios servem para garantir a confiabilidade do resultado e filtrar alterações irrelevantes para o processo tumoral visando o foco deste estudo, pois assim consegue-se distinguir alterações já descritas, e permite comprovar que as mutações destacadas são de fato oriundas do tecido tumoral.



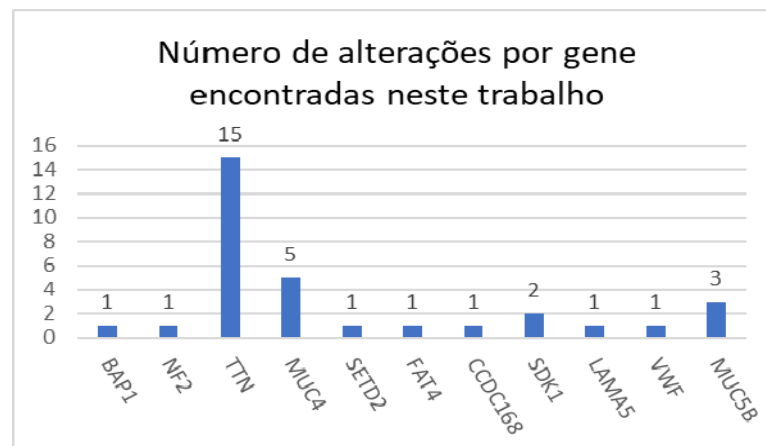
**Figura 23** - Número de mutações totais por caso versus que atendem aos critérios: *novel*; ter potencial maligno; estar presente em amostra de tecido e em células ou amostra de tecido e PDX.

Dentre os genes mais comumente alterados em mesoteliomas malignos de acordo com o TCGA (Figura 24), identificamos a presença de 11 deles em nossas amostras (Figura 25): *BAP1*, *NF2*, *TTN*, *MUC4*, *SETD2*, *FAT4*, *CCDC168*, *SDK1*, *LAMA5*, *VWF*, *MUC5B*.



Fonte: TCGA <sup>76</sup>

**Figura 24** - Distribuição dos genes frequentemente alterados em casos de mesotelioma disponíveis no TCGA.



**Figura 25** - Número total de mutações por gene (somatória dos três casos) encontrados neste trabalho em relação aos 20 genes mais frequentemente alterados de acordo com TCGA.

**Caso 1:** No caso 1 foram encontrados 59 (Tabela 9) genes com mutações não descritas na literatura (*novel*). Todas as alterações encontradas no caso 1 são variantes de nucleotídeo único (do inglês, *Single-Nucleotide Variant* - SNV), do tipo *missense* e de impacto moderado. Apenas 21 destes genes possuem papel relacionado aos cânceres já elucidados e descritos na literatura; a maioria ainda não possui função determinada.

**Tabela 9** - Alterações gênicas encontradas por sequenciamento do caso 1 que se enquadravam nos critérios de inclusão.

Gene	Localização	Frequência alélica	Número de leituras totais (pb)	Tipo de mutação	Impacto	Tumores relacionados	Função do gene no câncer
<b>ABCB1</b>	c.3539A>T   p.Gln1180Leu	0.44	141	<i>Missense</i>	Moderado	Ovário, estômago e mama <sup>78-80</sup>	Resistência à quimioterapia
<b>ABCC12</b>	c.3602C>T   p.Pro1201Leu	0.06	74	<i>Missense</i>	Moderado	Mama, Estômago, Pulmão e colorretal <sup>81-82</sup>	Resistência à quimioterapia
<b>ADGRA 1</b>	c.1283G>T   p.Arg428Leu	0.55	105	<i>Missense</i>	Moderado	Fígado, Pele <sup>83</sup>	Indeterminado
<b>AGBL5</b>	c.1643C>G   p.Ser548Cys	0.56	131	<i>Missense</i>	Moderado	Fígado, Cérebro, Rim <sup>84-86</sup>	Indeterminado
<b>AQP4</b>	c.397C>A   p.Leu133Ile	0.08	98	<i>Missense</i>	Moderado	Pulmão, Estômago, Mama <sup>87-89</sup>	Indeterminado
<b>ATP11C</b>	c.2531C>A   p.Ala844Glu	0.04	83	<i>Missense</i>	Moderado	Fígado, Pulmão, Ovário <sup>90-92</sup>	Indeterminado
<b>BOP1</b>	c.2024A>T   p.Tyr675Phe	0.62	432	<i>Missense</i>	Moderado	Fígado, Colorretal, Pele <sup>93-95</sup>	Oncogene
<b>BPIFB3</b>	c.1275A>T   p.Glu425Asp	0.1	160	<i>Missense</i>	Moderado	Pele, Osso <sup>96,97</sup>	Indeterminado
<b>CACNA1 F</b>	c.1936G>T   p.Val646Leu	0.11	42	<i>Missense</i>	Moderado	Mama, Colorretal, Linfoma, Ovário, Bexiga <sup>98,99</sup>	Indeterminado
<b>CACNG4</b>	c.344C>T   p.Thr115Ile	0.54	388	<i>Missense</i>	Moderado	Mama, Bexiga, Ovário <sup>100-102</sup>	Indeterminado
<b>CCDC14 9</b>	c.25G>A   p.Asp9Asn	0.07	53	<i>Missense</i>	Moderado	Tireoide, Fígado, Mama <sup>103-105</sup>	Indeterminado
<b>CHODL</b>	c.290G>T   p.Gly97Val	0.16	68	<i>Missense</i>	Moderado	Fígado, Pulmão, Colorretal <sup>106-108</sup>	Indeterminado
<b>CHRM5</b>	c.590C>G   p.Thr197Ser	0.45	255	<i>Missense</i>	Moderado	Mama, Cólon, Ovário <sup>109-111</sup>	Indeterminado
<b>CHST1</b>	c.679C>G   p.Leu227Val	0.08	243	<i>Missense</i>	Moderado	Bexiga, Colorretal, Pulmão <sup>112-114</sup>	Indeterminado
<b>DNAJC1 3</b>	c.1607C>T   p.Thr536Ile	0.08	57	<i>Missense</i>	Moderado	Mama, Pele, Pulmão <sup>115-117</sup>	Indeterminado
<b>EDDM1 3</b>	c.473G>A   p.Cys158Tyr	0.37	85	<i>Missense</i>	Moderado	Ovário, Próstata <sup>118</sup>	Indeterminado
<b>ERMP1</b>	c.272C>T   p.Ser91Leu	0.95	48	<i>Missense</i>	Moderado	Endométrio, Mama, Fígado <sup>119-121</sup>	Indeterminado
<b>FANCM</b>	c.3391G>T   p.Asp1131Tyr	0.13	84	<i>Missense</i>	Moderado	Mama, Ovário, Peritônio <sup>118,122,123</sup>	Reparo de DNA
<b>FLG</b>	c.5578G>C   p.Gly1860Arg	0.57	353	<i>Missense</i>	Moderado	Pulmão, Útero, Mama <sup>124-126</sup>	Proto-oncogene



## Cont/Tabela 9

Gene	Localização	Frequência a alélica (%)	Número de leituras totais (pb)	Tipo de mutação	Impacto	Tumores relacionados	Função do gene no câncer
<b>FRAS1</b>	c.9951G>T   p.Gln3317His	0.61	94	Missense	Moderado	Pulmão, Mama, Estômago <sup>127-129</sup>	Indeterminado
<b>GCNT7</b>	c.1156T>A   p.Ser386Thr	0.04	70	Missense	Moderado	Estômago, Pulmão <sup>130</sup>	Indeterminado
<b>GLI2</b>	c.2711C>T   p.Pro904Leu	0.44	61	Missense	Moderado	Pulmão, Estômago, Mama, Pele <sup>131</sup>	Indeterminado
<b>GP2</b>	c.1172C>A   p.Thr391Asn	0.17	110	Missense	Moderado	Mama, Pâncreas, Ovário <sup>132</sup>	Indeterminado
<b>GPR15</b>	c.505C>A   p.Leu169Ile	0.09	96	Missense	Moderado	Intestino, Estômago, Bexiga <sup>86,133,134</sup>	Indeterminado
<b>GRM5</b>	c.1529T>G   p.Val510Gly	0.06	101	Missense	Moderado	Pele, Próstata, Mama <sup>135-137</sup>	Indeterminado
<b>HMCN2</b>	c.6986C>A   p.Ala2329Asp	0.45	77	Missense	Moderado	Próstata, Útero, Cérebro <sup>138,139</sup>	Indeterminado
<b>IGFBP6</b>	c.415A>T   p.Arg139Trp	0.78	38	Missense	Moderado	Músculo, Cólon, Cérebro <sup>140</sup>	Supressor tumoral
<b>INHBE</b>	c.734C>A   p.Pro245His	0.12	151	Missense	Moderado	Fígado, Pâncreas <sup>141,142</sup>	Supressor tumoral
<b>LRP2</b>	c.1066G>A   p.Gly356Arg	0.09	85	Missense	Moderado	Tireóide, Próstata, Colorretal <sup>143-145</sup>	Indeterminado
<b>LSM6</b>	c.22C>A   p.Pro8Thr	0.7	44	Missense	Moderado	Mama, Laringe, Fígado <sup>88,146,147</sup>	Oncogene
<b>MAPKBP1</b>	c.2980A>G   p.Ser994Gly	0.46	28	Missense	Moderado	Sangue e medula óssea, Pâncreas, Ovário <sup>148-150</sup>	Indeterminado
<b>MC3R</b>	c.515G>T   p.Cys172Phe	0.33	264	Missense	Moderado	Mama, Cólon, Pele <sup>151-153</sup>	Indeterminado
<b>MCMDC2</b>	c.1615G>A   p.Asp539Asn	0.75	70	Missense	Moderado	Mama, Ossos, Colorretal <sup>154-156</sup>	Reparo de DNA
<b>MXRA5</b>	c.6062G>A   p.Gly2021Asp	0.07	152	Missense	Moderado	Pulmão, Colorretal, Rim <sup>157,158</sup>	Adesão celular / supressor tumoral
<b>NRDE2</b>	c.1528C>A   p.Leu510Met	0.06	43	Missense	Moderado	Mama, Pele, Pâncreas, Esôfago <sup>159,160</sup>	Indeterminado
<b>OTOG</b>	c.8553G>T   p.Lys2851Asn	0.37	156	Missense	Moderado	Próstata, Sangue e Medula óssea, Cérebro <sup>138,161,162</sup>	Indeterminado

Cont/Tabela 9

Gene	Localização	Frequência alélica (%)	Número de leituras totais (pb)	Tipo de mutação	Impacto	Tumores relacionados	Função do gene no câncer
<b>PAK5</b>	c.1922C>G   p.Pro641Arg	0.05	68	Missense	Moderado	Rim, Mama, Fígado <sup>157,163,164</sup>	Migração e invasão celular/ promotor de metástase / oncogene
<b>PARN</b>	c.442G>A   p.Glu148Lys	0.19	42	Missense	Moderado	Estômago, Pâncreas, Pulmão <sup>165-167</sup>	Indeterminado
<b>PCDHB11</b>	c.338C>T   p.Pro113Leu	0.5	77	Missense	Moderado	Pele, Cabeça, Pescoço, Útero <sup>168,169</sup>	Indeterminado
<b>PLXNA4</b>	c.3850C>A   p.Arg1284Ser	0.06	194	Missense	Moderado	Pele, Pâncreas, Cérebro <sup>170</sup>	Progressão tumoral e angiogênese
<b>PTPRM</b>	c.623C>T   p.Ala208Val	0.85	87	Missense	Moderado	Pulmão, Mama, Útero <sup>171-173</sup>	Candidato a supressor tumoral
<b>RICTOR</b>	c.5023T>A   p.Cys1675Ser	0.05	70	Missense	Moderado	Pulmão, Próstata, Colorretal <sup>174-176</sup>	Proliferação, viabilidade e migração celular
<b>SDK2</b>	c.6166G>C   p.Gly2056Arg	0.35	155	Missense	Moderado	Mama, Pulmão, Ovário <sup>101,177,178</sup>	Adesão celular
<b>SMAD6</b>	c.391G>C   p.Glu131Gln	0.58	24	Missense	Moderado	Pâncreas, Pulmão, Colorretal <sup>179-181</sup>	Indeterminado
<b>SNX11</b>	c.5G>T   p.Gly2Val	0.09	51	Missense	Moderado	Estômago, Mama, Colorretal <sup>182-184</sup>	Indeterminado
<b>SRD5A1</b>	c.561G>T   p.Arg187Ser	0.09	44	Missense	Moderado	Mama, Útero, Próstata <sup>185-187</sup>	Indeterminado
<b>SYNGR1</b>	c.306G>T   p.Lys102Asn	0.35	241	Missense	Moderado	Bexiga, Mama, Ovário <sup>188,189</sup>	Indeterminado
<b>TAP2</b>	c.685C>T   p.Leu229Phe	0.05	69	Missense	Moderado	Útero, Mama, Esôfago <sup>190-192</sup>	Candidato à supressor tumoral
<b>TEX2</b>	c.2206C>T   p.Pro736Ser	0.09	107	Missense	Moderado	Mama, Fígado, Boca <sup>136,193,194</sup>	Indeterminado
<b>TLL1</b>	c.1697G>T   p.Gly566Val	0.29	78	Missense	Moderado	Pancreas, fígado <sup>195,196</sup>	Indeterminado
<b>TMEM260</b>	c.970C>G   p.Leu324Val	0.18	27	Missense	Moderado	Estômago, Próstata, Sangue e Medula Óssea <sup>115,189,197</sup>	Indeterminado
<b>TNNT3</b>	c.524G>T   p.Arg175Leu	0.36	105	Missense	Moderado	Bexiga, Útero, Ovário <sup>102,198,199</sup>	Indeterminado

Cont/Tabela 9

Gene	Localização	Frequência alélica (%)	Número de leituras totais (pb)	Tipo de mutação	Impacto	Tumores relacionados	Função do gene no câncer
<b>TRPC5</b>	c.696G>C   p.Lys232Asn	0.07	156	<i>Missense</i>	Moderado	Mama, Rim, Cólon <sup>200-202</sup>	Modulador de senescência celular e resistência à drogas
<b>TUT1</b>	c.1798C>T   p.Arg600Cys	0.53	75	<i>Missense</i>	Moderado	Pulmão, Ossos, Bexiga, Boca <sup>203-206</sup>	Supressor tumoral / controle de expressão gênica e proliferação celular
<b>UNC79</b>	c.1998G>T   p.Trp666Cys	0.2	43	<i>Missense</i>	Moderado	Pâncreas, Fígado, Tireóide <sup>207-209</sup>	Indeterminado
<b>WDR53</b>	c.160G>T   p.Val54Phe	0.13	100	<i>Missense</i>	Moderado	Adenoide, Mama, Ovário <sup>210-212</sup>	Oncogene
<b>WDR62</b>	c.1010T>C   p.Leu337Pro	0.51	52	<i>Missense</i>	Moderado	Ovário, Bexiga, Pulmão <sup>213-215</sup>	Atua na proliferação e migração neuronal
<b>YTHDF1</b>	c.550G>A   p.Glu184Lys	0.02	210	<i>Missense</i>	Moderado	Colorretal, Pulmão, Fígado <sup>216-218</sup>	Oncogene
<b>ZNF728</b>	c.1094A>T   p.Glu365Val	0.1	68	<i>Missense</i>	Moderado	Pulmão, Colorretal, Estômago <sup>219-221</sup>	Indeterminado

**Caso 2:**

Identificamos 8 genes no caso 2 (Tabela 10) com mutações não descritas na literatura (*novel*). 7 delas são do tipo *missense*, 1 do tipo *frameshift* com deleção. Todas as alterações *missense* possuem impacto moderado, enquanto a *frameshift* possui de alto impacto. Apenas 2 destes genes possuem papel relacionado aos cânceres já elucidados e descritos na literatura; a maioria ainda não possui função determinada.

**Tabela 10** - Alterações gênicas encontradas por sequenciamento do caso 2 que se enquadravam nos critérios de inclusão.

<i>Gene</i>	Localização	Frequência alélica (%)	Número de leituras totais (pb)	Tipo de mutação	Impacto	Tumores relacionados	Função no câncer
<b>AMIGO1</b>	c.1171C>G   p.Leu391Val	0.47	107	<i>Missense</i>	Moderado	Estômago, Mama, Colorretal 173,222,223	Indeterminado
<b>BRCA2</b>	c.3240_3241 del   p.Asp1080fs	0.47	23	<i>Frameshift - deleção</i>	Alto	Mama, Ovário, Pâncreas <sup>224,225</sup>	Supressor tumoral
<b>DCC</b>	c.3595G>A   p.Gly1199Arg	0.51	93	<i>Missense</i>	Moderado	Colorretal, Estômago, Boca 226-228	Supressor Tumoral
<b>GAGE1</b>	c.251C>G   p.Thr84Ser	0.16	36	<i>Missense</i>	Moderado	Fígado, Tireóide, Cabeça e pescoço 229,230	Indeterminado
<b>SLC17A8</b>	c.1061T>A   p.Leu354His	0.31	74	<i>Missense</i>	Moderado	Pulmão, Fígado, Cólon 231-233	Indeterminado
<b>TNPO1</b>	c.1613T>A   p.Phe538Tyr	0.47	21	<i>Missense</i>	Moderado	Próstata, Fígado, Ovário 234-236	Indeterminado
<b>UCMA</b>	c.137A>C   p.Lys46Thr	0.53	99	<i>Missense</i>	Moderado	Mama <sup>237</sup>	Indeterminado
<b>ZP4</b>	c.767A>G   p.Glu256Gly	99	0.28	<i>Missense</i>	Moderado	Ovário, Próstata, Pele 238-240	Indeterminado

Interessantemente, o resultado do sequenciamento do caso 2 detectou uma alteração intrônica de alto impacto no gene *BAP1*. A mutação encontrada é a *BAP1* c.1730-2A>G, ela ocorre no sítio acceptor de *splice* na extremidade 3' do 13º intron e causa a substituição de adenina por guanina no cDNA entre as posições 1730 e 1732. Esta mutação já foi identificada anteriormente (ID COSV56236684 - COSMIC), e embora esteja localizada em um intron, achados semelhantes em *BAP1* sugerem que ela pode estar envolvida no processo de tumorigênese do mesotelioma pleural maligno por meio do desarranjo do *splicing* normal<sup>241,242</sup> e causar truncamento de proteína em melanoma uveal e melanoma cutâneo<sup>243</sup>.

**Caso 5:** No caso 5, constatamos 11 genes (Tabela 11) com mutações não descritas na literatura (*novel*), todas do tipo *missense* e de impacto moderado. Apenas 3 destes genes possuem papel relacionado aos cânceres já elucidados e descritos na literatura enquanto a maioria ainda não possui função determinada.

**Tabela 11** - Alterações gênicas encontradas por sequenciamento do caso 5 que se enquadravam nos critérios de inclusão.

<i>Gene</i>	Localização	Frequência alélica (%)	Número de leituras totais (pb)	Tipo de mutação	Impacto	Tumores relacionados	Função no câncer
<b>ACOT6</b>	c.358T>C   p.Tyr120His	0.47	68	<i>Missense</i>	Moderado	Rim <sup>244</sup>	Indeterminado
<b>ADCYAP1R1</b>	c.452T>C   p.Leu151Pro	0.57	208	<i>Missense</i>	Moderado	Mama, Próstata, cérebro <sup>245-247</sup>	Indeterminado
<b>ARRDC4</b>	c.841A>G   p.Ile281Val	0.5	105	<i>Missense</i>	Moderado	Pulmão, Estômago, Cólon <sup>248-250</sup>	Indeterminado
<b>BOP1</b>	c.671T>C   p.Val224Ala	0.5	92	<i>Missense</i>	Moderado	Fígado, Colorretal, Pele <sup>93-95</sup>	Oncogene
<b>CDX1</b>	c.502G>A   p.Glu168Lys	0.42	95	<i>Missense</i>	Moderado	Cólon, Colorretal, Estômago, Intestino <sup>251,252</sup>	Supressor Tumoral
<b>ETFDH</b>	c.1388G>A   p.Gly463Asp	0.45	102	<i>Missense</i>	Moderado	Fígado, Bexiga, Colorretal <sup>82,253,254</sup>	Indeterminado
<b>GABRA6</b>	c.402A>T   p.Lys134Asn	0.41	137	<i>Missense</i>	Moderado	Cólon, Cérebro, Ovário <sup>255,256</sup>	Indeterminado
<b>KPNA7</b>	c.914G>T   p.Arg305Leu	0.3	94	<i>Missense</i>	Moderado	Pâncreas, Mama <sup>257,258</sup>	Candidato a oncogene
<b>PCCA</b>	c.1759G>A   p.Gly587Arg	0.56	72	<i>Missense</i>	Moderado	Estômago, colorretal <sup>259</sup>	Indeterminado
<b>SBF1</b>	c.2687T>C   p.Val896Ala	0.48	162	<i>Missense</i>	Moderado	Cabeça e pescoço, mama, ovário <sup>260-262</sup>	Potencial supressor tumoral
<b>TM9SF3</b>	c.1265G>A   p.Gly422Asp	0.51	74	<i>Missense</i>	Moderado	Mama, Estômago <sup>263-265</sup>	Indeterminado

## 5 DISCUSSÃO

É de suma importância destacar que o maior viés deste estudo, assim como grande parte dos estudos retrospectivos, é a dificuldade de recuperar dados de prontuários, e a existência de dados omissos, assim como dados epidemiológicos autodeclarados, que pode afetar sua confiabilidade. Fatores como paciente não tem conhecimento sobre o termo “asbesto”, as informações foram coletadas por diversos funcionários diferentes que não passaram por treinamento específico para este trabalho, alguns prontuários possuem mais de 40 anos (tornando quase impossível a extração de dados do mesmo) e alguns prontuários se encontravam incompletos.

O mesotelioma maligno é um tumor altamente agressivo que se apresenta em diferentes topografias sendo as mais comuns pleural e peritônio <sup>1</sup>. A exposição ao asbesto é conhecida como o principal fator relacionado ao desenvolvimento do mesotelioma maligno, apresentando a maior incidência de tumores ocupacionais, ou seja, relacionado ao ambiente e condições de trabalho. Dentre as doenças causadas por condições de trabalho, o câncer de pulmão é o mais prevalente (entre 54 e 75%). A inalação de asbesto é o responsável por 55 a 85% destes cânceres de pulmão <sup>266</sup>. Um estudo realizado no Brasil abrangendo três décadas (de 1980 a 2010), demonstrou que a taxa de mortalidade do mesotelioma chegou a alcançar 1,18 por milhões de pessoas em 2002. Apesar de ser considerado uma doença rara, o estudo deixa claro que este número não reflete a verdadeira magnitude do problema no país devido ao grave problema de subnotificações <sup>2</sup>. Em nosso estudo, vimos que 18,7% dos pacientes com mesotelioma pleural reportaram exposição ao asbesto, enquanto apenas 1,88% dos pacientes com mesotelioma peritoneal alegaram o mesmo. A baixa porcentagem obtida em nosso estudo pode não corresponder a real exposição ao carcinógeno aos pacientes atendidos na instituição. Acredita-se que este resultado pode estar relacionado à ausência de informação necessária por parte da população estudada em associar os minerais silicatos fibrosos ao seu devido nome - asbesto e/ou a não instrução correta aos profissionais da saúde em relação à forma de coletar informações do paciente.

Este trabalho apresentou porcentagem similar entre topografias pleural e peritoneal, embora a topografia mais prevalente mundialmente no mesotelioma maligno seja a pleural. O motivo desta divergência é o fato da instituição A.C. Camargo Cancer Center ser um centro

de referência em cirurgias do tipo peritonectomia + HIPEC (quimioterapia intraperitoneal hipertérmica). A maioria dos pacientes foram diagnosticados em estágios avançados da doença, embora apresentem ECOG1, que determina boa integridade física.

Também vimos que pacientes com mesotelioma pleural maligno são diagnosticados mais tardiamente devido a sintomas pouco específicos, e conseqüentemente apresentam uma sobrevida global mais curta, enquanto pacientes com mesotelioma peritoneal maligno são geralmente diagnosticados mais cedo e apresentam maior sobrevida global. Em ambas as topografias o tipo epitelióide foi encontrado como mais predominante.

Mundialmente, o mesotelioma maligno é um câncer mais recorrente em homens do que em mulheres<sup>267-268</sup>. Estudos recentes<sup>268-270</sup> investigaram a diferença entre o efeito do mesotelioma maligno entre os gêneros. Alpert et al.<sup>269</sup>, não notaram diferenças quando a análise foi feita com base em idade, ECOG e apenas em pacientes com histologia epitelióide. Porém levanta a hipótese de que altos níveis de estrogênio pode melhorar a sobrevida e é um possível alvo para novas terapias. Em estudo realizado por Consonni et al.<sup>270</sup> com 5426 pacientes, concluíram que os homens apresentam duas vezes mais mesotelioma pleural em relação à mulheres, e também atingem a mesma incidência de 7 a 10 anos antes. Nossos dados de mesotelioma pleural concordam com a literatura, pois a incidência de mesotelioma pleural é maior em homens (61,3%), e curiosamente a de mesotelioma peritoneal é maior em mulheres (62,3%).

A conduta de tratamento mais sugerida pela maioria dos médicos é a cirurgia citorrredutora, uma vez que é quase impossível ressecar o tumor completamente em casos de mesotelioma maligno pleural e peritoneal. O *American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline*, ed. 2018, recomenda fortemente o uso de quimioterapia (tanto o uso neoadjuvante como seu uso paliativo) em pacientes portadores de mesotelioma maligno; Este tipo de tratamento pode prolongar o tempo de sobrevida e melhorar a qualidade de vida do paciente.

Quando fala-se de alterações moleculares em mesoteliomas malignos, a importância de *BAP1* na carcinogênese e no prognóstico deste tumor é bem definida<sup>32,271-276</sup>. Em nosso estudo foi possível analisar a expressão da proteína BAP-1 em apenas 51 amostras. Destas, apenas 21 possuíam perda de expressão nuclear de BAP-1, enquanto 30 apresentaram algum tipo de marcação positiva. Cantini et al.<sup>277</sup> reportou uma associação entre a perda de expressão de BAP-1 com o tumor de histologia epitelióide. Em nosso trabalho, a maioria dos

casos em que houve perda de expressão de BAP-1, o tumor era de histologia epitelióide. Ao investigar a relação de BAP-1 com o tempo de sobrevida global, Farzin et al.<sup>276</sup> sugere que a perda de expressão desta proteína estaria relacionada a um melhor prognóstico em portadores de mesotelioma pleural maligno. E de fato, encontramos maior tempo de sobrevida (em meses) muito maior em pacientes com perda de expressão de BAP-1 do que em pacientes que apresentaram expressão preservada da proteína.

É essencial a busca por novos alvos terapêuticos e novas estratégias de tratamento a partir de estudos envolvendo alterações gênicas frequentemente encontradas e estudos de vias de sinalização. A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR é responsável por regular o processo celular envolvido no controle do crescimento celular, proliferação, metabolismo, motilidade, sobrevivência e apoptose. Quando ocorre alteração em algum componente da via, a mesma pode promover a sobrevivência e proliferação de células tumorais<sup>278-279</sup>. Sabe-se que a via PI3K/Akt/mTOR encontra-se frequentemente alterada no mesotelioma maligno<sup>280</sup>. Em nosso trabalho, foi possível observar uma maior expressão das formas fosforiladas de AKT em relação à não fosforilada (Figuras 19, 20 e 21). A ativação de AKT foi correlacionada com vários parâmetros clínico-patológicos, como progressão da doença e um pior prognóstico em uma série de tumores<sup>281,282</sup>. A atividade de AKT pode ser aumentada devido a fatores de crescimento oncogênicos, angiogênicos, citocinas, alterações gênicas, por perda de função de PTEN, entre outros<sup>34</sup>. A inativação de PTEN está diretamente relacionada à ativação de AKT, e sua expressão é um grande fator de predição de sobrevida em pacientes com mesotelioma maligno<sup>283</sup>.

Neste trabalho, a mediana de sobrevida global por tipo histológico do mesotelioma maligno independente de topografia foi de: 29,43 para epitelióide, 43,47 para bifásico, 13,24 para sarcomatoide e 71,46 para papilífero bem diferenciado. Entretanto, um estudo publicado em 2018<sup>284</sup> avaliando a sobrevida global de acordo com o subtipo histológico do mesotelioma maligno, e concluiu que a histologia deste tumor é independentemente associada com a sobrevida, com o tipo epitelióide sendo associado a maior tempo de sobrevida, bifásico/misto com prognóstico intermediário e o tipo sarcomatóide com menor tempo de sobrevida. Verma et al.<sup>284</sup> demonstrou que o tempo de sobrevida médio por tipo histológico em mesotelioma pleural maligno foi de: 14,4 meses para epitelióide, 9,5 meses para bifásico e 5,3 meses para sarcomatoide.



Um outro estudo publicado em 2019 <sup>285</sup>, investigou fatores influentes na sobrevida de portadores de mesotelioma maligno em uma população do estado de Nova Iorque e da Pensilvânia - EUA, e determinou que pacientes com menos de 45 anos de idade, sexo feminino, tipo histológico epitelióide, estadiamento I, topografia peritoneal e tratamento combinando cirurgia + quimioterapia são fatores prognósticos favoráveis aos acometidos por mesotelioma maligno. Enquanto Verma et al. <sup>284</sup> afirma que os fatores preditivos para baixa sobrevida global do mesotelioma pleural maligno são: idade avançada, sexo masculino, residente de área urbana, tratamento em centros públicos de saúde, e estágio IV da doença. Trabalhos envolvendo a sobrevida dos portadores de mesotelioma maligno foram publicados por Amin et al. <sup>285</sup> e Shavelle et al. <sup>286</sup> concluíram que pacientes portadores de mesotelioma maligno pleural possuem sobrevida global melhor que de pacientes com mesotelioma maligno peritoneal. Porém neste trabalho observamos o oposto, pacientes com topografia peritoneal apresentaram maior tempo de sobrevida global em meses. No mesotelioma maligno pleural a sobrevida apresentada foi de aproximadamente até 196,66 meses, enquanto na topografia peritoneal foi de até 300 meses. Também é necessário analisar os gráficos de sobrevida global por outros fatores influentes além da topografia do tumor primário, como pela histologia do tumor (Figura 7), e grau de estadiamento (Figura 8). Quando segmentamos a análise por estes fatores (Tabela 10) é possível observar que quando se trata de tempo de sobrevida global em meses, encontramos a maior mediana em tumores de histologia papilífero bem diferenciado, entretanto o maior tempo de sobrevida global identificado foi em paciente com mesotelioma de histologia epitelióide.

Quando comparamos a distribuição dos tipos histológicos tumorais encontrados neste estudo e no SEER <sup>287</sup>, nota-se que a histologia epitelióide é a mais incidente (69%), seguida pelo tipo sarcomatóide (19%), e por último o tipo bifásico 12%. Em nosso estudo a histologia epitelióide também foi a mais encontrada, entretanto a segunda mais incidente em nossa coorte foi o tipo bifásico. Também identificamos 7 pacientes com mesotelioma maligno papilífero bem diferenciado, que é uma histologia considerada rara e pouco reportada. Para a confirmação dessa histologia rara as lâminas destes casos passou por uma revisão detalhada pelo patologista colaborador deste trabalho.

Os dados obtidos pelo sequenciamento de nossas amostras corrobora com informações disponíveis no TCGA, quando destacam os 20 principais genes mutados em casos de mesotelioma maligno, sendo eles em ordem de frequência: *BAP1*, *NF2*, *TTN*, *TP53*,

*MUC4*, *SETD2*, *LATS2*, *FAT4*, *CCDC168*, *PTCH1*, *SDK1*, *LAMA5*, *DST*, *KMT2A*, *CRIM1*, *USH2A*, *GSTTP1*, *VWF*, *NCOR1* e *MUC5B* (Figura 24). Dentre os 20 genes destacados pelo TCGA, 11 foram encontrados neste trabalho (por ordem de número de alterações): *TTN*, *MUC4*, *MUC5B*, *SDK1*, *BAP1*, *NF2*, *SETD2*, *FAT4*, *CCDC168*, *LAMA5* e *VWF* (Figura 25). Entretanto, esperávamos encontrar alteração em *BAP1* nos casos 1 e 2, de acordo com o resultado do ensaio de *western blot* (Figura 19), porém o sequenciamento revelou que apenas o caso 2 apresentou uma mutação (*BAP1* c.1730-2A>G) neste gene (Tabela 9). A partir do sequenciamento, também foi possível encontrar 81 alterações gênicas inéditas, com possível potencial maligno, sugerindo novos alvos de estudos futuros para melhor compreensão da tumorigênese do mesotelioma maligno.

## 6 CONCLUSÕES

Este trabalho nos possibilitou caracterizar e definir um perfil epidemiológico de pacientes portadores de mesotelioma pleural maligno e mesotelioma peritoneal maligno. Foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre as topografias pleural e peritoneal em grande maioria das variáveis (sexo, ECOG, idade ao diagnóstico, exposição ao asbesto, estadiamento, tabagismo, histologia, tratamento cirúrgico e radioterápico, ausência de progressão e recidiva).

A epidemiologia também apresenta alto índice de histórico familiar de câncer, e além disso, apenas 16,3% dos pacientes tiveram exposição ao asbesto reportada. Ambas as informações podem ser indicativos de predominância de síndrome hereditária.

É importante ressaltar que o maior viés deste estudo, assim como grande parte dos estudos retrospectivos, é a dificuldade de recuperar dados de prontuários, e a existência de dados omissos, assim como dados epidemiológicos autodeclarados, que pode afetar a confiabilidade deles.

A partir da leitura da reação de IHQ para a proteína BAP-1 no TMA, foi possível encontrar uma relação entre perda de expressão de BAP-1 com o tipo histológico epiteloide. Outra correlação já sugerida na literatura, e que podemos ver neste trabalho é entre a perda de expressão de BAP-1 com maior tempo de sobrevida global, e a ausência de correlação entre a expressão de BAP-1 e a topografia do tumor.

Durante o período deste estudo foi possível imortalizar linhagens celulares humanas e PDX a partir de tecidos frescos viáveis coletados de pacientes com mesoteliomas malignos que passaram por cirurgia no A.C. Camargo Cancer Center. As células tumorais cultivadas apresentam preservação de marcadores de mesotelioma como citoqueratina AE1/AE3, podoplanina e WT-1; e ativação das vias PI3K/AKT/mTOR.

As alterações gênicas encontradas em nossas amostras corresponde ao que se encontra na maioria dos mesotelioma malignos segundo a literatura. As alterações *novel* identificadas neste trabalho representa uma oportunidade de estudo futuros e de conhecimento mais aprofundado, o que pode também ajudar a determinar novos candidatos a alvos moleculares.

A principal contribuição desta trabalho é a caracterização do perfil epidemiológico e da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR envolvidas no mesotelioma maligno na população atendida pelo A.C.Camargo Cancer Center. Desta forma, os resultados deste trabalho permitirão realizar futuros ensaios funcionais *in vivo* e *in vitro* para elucidar os mecanismos envolvidos no processo tumoral do mesotelioma maligno.

## 7 REFERÊNCIAS

- 1 Kato S, Tomson BN, Buys TPH, Elkin SK, Carter JL, Kurzrock R. Genomic landscape of malignant mesotheliomas. *Mol Cancer Ther.* 2016;15:2498-507.
- 2 Pedra F, Mattos IE, Castro HA. Mesothelioma mortality rate in Brazil 1980 to 2010. *2010;60:199-206.*
- 3 Reid A, De Klerk NH, Magnani C, Ferrante D, Berry G, Musk AW, et al. Mesothelioma risk after 40 years since first exposure to asbestos: a pooled analysis. *Thorax.* 2014;69:843-50.
- 4 Beebe-Dimmer JL, Fryzek JP, Yee CL, Dalvi TB, Garabrant DH, Schwartz AG, et al. Mesothelioma in the United States: a Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)-Medicare investigation of treatment patterns and overall survival. *Clin Epidemiol.* 2016;8:743-50.
- 5 García-Fadrique A, Mehta A, Mohamed F, Dayal S, Cecil T, Moran BJ. Clinical presentation, diagnosis, classification and management of peritoneal mesothelioma: a review. *J Gastrointest Oncol.* 2017;8:915-24.
- 6 Koller FJ, Sarquis LMM, Mantovani M de F, Miranda FMD, Consonni D, Mensi C. Monitoramento do mesotelioma no sul do brasil: uma realidade ainda a ser estudada. *Cogitare Enferm.* 2017;22.
- 7 Capitani EM de, Metze K, Frazato Jr. C, Altemani AMA, Zambom L, Toro IFC, et al. Mesotelioma maligno de pleura com associação etiológica a asbesto: a propósito de três casos clínicos. *Rev Assoc Med Bras.* 1997;43:265-72.
- 8 Kim J, Bhagwandin S, Labow DM. Malignant peritoneal mesothelioma: a review. *Ann Transl Med.* 2017;5:1-11.
- 9 Lin Z-Y, Chu C-H, Wang H-Y, Shih S-C, Chen M-J. Malignant peritoneal mesothelioma. *J Cancer Res Pract.* 2015;2:83-92.
- 10 Singhi AD, Krasinskas AM, Choudry HA, Bartlett DL, Pingpank JF, Zeh HJ, et al. The prognostic significance of BAP1, NF2, and CDKN2A in malignant peritoneal mesothelioma. *Mod Pathol.* 2016;29:14-24.

- 11 Ettinger DS, Wood DE, Akerley W, Bazhenova LA, Borghaei H, Camidge DR, et al. NCCN Guidelines Insights: Malignant Pleural Mesothelioma, Version 3.2016. *J Natl Compr Cancer Netw*. 2016;14:825-36.
- 12 Husain, AN, Colby, T V., Ordóñez, NG, Allen, TC, Attanoos, RL, Beasley, MB, et al. Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma 2017 Update of the Consensus Statement From the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142:89-108.
- 13 Zhang W, Wu X, Wu L, Zhang W, Zhao X. Advances in the diagnosis, treatment and prognosis of malignant pleural mesothelioma. *Ann Transl Med*. 2015;3:182.
- 14 Faig J, Howard S, Levine EA, Casselman G, Hesdorffer M, Ohar JA. Changing Pattern in Malignant Mesothelioma Survival. *Transl Oncol*. 2015;8:35-9.
- 15 Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A NA. WHO Classification of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart - Volume 7. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2015.
- 16 Wagner Jc, Sleggs Ca, Marchand P. Diffuse pleural mesothelioma and asbestos exposure in the North Western Cape Province. *Br J Ind Med*. 1960;17:260-71.
- 17 International Agency for Research on Cancer-IARC. Mesothelioma Cancer Alliance. What is Asbestos? Mesothelioma Cancer Alliance. WHO Press; 2012.
- 18 Goldberg M, Luce D. The health impact of nonoccupational exposure to asbestos: what do we know? *Eur J Cancer Prev*. 2009;18:489-503.
- 19 Bueno R, Stawiski EW, Goldstein LD, Durinck S, De Rienzo A, Modrusan Z, et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet*. 2016;48:407-16.
- 20 Guo G, Chmielecki J, Goparaju C, Heguy A, Dolgalev I, Carbone M, et al. Whole-exome sequencing reveals frequent genetic alterations in BAP1, NF2, CDKN2A, and CUL1 in malignant pleural mesothelioma. *Cancer Res*. 2015;75:264-9.
- 21 Ugurluer G, Chang K, Gamez ME, Arnett AL, Jayakrishnan R, Miller RC, et al. Genome-based Mutational Analysis by Next Generation Sequencing in Patients with Malignant Pleural and Peritoneal Mesothelioma. 2016;2338:2331-8.
- 22 Quetel L, Meiller C, Assié J, Blum Y, Imbeaud S, Montagne F, et al. Genetic alterations of malignant pleural mesothelioma: association with tumor heterogeneity and overall survival. *Mol Oncol*. 2020;14:1207-23.

- 23 Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, Bell DW, Lee WC, Altomare DA, et al. p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res.* 1994;54:5547-51.
- 24 Xio S, Li D, Vijg J, Sugarbaker DJ, Corson JM, Fletcher JA. Codeletion of p15 and p16 in primary malignant mesothelioma. *Oncogene.* 1995;11:511-5.
- 25 Jennings CJ, Murer B, O'Grady A, Hearn LM, Harvey BJ, Kay EW, et al. Differential p16/INK4A cyclin-dependent kinase inhibitor expression correlates with chemotherapy efficacy in a cohort of 88 malignant pleural mesothelioma patients. *Br J Cancer.* 2015;113:69-75.
- 26 López-Ríos F, Chuai S, Flores R, Shimizu S, Ohno T, Wakahara K, et al. Global gene expression profiling of pleural mesotheliomas: overexpression of aurora kinases and P16/CDKN2A deletion as prognostic factors and critical evaluation of microarray-based prognostic prediction. *Cancer Res.* 2006;66:2970-9.
- 27 Dacic S, Kothmaier H, Land S, Shuai Y, Halbwedl I, Morbini P, et al. Prognostic significance of p16/cdkn2a loss in pleural malignant mesotheliomas. *Virchows Arch.* 2008;453:627-35.
- 28 Ivanov SV, Miller J, Lucito R, Tang C, Ivanova A V., Pei J, et al. Genomic events associated with progression of pleural malignant mesothelioma. *Int J Cancer.* 2009;124:589-99.
- 29 Jongsma J, van Montfort E, Vooijs M, Zevenhoven J, Krimpenfort P, van der Valk M, et al. A conditional mouse model for malignant mesothelioma. *cancer cell.* 2008;13:261-71.
- 30 Bott M, Brevet M, Taylor BS, Shimizu S, Ito T, Wang L, et al. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet.* 2011;43:668-72.
- 31 Yoshikawa Y, Emi M, Hashimoto-Tamaoki T, Ohmuraya M, Sato A, Tsujimura T, et al. High-density array-CGH with targeted NGS unmask multiple noncontiguous minute deletions on chromosome 3p21 in mesothelioma. *Proc Natl Acad Sci.* 2016;113:13432-7.
- 32 Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet.* 2011;43:1022-5.

- 33 Mossman BT, Shukla A, Heintz NH, Verschraegen CF, Thomas A, Hassan R. New insights into understanding the mechanisms, pathogenesis, and management of malignant mesotheliomas. *Am J Pathol.* 2013;182:1065-77.
- 34 Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K Pathway As Drug Target in Human Cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:1075-83.
- 35 Dufner A, Thomas G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res.* 1999;253:100-9.
- 36 Peterson RT, Schreiber SL. Translation control: connecting mitogens and the ribosome. *Curr Biol.* 1998;8:R248-50.
- 37 Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* 1997;16:3693-704.
- 38 Flotow H, Thomas G. Substrate recognition determinants of the mitogen-activated 70K S6 kinase from rat liver. *J Biol Chem.* 1992;267:3074-8.
- 39 Ferrari S, Bandi HR, Hofsteenge J, Bussian BM, Thomas G. Mitogen-activated 70K S6 kinase. Identification of in vitro 40 S ribosomal S6 phosphorylation sites. *J Biol Chem.* 1991;266:22770-5.
- 40 Janku F, Yap TA, Meric-Bernstam F. Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15:273-91.
- 41 Ciołczyk-Wierzbicka D, Gil D, Zarzycka M, Laidler P. mTOR inhibitor everolimus reduces invasiveness of melanoma cells. *Hum Cell.* 2020;33:88-97.
- 42 Assis LVM de, Isoldi MC. Overview of the biochemical and genetic processes in malignant mesothelioma. *J Bras Pneumol.* 2014;40:429-42.
- 43 Sheffield BS, Tinker A V., Shen Y, Hwang H, Li-Chang HH, Pleasance E, et al. Personalized Oncogenomics: Clinical Experience with Malignant Peritoneal Mesothelioma Using Whole Genome Sequencing. Deb S, editor. *PLoS One.* 2015;10:e0119689.
- 44 Carbone M, Yang H, Pass HI, Krausz T, Testa JR, Gaudino G. BAP1 and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:153-9.
- 45 Klebe S, Driml J, Nasu M, Pastorino S, Zangiabadi A, Henderson D, et al. BAP1 hereditary cancer predisposition syndrome: a case report and review of literature. *Biomark Res.* 2015;3:14.



- 46 Cheung M, Testa JR. BAP1 , a tumor suppressor gene driving malignant mesothelioma. 2017;6:270-8.
- 47 Bhattacharya S, Hanpude P, Maiti TK. Cancer associated missense mutations in BAP1 catalytic domain induce amyloidogenic aggregation: A new insight in enzymatic inactivation. *Sci Rep*. 2016;5:18462.
- 48 Hakiri S, Osada H, Ishiguro F, Murakami H, Murakami-tonami Y, Yokoi K, et al. Functional differences between wild-type and suppressor against malignant mesothelioma cells. 2015;
- 49 Robinson BWS, Lake RA. Advances in Malignant Mesothelioma. *N Engl J Med*. 2005;353:1591-603.
- 50 Scherpereel A, Lee YCG. Biomarkers for mesothelioma. *Curr Opin Pulm Med*. 2007;13:339-443.
- 51 Henderson DW, Reid G, Kao SC, Van Zandwijk N, Klebe S. Challenges and controversies in the diagnosis of mesothelioma: Part 1. Cytology-only diagnosis, biopsies, immunohistochemistry, discrimination between mesothelioma and reactive mesothelial hyperplasia, and biomarkers. *J Clin Pathol*. 2013;66:847-53.
- 52 Husain AN, Colby T, Ordonez N, Krausz T, Attanoos R, Beasley MB, et al. Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: 2012 update of the consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;137:647-67.
- 53 Tandon RT, Jimenez-Cortez Y, Taub R, Borczuk AC. Immunohistochemistry in Peritoneal Mesothelioma: A Single-Center Experience of 244 Cases. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142:236-42.
- 54 Panou V, Vyberg M, Weinreich UM, Meristoudis C, Falkmer UG, Røe OD. The established and future biomarkers of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Treat Rev*. 2015;41:486-95.
- 55 Scattone A, Serio G, Marzullo A, Nazzaro P, Corsi F, Cocca MP, et al. High Wilms' tumour gene (WT1) expression and low mitotic count are independent predictors of survival in diffuse peritoneal mesothelioma. *Histopathology*. 2012;60:472-81.
- 56 Fett-Conte AC, Salles ABCF. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2002;24:85-9.

- 57 Kafiri G, Thomas DM, Shepherd NA, Krausz T, Lane DP, Hall PA. p53 expression is common in malignant mesothelioma. *Histopathology*. 1992;21:331-4.
- 58 Tian K, Bakker E, Hussain M, Guazzelli A, Alhebshi H, Meysami P, et al. p53 modeling as a route to mesothelioma patients stratification and novel therapeutic identification. *J Transl Med*. 2018;16:282.
- 59 Wang B, Li D, Ou X, Yi Q, Feng Y. Diagnostic Accuracy of Ber-EP4 for Metastatic Adenocarcinoma in Serous Effusions: A Meta-Analysis. Schmidt RL, editor. *PLoS One*. 2014;9:e107741.
- 60 Padgett DM, Cathro HP, Wick MR, Mills SE. Podoplanin is a Better Immunohistochemical Marker for Sarcomatoid Mesothelioma Than Calretinin. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:123-7.
- 61 Hinterberger M, Reineke T, Storz M, Weder W, Vogt P, Moch H. D2-40 and calretinin—a tissue microarray analysis of 341 malignant mesotheliomas with emphasis on sarcomatoid differentiation. *Mod Pathol*. 2007;20:248-55.
- 62 Ordonez NG. Immunohistochemical Diagnosis of. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;192:1407-14.
- 63 Lopes, C. & Cordeiro M. Imunohistoquímica: anticorpos primários. Citoqueratina AE1/AE3. *Pathologica*.
- 64 Milanese-Yearsley M, Hammond MEH, Pajak TF, Cooper JS, Chang C, Griffin T, et al. Tissue Micro-Array: A Cost and Time-Effective Method for Correlative Studies by Regional and National Cancer Study Groups. *Mod Pathol*. 2002;15:1366-73.
- 65 Gulmann C, O'Grady A. Tissue microarrays: an overview. *Curr Diagnostic Pathol*. 2003;9:149-54.
- 66 Boffetta P, Righi L, Ciocan C, Pelucchi C, La Vecchia C, Romano C, et al. Validation of the diagnosis of mesothelioma and BAP1 protein expression in a cohort of asbestos textile workers from Northern Italy. *Ann Oncol*. 2018;29:484-9.
- 67 Righi L, Duregon E, Vatrano S, Izzo S, Giorcelli J, Rondón-Lagos M, et al. BRCA1-Associated protein 1 (BAP1) immunohistochemical expression as a diagnostic tool in malignant pleural mesothelioma classification: A large retrospective study. *J Thorac Oncol*. 2016;11:2006-17.

- 68 Pulford E, Huilgol K, Moffat D, Henderson DW, Klebe S. Malignant Mesothelioma, BAP1 Immunohistochemistry, and VEGFA: Does BAP1 Have Potential for Early Diagnosis and Assessment of Prognosis? *Dis Markers*. 2017;2017.
- 69 Valente MJ, Henrique R, Costa VL, Jerónimo C, Carvalho F, Bastos ML, et al. A Rapid and Simple Procedure for the Establishment of Human Normal and Cancer Renal Primary Cell Cultures from Surgical Specimens. Guan X, editor. *PLoS One*. 2011;6:e19337.
- 70 Xia Y, Zhang Q, Zhen Q, Zhao Y, Liu N, Li T, et al. Negative regulation of tumor-infiltrating NK cell in clear cell renal cell carcinoma patients through the exosomal pathway. *Oncotarget*. 2017;8:37783-95.
- 71 Kluin RJC, Kemper K, Kuilman T, de Ruyter JR, Iyer V, Forment J V, et al. Xenofilter: computational deconvolution of mouse and human reads in tumor xenograft sequence data. *BMC Bioinformatics*. 2018;19:366.
- 72 McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*. 2010;20:1297-303.
- 73 Sherry ST, Ward M-H, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:308-11.
- 74 Algranti E, Saito CA, Carneiro APS, Moreira B, Mendonça EMC, Bussacos MA. The next mesothelioma wave: Mortality trends and forecast to 2030 in Brazil. *Cancer Epidemiol*. 2015;39:687-92.
- 75 Desmeules P, Joubert P, Zhang L, Al-Ahmadie HA, Fletcher CD, Vakiani E, et al. A Subset of Malignant Mesotheliomas in Young Adults Are Associated with Recurrent EWSR1/FUS-ATF1 Fusions. *Am J Surg Pathol*. 2017;41:980-8.
- 76 Soeberg MJ, Creighton N, Currow DC, Young JM, van Zandwijk N. Patterns in the incidence, mortality and survival of malignant pleural and peritoneal mesothelioma, New South Wales, 1972-2009. *Aust N Z J Public Health*. 2016;40:255-62.
- 77 The Cancer Genome Atlas-TCGA. TCGA-MESO. The Cancer Genome Atlas (TCGA).
- 78 Duan Z, Brakora KA, Seiden M V. Inhibition of ABCB1 (MDR1) and ABCB4 (MDR3) expression by small interfering RNA and reversal of paclitaxel resistance in human ovarian cancer cells. *Mol Cancer Ther*. 2004;3:833-8.

- 79 Wang Y, Zhang D, Wu K, Zhao Q, Nie Y, Fan D. Long Noncoding RNA MRUL Promotes ABCB1 Expression in Multidrug-Resistant Gastric Cancer Cell Sublines. *Mol Cell Biol.* 2014;34:3182-93.
- 80 Ieiri I. Functional Significance of Genetic Polymorphisms in P-glycoprotein (MDR1, ABCB1) and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP, ABCG2). *Drug Metab Pharmacokinet.* 2012;27:85-105.
- 81 Bera TK, Iavarone C, Kumar V, Lee S, Lee B, Pastan I. MRP9, an unusual truncated member of the ABC transporter superfamily, is highly expressed in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99:6997-7002.
- 82 Yang W, Shi J, Zhou Y, Liu T, Zhan F, Zhang K, et al. Integrating proteomics and transcriptomics for the identification of potential targets in early colorectal cancer. *Int J Oncol.* 2019;
- 83 Cai W, Ding X, Li J, Li Z. Methylation analysis highlights novel prognostic criteria in human-metastasized melanoma. *J Cell Biochem.* 2019;120:11990-2001.
- 84 Li M, Zeng J, Pan A, Lin Y, Lin H, Zhang R, et al. Investigation of miR-490-3p Expression in Hepatocellular Carcinoma Based on Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) and a Meta-Analysis of 749 Cases. *Med Sci Monit.* 2018;24:4914-25.
- 85 Cetinkaya C, Martinsson T, Sandgren J, Träger C, Kogner P, Dumanski J, et al. Age dependence of tumor genetics in unfavorable neuroblastoma: arrayCGH profiles of 34 consecutive cases, using a Swedish 25-year neuroblastoma cohort for validation. *BMC Cancer.* 2013;13:231.
- 86 Gao L, He R, Huang Z, Dang Y, Gu Y, Yan H, et al. Genome-wide Analysis of the Alternative Splicing Profiles Revealed Novel Prognostic Index for Kidney Renal Cell Clear Cell Carcinoma. *J Cancer.* 2020;11:1542-54.
- 87 Xie Y, Wen X, Jiang Z, Fu HQ, Han H, Dai L. Aquaporin 1 and aquaporin 4 are involved in invasion of lung cancer cells. *Clin Lab.* 2012;58:75-80.
- 88 Li J, Wang L, He F, Li B, Han R. Long noncoding RNA LINC00629 restrains the progression of gastric cancer by upregulating AQP4 through competitively binding to miR-196b-5p. *J Cell Physiol.* 2020;235:2973-85.
- 89 Li Y-B, Sun S-R, Han X-H. Down-regulation of AQP4 Inhibits Proliferation, Migration and Invasion of Human Breast Cancer Cells. *Folia Biol (Praha).* 2016;62:131-7.

- 90 Yabas M, Teh CE, Frankenreiter S, Lal D, Roots CM, Whittle B, et al. ATP11C is critical for the internalization of phosphatidylserine and differentiation of B lymphocytes. *Nat Immunol.* 2011;12:441-9.
- 91 Yang Y, Li X, Yang Q, Wang X, Zhou Y, Jiang T, et al. The role of microRNA in human lung squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;200:127-33.
- 92 Brosseau J-P, Lucier J-F, Nwilati H, Thibault P, Garneau D, Gendron D, et al. Tumor microenvironment-associated modifications of alternative splicing. *RNA.* 2014;20:189-201.
- 93 Chung K-Y, Cheng IK-C, Ching AK-K, Chu J-H, Lai PB-S, Wong N. Block of proliferation 1 (BOP1) plays an oncogenic role in hepatocellular carcinoma by promoting epithelial-to-mesenchymal transition. *Hepatology.* 2011;54:307-18.
- 94 Killian A, Sarafan-Vasseur N, Sesboué R, Le Pessot F, Blanchard F, Lamy A, et al. Contribution of the BOP1 gene, located on 8q24, to colorectal tumorigenesis. *Genes, Chromosom Cancer.* 2006;45:874-81.
- 95 Gupta R, Bugide S, Wang B, Green MR, Johnson DB, Wajapeyee N. Loss of BOP1 confers resistance to BRAF kinase inhibitors in melanoma by activating MAP kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci.* 2019;116:4583-91.
- 96 Meng L, Fang J, Sun J, Yang F, Wei Y. Aberrant Expression Profile of Long Noncoding RNA in Human Sinonasal Squamous Cell Carcinoma by Microarray Analysis. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1-10.
- 97 Chen S, Du Z, Wu B, Shen H, Liu C, Qiu X, et al. STAT1, IGF1, RAC1, and MDM2 Are Associated with Recurrence of Giant Cell Tumor of Bone. *J Immunol Res.* 2018;2018:1-10.
- 98 Jacquemet G, Baghirov H, Georgiadou M, Sihto H, Peuhu E, Cettour-Janet P, et al. L-type calcium channels regulate filopodia stability and cancer cell invasion downstream of integrin signalling. *Nat Commun.* 2016;7:13297.
- 99 Phan NN, Wang C-Y, Chen C-F, Sun Z, Lai M-D, Lin Y-C. Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. *Oncol Lett.* 2017;14:2059-74.
- 100 Kanwar N, Carmine-Simmen K, Nair R, Wang C, Moghadas-Jafari S, Blaser H, et al. Amplification of a calcium channel subunit CACNG4 increases breast cancer metastasis. *EBioMedicine.* 2020;52:102646.

- 101 Zhang M, Luo SC. Gene expression profiling of epithelial ovarian cancer reveals key genes and pathways associated with chemotherapy resistance. *Genet Mol Res.* 2016;15.
- 102 L'Espérance S, Bachvarova M, Tetu B, Mes-Masson A-M, Bachvarov D. Global gene expression analysis of early response to chemotherapy treatment in ovarian cancer spheroids. *BMC Genomics.* 2008;9:99.
- 103 Panebianco F, Nikitski A V, Nikiforova MN, Kaya C, Yip L, Condello V, et al. Characterization of thyroid cancer driven by known and novel ALK fusions. *Endocr Relat Cancer.* 2019;26:803-14.
- 104 Sun L, Lamont SJ, Cooksey AM, McCarthy F, Tudor CO, Vijay-Shanker K, et al. Transcriptome response to heat stress in a chicken hepatocellular carcinoma cell line. *Cell Stress Chaperones.* 2015;20:939-50.
- 105 Sumoza-Toledo A, Espinoza-Gabriel MI, Montiel-Condado D. Evaluation of the TRPM2 channel as a biomarker in breast cancer using public databases analysis. *Bol Médico Hosp Infant México (English Ed).* 2016;73:397-404.
- 106 Huang Z, Zhang N, Li W, Cao J, Zhang L, Chen Y. Expression of CHODL in hepatocellular carcinoma affects invasion and migration of liver cancer cells. *Oncol Lett.* 2017;13:715-21.
- 107 Masuda K, Takano A, Oshita H, Akiyama H, Tsuchiya E, Kohno N, et al. Chondrolectin Is a Novel Diagnostic Biomarker and a Therapeutic Target for Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17:7712-22.
- 108 Zhang X, Wu K, Huang Y, Xu L, Li X, Zhang N. Promoter Hypermethylation of CHODL Contributes to Carcinogenesis and Indicates Poor Survival in Patients with Early-stage Colorectal Cancer. *J Cancer.* 2020;11:2874-86.
- 109 Wu X, Zeng R, Wu S, Zhong J, Yang L, Xu J. Comprehensive expression analysis of miRNA in breast cancer at the miRNA and isomiR levels. *Gene.* 2015;557:195-200.
- 110 Von Rosenvinge EC, Raufman J-P. Muscarinic Receptor Signaling in Colon Cancer. *Cancers (Basel).* 2011;3:971-81.
- 111 Jacob F, Nixdorf S, Hacker NF, Heinzelmann-Schwarz VA. Reliable in vitro studies require appropriate ovarian cancer cell lines. *J Ovarian Res.* 2014;7:60.

- 112 Li X, Tu L, Murphy PG, Kadono T, Steeber DA, Tedder TF. CHST1 and CHST2 sulfotransferase expression by vascular endothelial cells regulates shear-resistant leukocyte rolling via L-selectin. *J Leukoc Biol.* 2001;69:565-74.
- 113 Rumiato E, Boldrin E, Amadori A, Saggiaro D. DMET<sup>TM</sup> (Drug-Metabolizing Enzymes and Transporters) microarray analysis of colorectal cancer patients with severe 5-fluorouracil-induced toxicity. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013;72:483-8.
- 114 Arbitrio M, Di Martino MT, Barbieri V, Agapito G, Guzzi PH, Botta C, et al. Identification of polymorphic variants associated with erlotinib-related skin toxicity in advanced non-small cell lung cancer patients by DMET microarray analysis. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2016;77:205-9.
- 115 Yang B, Liu C, Diao L, Wang C, Guo Z. A polymorphism at the microRNA binding site in the 3' untranslated region of C14orf101 is associated with non-Hodgkin lymphoma overall survival. *Cancer Genet.* 2014;207:141-6.
- 116 Khowal S, Naqvi SH, Monga S, Jain SK, Wajid S. Assessment of cellular and serum proteome from tongue squamous cell carcinoma patient lacking addictive proclivities for tobacco, betel nut, and alcohol: Case study. *J Cell Biochem.* 2018;119:5186-221.
- 117 Taniwaki M, Daigo Y, Ishikawa N, Takano A, Tsunoda T, Yasui W, et al. Gene expression profiles of small-cell lung cancers: molecular signatures of lung cancer. *Int J Oncol.* 2006;29:567-75.
- 118 Dicks E, Song H, Ramus SJ, Van Oudenhove E, Tyrer JP, Intermaggio MP, et al. Germline whole exome sequencing and large-scale replication identifies FANCM as a likely high grade serous ovarian cancer susceptibility gene. *Oncotarget.* 2017;8:50930-40.
- 119 Qu J, Zhang L, Li L, Su Y. miR-148b Functions as a Tumor Suppressor by Targeting Endoplasmic Reticulum Metallo Protease 1 in Human Endometrial Cancer Cells. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther.* 2018;27:81-8.
- 120 Wu J, Liu S, Liu G, Dombkowski A, Abrams J, Martin-Trevino R, et al. Identification and functional analysis of 9p24 amplified genes in human breast cancer. *Oncogene.* 2012;31:333-41.

- 121 Lu H, Hu J, Li J, Lu W, Deng X, Wang X. miR-328-3p overexpression attenuates the malignant proliferation and invasion of liver cancer via targeting Endoplasmic Reticulum Metallo Protease 1 to inhibit AKT phosphorylation. *Ann Transl Med.* 2020;8:754-4.
- 122 Kiiski JI, Pelttari LM, Khan S, Freysteinsdottir ES, Reynisdottir I, Hart SN, et al. Exome sequencing identifies FANCM as a susceptibility gene for triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111:15172-7.
- 123 Nikolaidi A, Konstantopoulou I, Pistalmantzian N, Fostira F, Yannoukakos D, Athanasiadis I. A Patient Affected with Serous Ovarian/Peritoneal Carcinoma Carrying the FANCM Mutation. *Case Rep Oncol Med.* 2019;2019:1-2.
- 124 Hasan AN, Ahmad MW, Madar IH, Grace BL, Hasan TN. An in silico analytical study of lung cancer and smokers datasets from gene expression omnibus (GEO) for prediction of differentially expressed genes. *Bioinformatics.* 2015;11:229-35.
- 125 Skaaby T, Husemoen LLN, Jørgensen T, Johansen JD, Menné T, Szecsi PB, et al. Associations of Filaggrin Gene Loss-of-Function Variants and Human Papillomavirus-Related Cancer and Pre-Cancer in Danish Adults. *Consolaro MEL, editor. PLoS One.* 2014;9:e99437.
- 126 Yi W, Tang Z, Yang Z, Yu M, Li Y, Chen G. [Difference in expression of VEGF, bFGF and their receptors between the young and postmenopausal women with breast cancer]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 2003;25:141-4.
- 127 Zhan Q, Huang R-F, Liang X-H, Ge M-X, Jiang J-W, Lin H, et al. FRAS1 knockdown reduces A549 cells migration and invasion through downregulation of FAK signaling. *Int J Clin Exp Med.* 2014;7:1692-7.
- 128 Lefebvre C, Bachelot T, Filleron T, Pedrero M, Campone M, Soria J-C, et al. Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis. *Mardis ER, editor. PLOS Med.* 2016;13:e1002201.
- 129 Umeda S, Kanda M, Tanaka H, Sonohara F, Takami H, Hattori N, et al. Abstract 863: Functions of FRAS1 as a driver gene of liver metastasis from gastric cancer analyzed by the genome editing technology. In: *Molecular and Cellular Biology / Genetics. American Association for Cancer Research; 2019. p. 863-863.*



- 130 Sun H, Chang J, Ye M, Weng W, Zhang M, Ni S, et al. GCNT4 is Associated with Prognosis and Suppress Cell Proliferation in Gastric Cancer. *Onco Targets Ther.* 2020;Volume 13:8601-13.
- 131 Javelaud D, Alexaki VI, Dennler S, Mohammad KS, Guise TA, Mauviel A. TGF- $\beta$ /SMAD/GLI2 Signaling Axis in Cancer Progression and Metastasis. *Cancer Res.* 2011;71:5606-10.
- 132 Mittendorf EA, Storrer CE, Foley RJ, Harris K, Jama Y, Shriver CD, et al. Evaluation of the HER2/ neu -derived peptide GP2 for use in a peptide-based breast cancer vaccine trial. *Cancer.* 2006;106:2309-17.
- 133 Ocón B, Pan J, Dinh TT, Chen W, Ballet R, Bscheider M, et al. A Mucosal and Cutaneous Chemokine Ligand for the Lymphocyte Chemoattractant Receptor GPR15. *Front Immunol.* 2017;8:1111.
- 134 Jordahl KM, Phipps AI, Randolph TW, Tindle HA, Liu S, Tinker LF, et al. Differential DNA methylation in blood as a mediator of the association between cigarette smoking and bladder cancer risk among postmenopausal women. *Epigenetics.* 2019;14:1065-73.
- 135 Marín YE, Namkoong J, Shin S-S, Raines J, Degenhardt K, White E, et al. Grm5 expression is not required for the oncogenic role of Grm1 in melanocytes. *Neuropharmacology.* 2005;49:70-9.
- 136 Wu Y, Chen H, Jiang G, Mo Z, Ye D, Wang M, et al. Genome-wide Association Study (GWAS) of Germline Copy Number Variations (CNVs) Reveal Genetic Risks of Prostate Cancer in Chinese population. *J Cancer.* 2018;9:923-8.
- 137 Xiao B, Chen D, Zhou Q, Hang J, Zhang W, Kuang Z, et al. Glutamate metabotropic receptor 4 (GRM4) inhibits cell proliferation, migration and invasion in breast cancer and is regulated by miR-328-3p and miR-370-3p. *BMC Cancer.* 2019;19:891.
- 138 Kumar A, Badredine A, Azzag K, Kasikçi Y, Ranty MLQ, Zaidi F, et al. Patient-matched analysis identifies deregulated networks in prostate cancer to guide personalized therapeutic intervention. *bioRxiv.* 2019;695999.
- 139 Singh N, Sahu DK, Chowdhry R, Mishra A, Goel MM, Faheem M, et al. IsoSeq analysis and functional annotation of the infratentorial ependymoma tumor tissue on PacBio RSII platform. *Meta Gene.* 2016;7:70-5.

- 140 Bach LA. IGFBP-6 five years on; not so 'forgotten'? *Growth Horm IGF Res.* 2005;15:185-92.
- 141 Nault J-C, Couchy G, Balabaud C, Morcrette G, Caruso S, Blanc J-F, et al. Molecular Classification of Hepatocellular Adenoma Associates With Risk Factors, Bleeding, and Malignant Transformation. *Gastroenterology.* 2017;152:880-894.e6.
- 142 Ansari D, Andersson R, Bauden MP, Andersson B, Connolly JB, Welinder C, et al. Protein deep sequencing applied to biobank samples from patients with pancreatic cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141:369-80.
- 143 He Y, Cao L, Wang L, Liu L, Huang Y, Gong X. Metformin Inhibits Proliferation of Human Thyroid Cancer TPC-1 Cells by Decreasing LRP2 to Suppress the JNK Pathway. *Onco Targets Ther.* 2020;Volume 13:45-50.
- 144 Weinstein SJ, Mondul AM, Kopp W, Rager H, Virtamo J, Albanes D. Circulating 25-hydroxyvitamin D, vitamin D-binding protein and risk of prostate cancer. *Int J Cancer.* 2013;132:2940-7.
- 145 Shanmugam V, Ramanathan RK, Lavender NA, Sinari S, Chadha M, Liang WS, et al. Whole genome sequencing reveals potential targets for therapy in patients with refractory KRASmutated metastatic colorectal cancer. *BMC Med Genomics.* 2014;7:36.
- 146 Olson JE, Wang X, Goode EL, Pankratz VS, Fredericksen ZS, Vierkant RA, et al. Variation in genes required for normal mitosis and risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119:423-30.
- 147 Shao M, Li W, Wang S, Liu Z. Identification of key genes and pathways associated with esophageal squamous cell carcinoma development based on weighted gene correlation network analysis. *J Cancer.* 2020;11:1393-402.
- 148 Fu L, Shi J, Hu K, Wang J, Wang W, Ke X. Mitogen-activated protein kinase binding protein 1 ( MAPKBP1 ) is an unfavorable prognostic biomarker in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2015;6:8144-54.
- 149 Vandamme T, Beyens M, Peeters M, Van Camp G, de Beeck KO. Next generation exome sequencing of pancreatic neuroendocrine tumor cell lines BON-1 and QGP-1 reveals different lineages. *Cancer Genet.* 2015;208:523.

- 150 Glaab E, Baudot A, Krasnogor N, Valencia A. Extending pathways and processes using molecular interaction networks to analyse cancer genome data. *BMC Bioinformatics*. 2010;11:597.
- 151 Tanner MM, Tirkkonen M, Kallioniemi A, Holli K, Collins C, Kowbel D, et al. Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: prognostic implications. *Clin Cancer Res*. 1995;1:1455-61.
- 152 Brinkmann U, Gallo M, Polymeropoulos MH, Pastan I. The human CAS (cellular apoptosis susceptibility) gene mapping on chromosome 20q13 is amplified in BT474 breast cancer cells and part of aberrant chromosomes in breast and colon cancer cell lines. *Genome Res*. 1996;6:187-94.
- 153 Rees JL, Healy E. Melanocortin receptors, red hair, and skin cancer. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 1997;2:94-8.
- 154 Schüler-Toprak S, Häring J, Inwald EC, Moehle C, Ortmann O, Treeck O. Agonists and knockdown of estrogen receptor  $\beta$  differentially affect invasion of triple-negative breast cancer cells in vitro. *BMC Cancer*. 2016;16:951.
- 155 Ruan J, Zheng L, Hu N, Guan G, Chen J, Zhou X, et al. Long noncoding RNA SNHG6 promotes osteosarcoma cell proliferation through regulating p21 and KLF2. *Arch Biochem Biophys*. 2018;646:128-36.
- 156 Hui Z, Zhanwei W, Xi Y, Jin L, Jing Z, Shuwen H. Construction of ceRNA Coexpression Network and Screening of Molecular Targets in Colorectal Cancer. *Dis Markers*. 2020;2020:1-9.
- 157 Wang G-H, Yao L, Xu H-W, Tang W-T, Fu J-H, Hu X-F, et al. Identification of MXRA5 as a novel biomarker in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2013;5:544-8.
- 158 Poveda J, Sanz AB, Fernandez-Fernandez B, Carrasco S, Ruiz-Ortega M, Cannata-Ortiz P, et al. MXRA5 is a TGF- $\beta$ 1-regulated human protein with anti-inflammatory and anti-fibrotic properties. *J Cell Mol Med*. 2017;21:154-64.
- 159 Jiao AL, Perales R, Umbreit NT, Haswell JR, Piper ME, Adams BD, et al. Human nuclear RNAi-defective 2 (NRDE2) is an essential RNA splicing factor. *RNA*. 2019;25:352-63.
- 160 Wei K, Wu L, Chen Y, Lin Y, Wang Y, Liu X, et al. Argonaute protein as a linker to command center of physiological processes. *Chin J Cancer Res*. 2013;25:430-41.

- 161 Donner I, Katainen R, Kaasinen E, Aavikko M, Sipilä LJ, Pukkala E, et al. Candidate susceptibility variants in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Fam Cancer*. 2019;18:113-9.
- 162 Franceschi S, Lessi F, Aretini P, Mazzanti CM, Menicagli M, La Ferla M, et al. Molecular portrait of a rare case of metastatic glioblastoma: somatic and germline mutations using whole-exome sequencing. *Neuro Oncol*. 2016;18:298-300.
- 163 Pan Y-J, Wei L-L, Wu X-J, Huo F-C, Mou J, Pei D-S. MiR-106a-5p inhibits the cell migration and invasion of renal cell carcinoma through targeting PAK5. *Cell Death Dis*. 2017;8:e3155-e5.
- 164 Zhai J, Qu S, Li X, Zhong J, Chen X, Qu Z, et al. miR-129 suppresses tumor cell growth and invasion by targeting PAK5 in hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;464:161-7.
- 165 Zhang L-N, Yan Y-B. Depletion of poly(A)-specific ribonuclease (PARN) inhibits proliferation of human gastric cancer cells by blocking cell cycle progression. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2015;1853:522-34.
- 166 Shen M, Wu M-Y, Chen L-P, Zhi Q, Gong F-R, Chen K, et al. Cantharidin represses invasion of pancreatic cancer cells through accelerated degradation of MMP2 mRNA. *Sci Rep*. 2015;5:11836.
- 167 Maragozidis P, Papanastasi E, Scutelnic D, Totomi A, Kokkori I, Zarogiannis SG, et al. Poly(A)-specific ribonuclease and Nocturnin in squamous cell lung cancer: prognostic value and impact on gene expression. *Mol Cancer*. 2015;14:187.
- 168 Luo Y, Ellis LZ, Dallaglio K, Takeda M, Robinson WA, Robinson SE, et al. Side Population Cells from Human Melanoma Tumors Reveal Diverse Mechanisms for Chemoresistance. *J Invest Dermatol*. 2012;132:2440-50.
- 169 Worsham MJ, Chen KM, Datta I, Stephen JK, Chitale D, Gothard A, et al. The biological significance of methylome differences in human papilloma virus associated head and neck cancer. *Oncol Lett*. 2016;12:4949-56.
- 170 Balakrishnan A, Penachioni JY, Lamba S, Bleeker FE, Zanon C, Rodolfo M, et al. Molecular profiling of the “plexinome” in melanoma and pancreatic cancer. *Hum Mutat*. 2009;30:1167-74.

- 171 Im J-Y, Kim B-K, Lee K-W, Chun S-Y, Kang M-J, Won M. DDIAS promotes STAT3 activation by preventing STAT3 recruitment to PTPRM in lung cancer cells. *Oncogenesis*. 2020;9(1):1.
- 172 Sun P-H, Ye L, Mason MD, Jiang WG. Protein Tyrosine Phosphatase  $\mu$  (PTP  $\mu$  or PTPRM), a Negative Regulator of Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells, Is Associated with Disease Prognosis. Poojary VK, editor. *PLoS One*. 2012;7:e50183.
- 173 Liu M, Li S, Du M, Chu H, Wang M, Zhang Z. Novel CpG-SNPs in the gastric acid secretion pathway GNAI3 and susceptibility to gastric cancer. *Gene*. 2020;736:144447.
- 174 Cheng H, Zou Y, Ross JS, Wang K, Liu X, Halmos B, et al. RICTOR Amplification Defines a Novel Subset of Patients with Lung Cancer Who May Benefit from Treatment with mTORC1/2 Inhibitors. *Cancer Discov*. 2015;5:1262-70.
- 175 Guan B, Wu K, Zeng J, Xu S, Mu L, Gao Y, et al. Tumor-suppressive microRNA-218 inhibits tumor angiogenesis via targeting the mTOR component RICTOR in prostate cancer. *Oncotarget*. 2017;8:8162-72.
- 176 Guo Z, Zhou Y, Evers BM, Wang Q. Rictor regulates FBXW7-dependent c-Myc and cyclin E degradation in colorectal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418:426-32.
- 177 Toy W, Shen Y, Won H, Green B, Sakr RA, Will M, et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. *Nat Genet*. 2013;45:1439-45.
- 178 Anglim PP, Alonzo TA, Laird-Offringa IA. DNA methylation-based biomarkers for early detection of non-small cell lung cancer: an update. *Mol Cancer*. 2008;7:81.
- 179 Kleeff J, Maruyama H, Friess H, Büchler MW, Falb D, Korc M. Smad6 Suppresses TGF- $\beta$ -Induced Growth Inhibition in COLO-357 Pancreatic Cancer Cells and Is Overexpressed in Pancreatic Cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;255:268-73.
- 180 Jeon H-S, Dracheva T, Yang S-H, Meerzaman D, Fukuoka J, Shakoori A, et al. SMAD6 Contributes to Patient Survival in Non-Small Cell Lung Cancer and Its Knockdown Reestablishes TGF- Homeostasis in Lung Cancer Cells. *Cancer Res*. 2008;68:9686-92.

- 181 Fukushima T, Mashiko M, Takita K, Otake T, Endo Y, Sekikawa K, et al. Mutational analysis of TGF-beta type II receptor, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6 and Smad7 genes in colorectal cancer. *J Exp Clin Cancer Res.* 2003;22:315-20.
- 182 Tomioka N, Morita K, Kobayashi N, Tada M, Itoh T, Saitoh S, et al. Array comparative genomic hybridization analysis revealed four genomic prognostic biomarkers for primary gastric cancers. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010;201:6-14.
- 183 Tanigawa K, Maekawa M, Kiyoi T, Nakayama J, Kitazawa R, Kitazawa S, et al. SNX9 determines the surface levels of integrin  $\beta$ 1 in vascular endothelial cells: Implication in poor prognosis of human colorectal cancers overexpressing SNX9. *J Cell Physiol.* 2019;234:17280-94.
- 184 Russo I, Sheriff F, Morrison P, Russo P, Heulings R, Russo J, et al. The breast of parous women without cancer has a different genomic profile compared to those with cancer. *Int J Oncol.* 2007;31:1165-75.
- 185 Sinreih M, Anko M, Zukunft S, Adamski J, Rižner TL. Important roles of the AKR1C2 and SRD5A1 enzymes in progesterone metabolism in endometrial cancer model cell lines. *Chem Biol Interact.* 2015;234:297-308.
- 186 Lewis MJ, Wiebe JP, Heathcote JG. Expression of progesterone metabolizing enzyme genes (AKR1C1, AKR1C2, AKR1C3, SRD5A1, SRD5A2) is altered in human breast carcinoma. *BMC Cancer.* 2004;4:27.
- 187 Xu B, Liu N, Chen S-Q, Jiang H, Zhang L-J, Zhang X-W, et al. [Expression of SRD5A1 and its prognostic role in prostate cancer: Analysis based on the data-mining of ONCOMINE]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2016;22:771-6.
- 188 Mares J, Szakacsova M, Soukup V, Duskova J, Horinek A, Babjuk M. Prediction of recurrence in low and intermediate risk non-muscle invasive bladder cancer by real-time quantitative PCR analysis: cDNA microarray results. *Neoplasma.* 2013;60:295-301.
- 189 Wang C, Zhao Y, Ming Y, Zhao S, Guo Z. A polymorphism at the microRNA binding site in the 3'-untranslated region of C14orf101 is associated with the risk of gastric cancer development. *Exp Ther Med.* 2016;12:1867-72.
- 190 Gostout BS, Poland GA, Calhoun ES, Sohni YR, Giuntoli II RL, McGovern RM, et al. TAP1, TAP2, and HLA-DR2 alleles are predictors of cervical cancer risk☆. *Gynecol Oncol.* 2003;88:326-32.

- 191 Vitale M, Rezzani R, Rodella L, Zauli G, Grigolato P, Cadei M, et al. HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions. *Cancer Res.* 1998;58:737-42.
- 192 Cao B, Tian X, Li Y, Jiang P, Ning T, Xing H, et al. LMP7/TAP2 gene polymorphisms and HPV infection in esophageal carcinoma patients from a high incidence area in China. *Carcinogenesis.* 2005;26:1280-4.
- 193 Xiong D, Dang Y, Lin P, Wen D, He R, Luo D, et al. A circRNA-miRNA-mRNA network identification for exploring underlying pathogenesis and therapy strategy of hepatocellular carcinoma. *J Transl Med.* 2018;16:220.
- 194 Xie X, Jiang Y, Yuan Y, Wang P, Li X, Chen F, et al. MALDI imaging reveals NCOA7 as a potential biomarker in oral squamous cell carcinoma arising from oral submucous fibrosis. *Oncotarget.* 2016;7:59987-60004.
- 195 Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, Hiraoka N, Wakazono K, Seki S, et al. Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene.* 2004;23:8705-10.
- 196 Matsuura K, Sawai H, Ikeo K, Ogawa S, Iio E, Isogawa M, et al. Eradication of Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology.* 2017;152:1383-94.
- 197 Zhang J, Wang K, Bai R, Liang H, Zhang G, Gong H. Identification of potential targets of microRNA-101-3p in prostate cancer by bioinformatics analysis. 2019;
- 198 Biton A, Bernard-Pierrot I, Lou Y, Krucker C, Chapeaublanc E, Rubio-Pérez C, et al. Independent Component Analysis Uncovers the Landscape of the Bladder Tumor Transcriptome and Reveals Insights into Luminal and Basal Subtypes. *Cell Rep.* 2014;9:1235-45.
- 199 Kompass KS, Witte JS. Co-regulatory expression quantitative trait loci mapping: method and application to endometrial cancer. *BMC Med Genomics.* 2011;4:6.
- 200 Ma X, Chen Z, Hua D, He D, Wang L, Zhang P, et al. Essential role for TrpC5-containing extracellular vesicles in breast cancer with chemotherapeutic resistance. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111:6389-94.
- 201 Cheung SY, Henrot M, Al-Saad M, Baumann M, Muller H, Unger A, et al. TRPC4/TRPC5 channels mediate adverse reaction to the cancer cell cytotoxic agent (-)-Englerin A. *Oncotarget.* 2018;9:29634-43.

- 202 Chen Z, Zhu Y, Dong Y, Zhang P, Han X, Jin J, et al. Overexpression of TrpC5 promotes tumor metastasis via the HIF-1 $\alpha$ -Twist signaling pathway in colon cancer. *Clin Sci*. 2017;131:2439-50.
- 203 Knouf EC, Wyman SK, Tewari M. The Human TUT1 Nucleotidyl Transferase as a Global Regulator of microRNA Abundance. Pfeffer S, editor. *PLoS One*. 2013;8:e69630.
- 204 Zhu D, Lou Y, He Z, Ji M. Nucleotidyl transferase TUT1 inhibits lipogenesis in osteosarcoma cells through regulation of microRNA-24 and microRNA-29a. *Tumor Biol*. 2014;35:11829-35.
- 205 Tut VM, Braithwaite KL, Angus B, Neal DE, Lunec J, Mellon JK. Cyclin D1 expression in transitional cell carcinoma of the bladder: correlation with p53, waf1, pRb and Ki67. *Br J Cancer*. 2001;84:270-5.
- 206 Skálová A, Ptáková N, Santana T, Agaimy A, Ihrler S, Uro-Coste E, et al. NCOA4-RET and TRIM27-RET Are Characteristic Gene Fusions in Salivary Intraductal Carcinoma, Including Invasive and Metastatic Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2019;43:1303-13.
- 207 Hu B, Shi C, Jiang H, Qin S. Identification of novel therapeutic target genes and pathway in pancreatic cancer by integrative analysis. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96:e8261.
- 208 Zhan H, Jiang J, Sun Q, Ke A, Hu J, Hu Z, et al. Whole-Exome Sequencing-Based Mutational Profiling of Hepatitis B Virus-Related Early-Stage Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterol Res Pract*. 2017;2017:1-7.
- 209 Wang Y, Liyanarachchi S, Miller KE, Nieminen TT, Comiskey DF, Li W, et al. Identification of Rare Variants Predisposing to Thyroid Cancer. *Thyroid*. 2019;29:946-55.
- 210 Ho AS, Kannan K, Roy DM, Morris LGT, Ganly I, Katabi N, et al. The mutational landscape of adenoid cystic carcinoma. *Nat Genet*. 2013;45:791-8.
- 211 Prat A, Cruz C, Hoadley KA, Díez O, Perou CM, Balmaña J. Molecular features of the basal-like breast cancer subtype based on BRCA1 mutation status. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;147:185-91.
- 212 Zhang Q, Burdette JE, Wang J-P. Integrative network analysis of TCGA data for ovarian cancer. *BMC Syst Biol*. 2014;8:1338.



- 213 Zhang Y, Tian Y, Yu J-J, He J, Luo J, Zhang S, et al. Overexpression of WDR62 is associated with centrosome amplification in human ovarian cancer. *J Ovarian Res.* 2013;6:55.
- 214 Sugita S, Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Matsushita R, Sakaguchi T, et al. Tumor-suppressive microRNA-223 targets WDR62 directly in bladder cancer. *Int J Oncol.* 2019;2222-36.
- 215 Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, Igarashi H, Inoue Y, Yoshimura K, et al. WDR62 overexpression is associated with a poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Mol Carcinog.* 2017;56:1984-91.
- 216 Nishizawa Y, Konno M, Asai A, Koseki J, Kawamoto K, Miyoshi N, et al. Oncogene c-Myc promotes epitranscriptome m6A reader YTHDF1 expression in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2018;9:7476-86.
- 217 Shi Y, Fan S, Wu M, Zuo Z, Li X, Jiang L, et al. YTHDF1 links hypoxia adaptation and non-small cell lung cancer progression. *Nat Commun.* 2019;10:4892.
- 218 Zhao X, Chen Y, Mao Q, Jiang X, Jiang W, Chen J, et al. Overexpression of YTHDF1 is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Biomarkers.* 2018;21:859-68.
- 219 Gao C, Zhuang J, Zhou C, Ma K, Zhao M, Liu C, et al. Prognostic value of aberrantly expressed methylation gene profiles in lung squamous cell carcinoma: A study based on The Cancer Genome Atlas. *J Cell Physiol.* 2019;234:6519-28.
- 220 Ge W, Cai W, Bai R, Hu W, Wu D, Zheng S, et al. A novel 4-gene prognostic signature for hypermutated colorectal cancer. *Cancer Manag Res.* 2019;11:1985-96.
- 221 Xu G, Li K, Zhang N, Zhu B, Feng G. Screening Driving Transcription Factors in the Processing of Gastric Cancer. *Gastroenterol Res Pract.* 2016;2016:1-9.
- 222 Kinyamu HK, Collins JB, Grissom SF, Hebbar PB, Archer TK. Genome wide transcriptional profiling in breast cancer cells reveals distinct changes in hormone receptor target genes and chromatin modifying enzymes after proteasome inhibition. *Mol Carcinog.* 2008;47:845-85.
- 223 Xu B, Li S, Lv W, Wang Y, Li X, Zhang L, et al. Transcriptomic analysis reveals the underlying pro-malignant functions of Gankyrin for colorectal cancer via affecting tumor necrosis factor pathway. *Int J Biol Macromol.* 2018;117:1011-6.

- 224 King M-C. Breast and Ovarian Cancer Risks Due to Inherited Mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science*. 2003;302:643-6.
- 225 Murphy KM, Brune KA, Griffin C, Sollenberger JE, Petersen GM, Bansal R, et al. Evaluation of candidate genes MAP2K4, MADH4, ACVR1B, and BRCA2 in familial pancreatic cancer: deleterious BRCA2 mutations in 17%. *Cancer Res*. 2002;62:3789-93.
- 226 Keino-Masu K, Masu M, Hinck L, Leonardo ED, Chan SS-Y, Culotti JG, et al. Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Encodes a Netrin Receptor. *Cell*. 1996;87:175-85.
- 227 Uchino S, Tsuda H, Noguchi M, Yokota J, Terada M, Saito T, et al. Frequent Loss of Heterozygosity at the DCC Locus in Gastric Cancer. *Cancer Res*. 1992;52:3099-102.
- 228 Kim MS, Li SL, Bertolami CN, Cherrick HM, Park NH. State of p53, Rb and DCC tumor suppressor genes in human oral cancer cell lines. *Anticancer Res*. 1993;13:1405-13.
- 229 Schlott T, Ahrens K, Ruschenburg I, Reimer S, Hartmann H, Droese M. Different gene expression of MDM2, GAGE-1, -2 and FHIT in hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia. *Br J Cancer*. 1999;80:73-8.
- 230 Karia BTR, Zamuner FT, Carlin V, de Oliveira CZ, Carvalho AL, Vettore AL. Expression and Prognostic Relevance of GAGE1 and XAGE1 Cancer/Testis Antigens in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Curr Mol Med*. 2018;17:707-17.
- 231 Yang H, Liu H, Lin H-C, Gan D, Jin W, Cui C, et al. Association of a novel seven-gene expression signature with the disease prognosis in colon cancer patients. *Aging (Albany NY)*. 2019;11:8710-27.
- 232 Dong J, Jin G, Wu C, Guo H, Zhou B, Lv J, et al. Genome-Wide Association Study Identifies a Novel Susceptibility Locus at 12q23.1 for Lung Squamous Cell Carcinoma in Han Chinese. McCarthy MI, editor. *PLoS Genet*. 2013;9:e1003190.
- 233 Lu M, Kong X, Wang H, Huang G, Ye C, He Z. A novel microRNAs expression signature for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis. *Oncotarget*. 2017;8:8775-84.
- 234 Pflueger D, Terry S, Sboner A, Habegger L, Esgueva R, Lin P-C, et al. Discovery of non-ETS gene fusions in human prostate cancer using next-generation RNA sequencing. *Genome Res*. 2011;21:56-67.
- 235 Dressman HK, Berchuck A, Chan G, Zhai J, Bild A, Sayer R, et al. An Integrated Genomic-Based Approach to Individualized Treatment of Patients With Advanced-Stage Ovarian Cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25:517-25.

- 236 Panou V, Gadiraju M, Wolin A, Weipert CM, Skarda E, Husain AN, et al. Frequency of germline mutations in cancer susceptibility genes in malignant mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2018;36:2863-71.
- 237 Lee S-H, Lee Y-J, Park SI, Kim J-E. Unique cartilage matrix-associated protein inhibits the migratory and invasive potential of triple-negative breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;530:680-5.
- 238 Zou Y, Zhou J-Y, Guo J-B, Zhang Z-Y, Luo Y, Liu F-Y, et al. Mutation analysis of ZP1, ZP2, ZP3 and ZP4 genes in 152 Han Chinese samples with ovarian endometriosis. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 2019;813:46-50.
- 239 Costa J, Pereira R, Oliveira J, Alves Â, Marques-Magalhães Â, Frutuoso A, et al. Structural and molecular analysis of the cancer prostate cell line PC3: Oocyte zona pellucida glycoproteins. *Tissue Cell*. 2018;55:91-106.
- 240 Ryu B, Kim DS, DeLuca AM, Alani RM. Comprehensive Expression Profiling of Tumor Cell Lines Identifies Molecular Signatures of Melanoma Progression. *PLoS One*. 2007;2:e594.
- 241 O'Shea SJ, Robles-Espinoza CD, McLellan L, Harrigan J, Jacq X, Hewinson J, et al. A population-based analysis of germline BAP1 mutations in melanoma. *Hum Mol Genet*. 2017 Feb 15;26(4):717-728.
- 242 Morrison A, Chekaluk Y, Bacares R, Ladanyi M, Zhang L. BAP1 Missense Mutation c.2054 A>T (p.E685V) Completely Disrupts Normal Splicing through Creation of a Novel 5' Splice Site in a Human Mesothelioma Cell Line. Buratti E, editor. *PLoS One*. 2015;10:e0119224.
- 243 Liu M, Li S, Du M, Chu H, Wang M, Zhang Z. Novel CpG-SNPs in the gastric acid secretion pathway GNAI3 and susceptibility to gastric cancer. *Gene*. 2020;736:144447.
- 244 Wadt K, Choi J, Chung J-Y, Kiilgaard J, Heegaard S, Drzewiecki KT, et al. A cryptic BAP1 splice mutation in a family with uveal and cutaneous melanoma, and paraganglioma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012;25:815-8.
- 245 Eckel-passow JE, Serie DJ, Bot BM, Joseph RW, Cheville JC, Parker AS. ANKS1B is a smoking-related molecular alteration in clear cell renal cell carcinoma. *BMC Urol*. 2014 Jan 31;14:14.

- 246 Mamoor S. Differential expression of ADCYAP receptor type I in cancers of the breast. *OSF Prepr.* 2021;
- 247 Hu G, Wang R, Wei B, Wang L, Yang Q, Kong D, et al. Prognostic Markers Identification in Glioma by Gene Expression Profile Analysis. *J Comput Biol.* 2020;27:81-90.
- 248 Sun C, Gu Y, Chen G, Du Y. Bioinformatics Analysis of Stromal Molecular Signatures Associated with Breast and Prostate Cancer. *J Comput Biol.* 2019;26:1130-9.
- 249 Ibanez de Caceres I, Cortes-Sempere M, Moratilla C, Machado-Pinilla R, Rodriguez-Fanjul V, Manguán-García C, et al. IGFBP-3 hypermethylation-derived deficiency mediates cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Oncogene.* 2010;29:1681-90.
- 250 Hong S-J, Oh J-H, Jeon E-J, Min K-O, Kang M-I, Choi S-W, et al. The overmethylated genes in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa are demethylated in gastric cancers. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:137.
- 251 LaBonte MJ, Wilson PM, Fazzone W, Groshen S, Lenz H-J, Ladner RD. DNA microarray profiling of genes differentially regulated by the histone deacetylase inhibitors vorinostat and LBH589 in colon cancer cell lines. *BMC Med Genomics.* 2009;2:67.
- 252 Mallo GV, Soubeyran P, Lissitzky J-C, André F, Farnarier C, Marvaldi J, et al. Expression of the Cdx1 and Cdx2 Homeotic Genes Leads to Reduced Malignancy in Colon Cancer-derived Cells. *J Biol Chem.* 1998;273:14030-6.
- 253 Kang JM, Lee BH, Kim N, Lee HS, Lee HE, Park JH, et al. CDX1 and CDX2 expression in intestinal metaplasia, dysplasia and gastric cancer. *J Korean Med Sci.* 2011;26:647-53.
- 254 Wu Y, Zhang X, Shen R, Huang J, Lu X, Zheng G, et al. Expression and significance of ETFDH in hepatocellular carcinoma. *Pathol - Res Pract.* 2019;215:152702.
- 255 Tapak L, Saidijam M, Sadeghifar M, Poorolajal J, Mahjub H. Competing Risks Data Analysis with High-dimensional Covariates: An Application in Bladder Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2015;13:169-76.
- 256 Yan L, Gong Y, Shao M, Ruan G, Xie H, Liao X, et al. Distinct diagnostic and prognostic values of  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor family genes in patients with colon adenocarcinoma. *Oncol Lett.* 2020;20:275-91.

- 257 Hirasawa A, Imoto I, Naruto T, Akahane T, Yamagami W, Nomura H, et al. Prevalence of pathogenic germline variants detected by multigene sequencing in unselected Japanese patients with ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017;8:112258-67.
- 258 Laurila E, Vuorinen E, Savinainen K, Rauhala H, Kallioniemi A. KPNA7, a nuclear transport receptor, promotes malignant properties of pancreatic cancer cells in vitro. *Exp Cell Res*. 2014;322:159-67.
- 259 Vuorinen EM, Rajala NK, Ihalainen TO, Kallioniemi A. Depletion of nuclear import protein karyopherin alpha 7 (KPNA7) induces mitotic defects and deformation of nuclei in cancer cells. *BMC Cancer*. 2018;18:325.
- 260 Jo YS, Oh HR, Kim MS, Yoo NJ, Lee SH. Frameshift mutations of OGDH, PPAT and PCCA genes in gastric and colorectal cancers. *Neoplasma*. 2016;63:681-6.
- 261 Teng C, Zheng H. Low expression of microRNA-1908 predicts a poor prognosis for patients with ovarian cancer. *Oncol Lett*. 2017;14:4277-81.
- 262 Zhu M-H, Ji S-L, Zhang C-Y, Cui L, Xiong L, Zheng H-L. DNA microarray reveals ZNF195 and SBF1 are potential biomarkers for gemcitabine sensitivity in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7:1514-23.
- 263 Seoane S, Montero JC, Ocaña A, Pandiella A. Breast cancer dissemination promoted by a neuregulin-collagenase 3 signalling node. *Oncogene*. 2016;35:2756-65.
- 264 Mukai S, Oue N, Oshima T, Mukai R, Tatsumoto Y, Sakamoto N, et al. Overexpression of Transmembrane Protein BST2 is Associated with Poor Survival of Patients with Esophageal, Gastric, or Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2017;24:594-602.
- 265 Shen L, Du X, Ma H, Mei S. miR-1193 Suppresses the Proliferation and Invasion of Human T-Cell Leukemia Cells Through Directly Targeting the Transmembrane 9 Superfamily 3 (TM9SF3). *Oncol Res*. 2017;25:1643-51.
- 266 Oo HZ, Sentani K, Sakamoto N, Anami K, Naito Y, Oshima T, et al. Identification of Novel Transmembrane Proteins in Scirrhous-Type Gastric Cancer by the Escherichia coli Ampicillin Secretion Trap (CAST) Method: TM9SF3 Participates in Tumor Invasion and Serves as a Prognostic Factor. *Pathobiology*. 2014;81:138-48.
- 267 Furuya S, Chimed-Ochir O, Takahashi K, David A, Takala J. Global Asbestos Disaster. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(5):1000.

- 268 Marinaccio A, Corfiati M, Binazzi A, Di Marzio D, Scarselli A, Ferrante P, et al. The epidemiology of malignant mesothelioma in women: gender differences and modalities of asbestos exposure. *Occup Environ Med.* 2018;75:254-62.
- 269 Alpert N, van Gerwen M, Flores R, Taioli E. Gender Differences in Outcomes of Patients With Mesothelioma. *Am J Clin Oncol.* 2020;43:792-7.
- 270 Consonni D, Migliore E, Barone-Adesi F, Dallari B, De Matteis S, Oddone E, et al. Gender differences in pleural mesothelioma occurrence in Lombardy and Piedmont, Italy. *Environ Res.* 2019;177:108636.
- 271 De Rienzo A, Archer MA, Yeap BY, Dao N, Sciaranghella D, Sideris AC, et al. Gender-Specific Molecular and Clinical Features Underlie Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Res.* 2016;76:319-28.
- 272 Nasu M, Emi M, Pastorino S, Tanji M, Powers A, Luk H, et al. High incidence of somatic BAP1 alterations in sporadic malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol.* 2015;10:565-76.
- 273 Xu J, Kadariya Y, Cheung M, Pei J, Talarchek J, Sementino E, et al. Germline mutation of Bap1 accelerates development of asbestos-induced malignant mesothelioma. *Cancer Res.* 2014;74:4388-97.
- 274 Ohar JA, Cheung M, Talarchek J, Howard SE, Howard TD, Hesdorffer M, et al. Germline BAP1 Mutational Landscape of Asbestos-Exposed Malignant Mesothelioma Patients with Family History of Cancer. *Cancer Res.* 2016;76:206-15.
- 275 McGregor SM, Dunning R, Hyjek E, Vigneswaran W, Husain AN, Krausz T. BAP1 facilitates diagnostic objectivity, classification, and prognostication in malignant pleural mesothelioma. *Hum Pathol.* 2015;46:1670-8.
- 276 Farzin M, Toon CW, Clarkson A, Sioson L, Watson N, Andrici J, et al. Loss of expression of BAP1 predicts longer survival in mesothelioma. *Pathology.* 2015;47:302-7.
- 277 Cantini L, Pecci F, Murrone A, Tomasetti M, Copparoni C, Fiordoliva I, et al. Questioning the prognostic role of BAP-1 immunohistochemistry in malignant pleural mesothelioma: a single center experience with systematic review and meta-analysis. *Lung Cancer.* 2020;146:318-26.
- 278 Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol.* 2014;4:64.

- 279 Huang W-C, Hung M-C. Induction of Akt activity by chemotherapy confers acquired resistance. *J Formos Med Assoc.* 2009;108:180-94.
- 280 Sekido. Activation of the PI3K-AKT pathway in human malignant mesothelioma cells. *Mol Med Rep.* Mar-Apr 2009;2(2):181-8.
- 281 Morgan TM, Koreckij TD, Corey E. Targeted therapy for advanced prostate cancer: inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009;9:237-49.
- 282 Sarris EG, Saif MW, Syrigos KN. The Biological Role of PI3K Pathway in Lung Cancer. *Pharmaceuticals (Basel).* 2012;5:1236-64.
- 283 Opitz I, Soltermann A, Abaecherli M, Hinterberger M, Probst-Hensch N, Stahel R, et al. PTEN expression is a strong predictor of survival in mesothelioma patients☆. *Eur J Cardio-Thoracic Surg.* 2008;33:502-6.
- 284 Verma V, Ahern CA, Berlind CG, Lindsay WD, Shabason J, Sharma S, et al. Survival by Histologic Subtype of Malignant Pleural Mesothelioma and the Impact of Surgical Resection on Overall Survival. *Clin Lung Cancer.* 2018;19:e901-12.
- 285 Amin W, Linkov F, Landsittel DP, Silverstein JC, Bashara W, Gaudioso C, et al. Factors influencing malignant mesothelioma survival: A retrospective review of the national mesothelioma virtual bank cohort[version 3; peer review: 2 approved, 1 approved with reservations]. *F1000Research.* 2018;7:1-18.

# Lung Cancer

## Malignant Pleural Mesothelioma: an update.

--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	LUNGCANCER-D-21-00187
<b>Article Type:</b>	Review Article
<b>Keywords:</b>	mesothelioma; Treatment; diagnosis; molecular mechanisms
<b>Corresponding Author:</b>	Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima, M.D., Ph.D. AC Camargo Cancer Center Sao Paulo, BRAZIL
<b>First Author:</b>	Glauca N M Hajj
<b>Order of Authors:</b>	Glauca N M Hajj
	Carolina H. Cavarson
	Gabriela Venturi
	João R. Navarro
	Vladmir C. Cordeiro de Lima
<b>Abstract:</b>	Malignant mesotheliomas are rare cancers that affect mostly the pleura and peritoneum. They are associated with the exposure to asbestos, but due to a latency period of more than 30 years and a difficult diagnosis, most cases are identified in an advanced stage. Treatment options are very limited for this tumor type and survival ranges between 12 and 36 months. This review discusses molecular mechanisms, latest indications for diagnosis and therapeutic options for this disease.
<b>Suggested Reviewers:</b>	Vilma Santana vilma@ufba.br
	Andres Cardonas a_cardonaz@yahoo.com
	Eduardo Algranti eduardo@fundacentro.gov.br



Dear Dr. Rolf Stahel,

Please find enclosed the manuscript entitled "Malignant Pleural Mesothelioma: an update." by Glauca N. M. Hajj, Carolina H. Cavarson, Gabriela Venturi, João R. Navarro and Vladmir C. Cordeiro de Lima for consideration in Lung Cancer.

Mesotheliomas are a rare tumor type that still represent associated to occupational hazards. It still represents a burden due to the use of asbestos in several countries, difficult diagnosis and absence of effective treatment modalities. Our review presents the updated knowledge in the field, including known molecular mechanisms for the disease, diagnosis methods and latest clinical trials

I hope you would find the manuscript suitable for publication.

Sincerely,

Vladmir C. Cordeiro de Lima, MD. PhD

Rede D'Or,

São Paulo, Brazil

## Highlights

- Mesothelioma are rare tumors associated to asbestos exposure
- Mesothelioma diagnosis is difficult and therapeutic options are limited
- This review covers new advances in therapeutic options
- This review includes updates in the knowledge of molecular mechanisms

# Malignant Pleural Mesothelioma: an update.

Glaucia N. M. Hajj<sup>1,2\*</sup>, Carolina H. Cavarson<sup>1,2</sup>, Gabriela Venturi<sup>1,2</sup>, João R. Navarro<sup>3</sup>,  
Vladmir C. Cordeiro de Lima<sup>2,4\*</sup>

<sup>1</sup>International Research Institute, A.C. Camargo Cancer Center. Rua Taguá, 440, São Paulo, Brazil. ZIP Code: 01508-010.

<sup>2</sup>National Institute of Oncogenomics and Innovation.

<sup>3</sup>BP Mirante. Rua Martiniano de Carvalho, 965, São Paulo, Brazil. ZIP Code: 01321-001

<sup>4</sup>Rede D'Or. Av. Pres. Juscelino Kubitschek, 180 - Itaim Bibi, São Paulo, Brazil. ZIP Code: 04543-000

\*Corresponding authors

E-mail addresses: [ghajj@accamargo.org.br](mailto:ghajj@accamargo.org.br) (G.N.M. Hajj)

[vladmir.lima@oncologiadador.com.br](mailto:vladmir.lima@oncologiadador.com.br) (V.C. Cordeiro de Lima)

## Abstract

Malignant mesotheliomas are rare cancers that affect mostly the pleura and peritoneum. They are associated with the exposure to asbestos, but due to a latency period of more than 30 years and a difficult diagnosis, most cases are identified in an advanced stage. Treatment options are very limited for this tumor type and survival ranges between 12 and 36 months. This review discusses molecular mechanisms, latest indications for diagnosis and therapeutic options for this disease.

## 1. Introduction

Malignant mesotheliomas (MM) are uncommon cancers that are associated with occupational or environmental exposure to asbestos in 80% of cases [1]. The first MM reported case associated with asbestos was in 1967 in the USA, when an epidemic of MM in miners occurred and the relationship between asbestos exposure and the development of the disease was characterized. MM was extremely rare until the second half of the 20th century, nevertheless, its incidence has been increasing. This continuous increase in the incidence of MM has been associated to the indiscriminate use of asbestos in the last

century [2]. The real extent of the global epidemic of MM is unknown. Nowadays, the greatest burden of asbestos use is concentrated in most countries from BRICS (Brazil, Russia, India and China)[3].

The pleura is the most common site of origin of MM (73-85%), followed by the peritoneum (7-18%) [4–6]. MM affects males (male to female ratio 5:1) predominantly, and risk increases with aging, being more prevalent in individuals older than 65 years [7,8].

The highest incidence rates of MM are observed in the United Kingdom, Australia and New Zealand, and the lowest in Japan and countries from central Europe [9]. It has been estimated there will be around 94,000 cases of MPM and 15,000 cases of malignant peritoneal mesothelioma diagnosed from 2005 to 2050 in the USA [10].

Germline mutations in cancer predisposition genes are reported in approximately 12% of MPM patients, being more common among younger patients, females, patients without no or minimal exposure to asbestos and those with familial history of cancer or with secondary malignancies (melanoma, mesothelioma, breast cancer). *BAP1* is the most frequent gene mutated in this scenario, accounting for 3-7% of cases [11–13].

## **2. The role of asbestos in mesothelioma's pathogenesis**

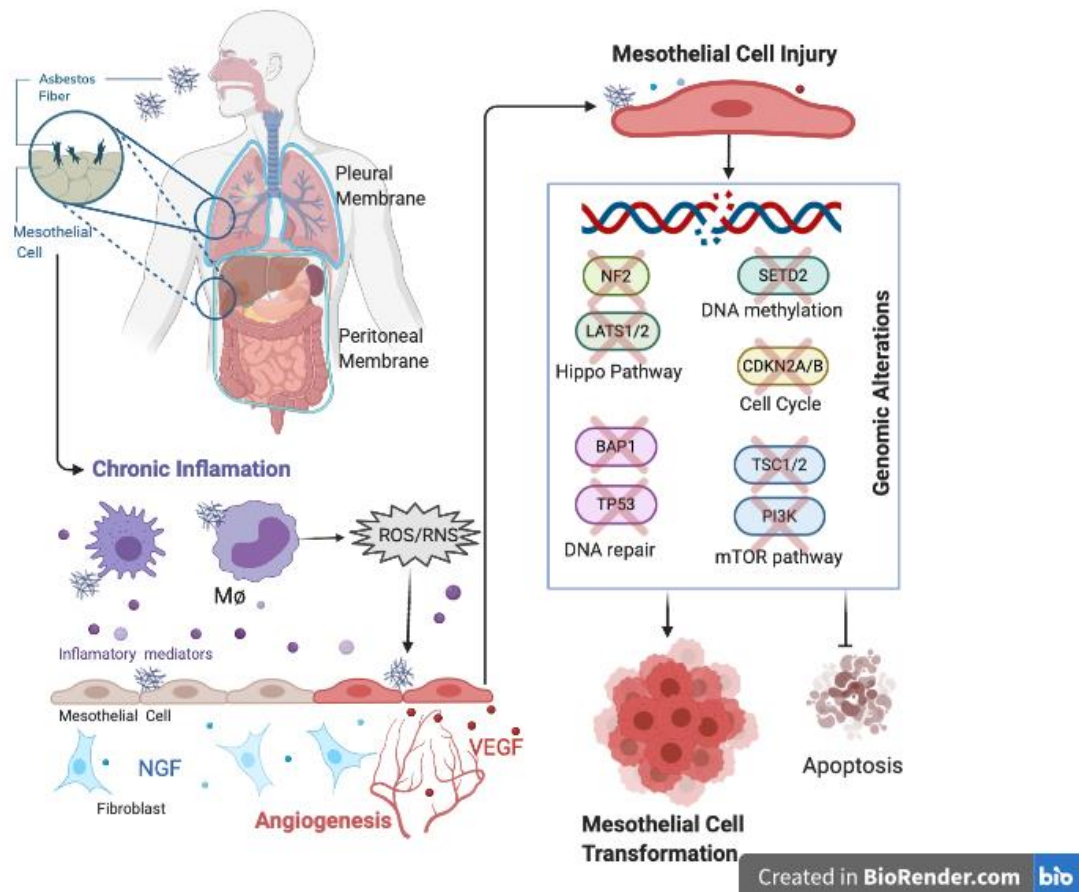
Asbestos is the generic name of six variants of fibrous minerals found in magmatic and metamorphic rocks: chrysotile (serpentine – white asbestos); amosite and actinolite (amphiboles – brown asbestos); and anthophyllite, crocidolite e tremolite (blue asbestos)[11]. The association between exposure to amphiboles and MM of the pleura (MPM) is well described, particularly, crocidolite is regarded the most oncogenic variant. It is believed that the thinner and longer the fibers are (specially, those  $\geq 8,0\mu\text{m}$  long and  $\leq 0,25\mu\text{m}$  wide) more hazardous they become, because they have longer persistence in the pleura, penetrating the lungs, causing repeated tissue damage and repair, and local inflammation[14]. The exposure to asbestos and other fibrous minerals can cause asbestosis, lung cancer, benign pleuritis, pleural plaques and MPM [15,16]. On the other hand, asbestos exposure is much weakly linked to peritoneal MM, where 33–50% of patients report prior exposure to asbestos and time and duration of exposure do not directly correlate with disease development [9].

Although the association between exposure to asbestos and the mesothelioma pathogenesis is broadly accepted, there is no unifying hypothesis to explain how this take place. Nonetheless, it is not known why only a small fraction of the individuals exposed to asbestos develop MM (only 2% to 10%). On the other hand, up to 80% of MPM patients have had a previous exposure to asbestos [14] (**Figure 1**).

Mesothelial cells (MC) are very susceptible to the cytotoxicity of asbestos and many pathogenic events can contribute to the carcinogenesis during the long latency period between the exposure to asbestos and tumor development [17]. MC can suffer several cellular alterations due to asbestos exposure, such as DNA damage, cell cycle inhibition and apoptosis [18–21]. On the other hand, MC can also initiate the production of inflammatory mediators [22].

The mechanisms by which inflammatory processes impact the development of MM are still not completely understood, however, there is a growing body of evidence suggesting a relationship between local and systemic inflammatory response and patient prognosis [23]. The presence of an intense and persistent systemic inflammatory reaction, characterized by leucocyte migration and cytokine secretion promotes malignant transformation of the mesothelial cell [24,25]. Malignant cells attract myeloid derived stem cells (MDSCs), tumor associated macrophages (TAMs) and regulatory lymphocytes (Treg cells). These cells potentiate tumor development, favoring immune escape, tumor associated fibroblasts and angiogenesis [26,27]. Thus, it is believed that part of the pathogenetic mechanism of asbestos fibers is that their retention in the pleura for long periods, triggers repeated cycles of lesion/repair at the inflammation site [28–30]. In fact, the presence of inflammatory cells on the tumor is a prognostic factor [23,31–34] (**Figure 1**).

Tumor necrosis factor-alpha (TNFA) and nuclear factor-kB (NF-kB) signaling were also involved in MC response to asbestos. Crocidolite causes the accumulation of macrophages in the pleura and lung, and these macrophages release TNFA. Crocidolite also induces MC to express the TNFA receptor, TNF-R1, as well as to secrete TNFA (thus causing paracrine and autocrine responses) [35]. The activation of the NF-kB pathway by TNFA allows MC with asbestos-induced DNA damage to eventually evolve into MM. In fact, asbestos causes breaks in the DNA strand mediated by free radicals whose production is catalyzed by iron. In addition, by causing the release of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) asbestos fibers can indirectly induce genotoxicity that may lead to a wide spectrum of mutations [36] (**Figure 1**).



**Figure 1. Molecular mechanisms associated with malignant mesothelioma pathogenesis.**

Inhaled asbestos fibers transverse terminal airways and lodge themselves in the pleural space. Macrophages try to phagocytize these fibers without effect and in doing that they release reactive oxygen species and reactive nitrogen species, which may promote genotoxic damage, and recruit other inflammatory and immune cells. Repeated DNA damage by ROS and RNS may lead to the accumulation of oncogenic mutations in the mesothelial cells. The genes most frequently mutated in mesothelioma and that may be associated with malignant transformation of mesothelial cells are involved with DNA repair, the Hippo pathway, cell cycle control, DNA methylation and the mTOR pathway. Germ line mutations in genes associated with DNA repair (*BAP1*, *BRCA1*, *CHECK2*, etc) are found in 12% of mesothelioma patients and are associated with earlier disease onset and good prognosis. In parallel, the inflammatory mediators released in the microenvironment may promote cell survival (inhibiting apoptotic signals) and stimulate mesothelial cell proliferation (even in the presence of DNA damage), activate fibroblast to produce extracellular matrix proteins, and promote neovascularization. These modifications favor tumor growth and create an immunosuppressive milieu. M $\phi$ -macrophages; ROS-reactive oxygen species; RNS-reactive nitrogen species; NGF-neurotrophic growth factor; VEGF-vascular endothelial growth factor. Created with BioRender.com.

### **3. MPM Clinical presentation, diagnosis and classification**

The latency period between the initial asbestos exposure and mesothelioma diagnosis is about 30 years. Diagnosis is difficult, as there are no imaging methods or blood markers to identify this disease at an early stage [37]. After the diagnosis patients with localized disease survive between 12 and 36 months, and patients with advanced disease, between 8 and 14 months. Most newly diagnosed patients have advanced disease and the first-line treatment extends the survival time by an average of about 3 months [8,38].

The most frequent clinical manifestation of MPM is progressive dyspnea, usually secondary to the formation of pleural effusion, associated or not with non-pleuritic chest pain caused by the invasion of the chest wall. Non-productive cough, fever, asthenia, hypoxia, weight loss or night sweats may also be present. The disease is generally unilateral (95%) and predominantly located in the right hemithorax (60%). The symptoms commonly manifest insidiously, determining a long time from initial presentation to diagnosis, about 3 to 6 months, ultimately leading to diagnosis in a more advanced stage [11,38].

The diagnosis depends on the integration of clinical presentation, imaging and pathology. Notably, pleural effusion can be observed in up to 95% of cases on physical examination or chest X-ray, however, as the disease progresses, its volume reduces. The presence of chest pain or a palpable mass indicates invasion of the chest wall and, therefore, surgical unresectability. Chest tomography, as well as thoracic nuclear magnetic resonance, may allow the visualization of pleural effusion, assess the size of hilar and mediastinal lymph nodes as well as the presence of pleural masses, with magnetic resonance imaging being a more sensitive method and, thus, a method to be considered in potentially resectable cases [38]. PET-CT, in turn, is useful in detecting lymph node involvement, contralateral thoracic involvement and distant metastases [11,39].

Pleural fluid cytology allows MPM diagnosis in up to 1/3 of cases of pleural mesotheliomas. Blind pleural biopsy increases this accuracy; however, computed tomography-guided pleural biopsy is more sensitive, capable of establishing the diagnosis in approximately 87% of cases [38]. The use of video-assisted thoracoscopy is the ideal diagnostic method and has an accuracy greater than 95% [40].

The histopathological diagnosis of mesothelial lesions presents considerable challenges that include differentiation of malignant lesions from benign tumors and reactive mesothelial hyperplasia or reactive fibrous pleuritis. This is complicated by the fact that MPM morphological patterns can simulate a variety of epithelial and non-epithelial malignancies, such as lung adenocarcinoma [38,41]. Immunohistochemistry (IHC) is paramount to separate these pathological entities one from another [42]

However, no single IHC marker is sufficiently sensitive or specific to identify MPM, thus the use of panels consisting of at least two carcinoma markers (e.g., pCEA, TTF-1, among others) and two mesothelial markers (i.e., WT1, calretinin, CK5/6, D2-40) are recommended [43]. Recently loss of BAP1 expression by IHC, homozygous deletion of *CDKN2A* (p16) by FISH and the expression methylthioadenosine phosphorylase (MTAP) by IHC were added as markers to differentiate non- neoplastic and neoplastic cells when the mesothelial proliferation is limited to the serosal surface [42].

The 2015 WHO classification divides MM into epithelioid (36 - 53%), biphasic (11 - 19%) and sarcomatoid subtypes (12 - 27%), recognizing desmoplastic features in the sarcomatoid subtype. In some cases, classification can be difficult, due to the presence of mixed populations [44,45]. In addition to the three histological types of MM, there are several unusual and rare subtypes with the potential for misdiagnosis, such as desmoplastic sarcomatoid, small cell and lymphohistiocytoid MM (susceptible of differential diagnosis error with Hodgkin's or non-Hodgkin's lymphoma) [46–48]. Patients with sarcomatoid and biphasic tumors have significantly worse survival when compared to patients with epithelioid mesothelioma [49].

## **4. Molecular pathways of MM**

### *4.1 Genomic Alterations*

The understanding of the molecular mechanisms associated with the development of MM (Table 1) began with conventional cytogenetic analyses and comparative genomic hybridization (CGH) analyses that have shown numeric alterations in all chromosomes, with losses being more common than gains [50,51]. These studies have revealed a complex, pattern of chromosomal aberrations in MPM and suggest that gene copy number alterations (CNA) are a major mechanism of carcinogenesis in this disease [52].



Several sites of chromosomal losses were observed in 1p, 3p, 4, 6q, 9p, 11q, 13q, 14q, 15q, 17p, 18q, and 22q [51–54], suggesting the involvement of tumor suppressor genes in the deleted regions. Although less common, chromosomal gains of 5p, 7p, 8q, 12p, 17q and 18q have also been documented [55].

Frequently deleted loci include the tumor suppressors *CDKN2A* (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) [56], located at 9p21.3, *NF2* (neurofibromin 2) [57,58] at 22q12, *BAP1*(BRCA1-associated protein-1), located at 3p21.3 [59,60] and *TP53* at 17p13. *CDKN2A*, which codes for p16-INK4 and ARF is the tumor suppressor gene most frequently inactivated in MM, with an incidence of homozygotic deletion of 50% [56,61,62]. Loss of *CDKN2A* is associated with non-epithelial histology [63] and worse patient survival [53,64,65]. *NF2* codes for the protein Merlin [58], a transcriptional co-activator associated with ubiquitin ligase complexes and the Hippo pathway [66,67].

Approximately 20%–40% of MM have deletions or mutations in *BAP1* [59,61,68] and germline mutations increase the risk of mesothelioma development[60]. In mice models, the inactivation of only one *BAP1* allele increases asbestos tumorigenicity [60]. In approximately 8% of MM cases, there are *TP53* mutations. Although this incidence is much smaller than observed in other tumor types[61], it is important to highlight that *CDKN2A*, which codes for ARF and reduces MDM2 expression, is frequently lost. Thus, upon *CDKN2A* deletion there is an increase in MDM2 expression that triggers p53 ubiquitination and degradation [69,70]. Thus, the decreased p53 expression due to *CDKN2A* deletion has a phenotype similar to *TP53* mutation. In fact, animal models heterozygous for p53 develop MM faster when exposed to asbestos [71].

No oncogene has been identified in MM to date, suggesting that MM is a malignancy resulting from inhibition of cellular mechanisms of tumor suppression rather than transformation by activation of oncogenes [72].

The advance of next generation sequencing allowed for several groups to provides a comprehensive analysis of molecular alterations in MM, that not only confirmed the previously found CNA but also revealed that the same genes also present frequent point mutations [73–75].

Bueno et al. (2016) published an analysis of 95 human tumors that confirmed previous findings of alterations in tumor suppressor genes CNAs (eg, *BAP1*, *NF2*, *CDKN2B*, and *TP53*). In addition, newly identified mutations were described in genes including histone modifiers, such as *SETD2*, *SETDB1*, and *SETD5*, RNA helicase family

members *DDX3X* and *DDX51*, a target of mTOR negative regulation *ULK2*, and a calcium channel component *RYR2* [61].

In a second landmark study using a cohort of 74 MM, the TCGA report the deletion of *CDKN2A* and *NF2* loss by deletion or mutation. *CDKN2A* deletions often encompass *MTAP*, which encodes methylthioadenosine phosphorylase, whose deficiency has recently been reported to lead to reduced PRMT5 enzymatic activity and heightened sensitivity to its pharmacologic inhibition [76]. Loss of *CDKN2A* was strongly associated with shorter overall survival and non-epithelioid histology [53,63–65].

Other confirmatory work in a cohort of 42 patients [77] and a large cohort of 266 cases used for targeted sequencing of the major MPM mutated genes (*BAP1*, *NF2*, *TP53*, *SETD2*, *LATS2*, and the *TERT* promoter, among others). Molecular classification in epithelioid and sarcomatoid groups were suggested and *BAP1* alterations were preferentially found in the epithelioid group, while alterations in *tp53* and *LATS2* were mostly present in the sarcomatoid type [78].

In addition to the very consistent alterations in tumor suppressor genes, rarer genetic alterations were described. For example, activating mutations in the canonical MAPK or PI3K/AKT signaling pathways were reported in two cohorts [79,80], but were not identified in the TCGA cohort [76]. A recurrent novel amplification of *RASSF7* was observed in a series of 121 patients, and together with alterations in other genes from the Hippo pathway (*NF2*, *LATS1* and *LATS2*), suggest a significant contribution of this pathway to the tumorigenic processes [81].

Data on malignant peritoneal MM are fewer than for MPM. Both pleural and peritoneal MM exhibits deletions or losses in *CDKN2A*, *NF2* and *BAP1* and recurrent mutations in *SETD2* and *DDX3X* [82]. However, the prevalence of the homozygous deletion of *CDKN2A* and hemizygote loss of *NF2* in peritoneal MM is lower than those reported in pleural MM [83]. Regions of copy number gain were more common in peritoneal MM, whereas losses were more common in pleural MM [84]. More recently Anaplastic lymphoma kinase (ALK) expression was detected by IHC in a fraction of peritoneal MM, with *ALK* rearrangements identified with novel fusion partners *ATG16L1*, *STRN*, and *TPM1* [85], opening a new treatment perspective for MM [86].

#### 4.2 *BAP1*

Although the risk for developing mesothelioma is much higher among workers in the asbestos industry [87], not all exposed workers develop the disease. This led to a search for genetic factors predisposing to mesothelioma, particularly in families with several affected individuals [88]. Thus, the *BAP1* gene was identified, whose germline mutations are currently linked to a syndrome of high incidence of malignant mesothelioma. The syndrome also predisposes to other rare tumors, such as familial melanoma, uveal melanoma, cholangiocarcinoma and clear cell renal carcinoma [60,89].

Despite the high relevance of germline mutations in the *BAP1* gene to the increased risk of developing hereditary mesothelioma and other tumors of the syndrome, a significant portion of families with multiple cases of mesothelioma do not have mutations in this gene, suggesting that other genes may have a role in the predisposition to these tumors [90,91]. In this sense, a recent study evaluated 94 hereditary cancer predisposition genes in 93 mesothelioma patients and detected probably pathogenic mutations in 10% of cases, with an enrichment of mutations in genes of the homologous recombination pathway. Interestingly, patients with mutations in these genes had a lower rate of exposure to asbestos than patients without mutations, indicating that even a low rate of exposure was sufficient to induce tumorigenesis [91].

*BAP1* is an enzyme of the c-terminal hydrolases family with pleiotropic activities, found in DNA repair complexes associated with *BRCA1* and acting as a de-ubiquitinase [92–94] *BAP1* expression is associated with reduced tumor growth in several experimental models and it interacts with regulatory proteins of the cell cycle [92]. In addition, *BAP1* forms several nuclear complexes capable of regulating gene transcription. Thus, it is expected that *BAP1* influences a wide range of cellular functions, such as chromatin remodeling, cell cycle progression, cell differentiation and DNA repair. It is known that the *BAP-1* protein also plays an important role as apoptosis inhibitor caused by metabolic stress [95].

Approximately 60% of malignant mesotheliomas were described to have deletions or mutations in *BAP1* [59,61,68,76,79,96,97] with nearly 85% of peritoneal tumors harboring *BAP1* alterations versus only 20-30% of pleural tumors [82]. *BAP1* is also recurrently inactivated in clear cell renal carcinoma, uveal melanoma, and cholangiocarcinoma [98]. Most of the mutations in *BAP1* are frameshift or missense, which leads to loss of protein expression [59,61,68]. Accordingly, the loss of expression of *BAP1* protein can be identified by immunostaining of the tumor tissue, observed in approximately 60% of cases [97].

### *4.3 Gene expression profile*

Genetic alterations leading to phenotypic disfunctions will generate altered gene expression profiles whose knowledge may improve our understanding of molecular pathways relevant for the disease. Early work using gene expression patterns in MM suggested the existence of two relevant molecular subtypes that associated with histological classification: epithelioid and sarcomatoid [99–101]. Interestingly, genes associated with epithelioid-mesenchymal transition (EMT) were enriched in the sarcomatoid group, indicating a more mesenchymal phenotype [101]. Further work suggested that 4 subtypes could be separated associated with the spectrum from epithelioid to sarcomatoid histology and further confirming differential expression of EMT genes [61,76]. This was also confirmed by a reanalysis of the data demonstrating that the molecular groups represent a continuum, or histo-molecular gradient, where tumors could be decomposed in a combination of epithelioid-like (E-score) and sarcomatoid-like (S-score) signatures whose proportions are associated with the prognosis [102]

## 5. MPM treatment

Established prognostic indicators, such as the histological subtype, age and sex, may provide some information on predicting patient survival, however, there are few definitive and specific prognostic indicators routinely used to predict likely outcomes in individual patients. The European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) proposes that poor performance status, leukocytosis, sarcomatoid type and male gender are associated with worse prognosis [103]. Meanwhile, the CALGB score includes age > 75 years, non-epithelioid histology, LDH > 500 UI/L, pleural involvement, platelets > 400,000/mm<sup>3</sup>, chest pain and poor PS as deleterious prognostic factors [104]. Other prognostic indices also include weight loss, hemoglobin and serum albumin levels [105] and WBC [106].

In addition to its involvement in the pathogenesis, systemic inflammation associate with overall survival and response to treatment. Prognostic factors based on the inflammatory response, which include the combination of serum C-reactive protein and albumin, a combination of neutrophil and lymphocyte count (for example, the neutrophil-lymphocyte ratio, NLR) and a combination of platelet and lymphocytes count are associated with survival in patients with various types of cancer, including MPM [34].

### 5.1 *Surgery*

Regarding the treatment of MPM, in the context of resectable disease, it is based on trimodal therapy: surgery, chemotherapy (neoadjuvant and/or adjuvant) and radiation therapy (in high doses in the ipsilateral hemithorax), especially in patients without lymph node involvement [107].

The prognosis remains reserved since the majority of patients present unresectable disease at diagnosis or are considered inoperable due to age, performance status or comorbidities. Importantly, patients eligible for surgery should be submitted to EBUS (endobronchial ultrasonography) or mediastinoscopy, since mediastinal lymph node dissemination is a dismal prognostic factor in MPM [11].

For resectable tumors, the three most used surgical procedures in the treatment of mesothelioma are: thoracoscopy with pleurodesis, pleurectomy/decortication and extrapleural pneumonectomy [38].

Pleurectomy/decortication is the therapeutic surgical option aimed at reducing the tumor burden. This procedure is performed through an open thoracotomy and consists of the removal of the parietal pleura, including the portion on the mediastinum, the pericardium and the diaphragm (often requiring the removal of part of the diaphragm) and removal of the visceral pleura to decorticate the lung. This treatment provides palliation of local symptoms and prevents recurrence of pleural effusion, but there is usually a high rate of locoregional (80% to 90%) or distance recurrence (10 to 36%), and is not considered a procedure with curative potential [38].

Extrapleural pneumonectomy (EPP) is considered a more aggressive technique because it involves the “en bloc” removal of tissues in the hemithorax, including visceral and parietal pleura, affected lung, mediastinal lymph nodes, diaphragm and pericardium. It is not usually considered for patients with limiting comorbidities, low performance status, involvement of mediastinal lymph nodes or sarcomatoid histology due to its morbidity and mortality and the more reserved prognosis in these patients [108].

Pleurodesis is a procedure to relieve the accumulation of fluid in the pleural space. It involves draining the fluid by thoracoscopy under general anesthesia or sedation, or by inserting a thoracic tube by thoracostomy. After removing the fluid, sclerosing chemicals are introduced into the pleural cavity to prevent the fluid from accumulating again [109].

The comparison between extrapleural pneumonectomy or pleurectomy/decortication in 663 patients was evaluated and significant differences in survival were observed, with a 1.4x higher risk of death for extrapleural pneumonectomy ( $p=0.001$ ), controlling for stage, histology, gender and multimodal therapy [110]. In another randomized controlled study, patients received platinum-based neoadjuvant chemotherapy were randomly assigned to perform extrapleural pneumonectomy or not. No survival or quality of life advantage was observed between groups [111].

### *5.3 Radiotherapy*

The main current indications for radiotherapy in MPM are: hemithorax radiotherapy performed before or after extrapleural pneumonectomy; prophylactic radiotherapy administered to the surgical tract; hemithorax radiotherapy performed after decortication/pleurectomy, and palliative radiotherapy to relieve local symptoms [112].

Radical hemithoracic radiotherapy (RHR) can be performed after extrapleural pneumonectomy in the intent to increase local control, despite that, it is associated with

failure rates in the irradiated field ranging from 15% to 35% [113]. Several treatment guidelines recommend RHR, such as the NCCN (National Comprehensive Cancer Center), although there is still some debate around this topic.

The SAKK 17/04 study [114], a phase II prospective study, assessed the role of adjuvant RHR after platin-based neoadjuvant chemotherapy followed by extrapleural pneumonectomy. Patients were randomized to radiotherapy vs observation. There was no significant difference between the groups. More recently, a phase III trial compared RHR versus palliative radiotherapy after non-radical lung sparing and chemotherapy and demonstrated improved OS in the arm treated with RHR (2-year OS 58% x 28%; HR 0.58, 95CI 0.31-0.95, p=0.031), at the expense of more grade 3/4 acute toxicity [115].

The rationale supporting the use of neoadjuvant hemithoracic radiotherapy prior to extrapleural pneumectomy came from the observation that there was frequent spread of the tumor to the contralateral lung and to the peritoneum, which could be related to the surgical procedure. The SMART (Surgery for Mesothelioma After Radiation Therapy) strategy [116] was developed in order to achieve lower rates of dissemination related to the surgical procedure. The authors observed a median overall survival of 51 months and a median disease-free survival of 47 months for epithelioid pleural mesothelioma which suggested there might be some benefit of this strategy in this group of patients.

After the release of controversial data from the MARS-1 study, the use of extrapleural pneumectomy has declined in recent years in favor of lung preservation techniques such as pleurectomy and lung decortication. The IMPRINT study, a prospective phase II study, demonstrated the safety of performing intensity modulated radiotherapy to the hemithorax concurrently with chemotherapy in patients who had undergone pleurectomy and lung decortication [117].

In the palliative context, radiotherapy can be used to control a series of symptoms in which drug treatment is sometimes insufficient, such as chest pain related to chest wall invasion, hemoptysis, cough or dyspnea as well as prevention of spinal cord compression [118].

### 5.3 *Systemic treatment*

Systemic chemotherapy is the treatment of choice in the context of unresectable disease as well as for those patients considered ineligible or who wish non-surgical treatment[9]. In the first-line chemotherapy, regimens containing platinum, have higher response rates when compared to schemes without platinum [119]. Pemetrexed-based

regimens are currently the first-line systemic chemotherapy option in most institutions, although there is no consensus on which complementary agent or agents should be used to supplement pemetrexed [9]. The substitution of cisplatin for carboplatin showed ORR around 25-29%, but with a better toxicity profile and similar OS [120].

The addition of bevacizumab to cisplatin and pemetrexed in first line showed improved OS (18.8 months vs 16.1 months) and progression-free survival (PFS) (9.2 months vs 7.3 months) in a recent phase III study (MAPS) when compared with cisplatin and pemetrexed [121]. However, the use of anti-angiogenic drugs in combination with chemotherapy is not widely accepted due to the fact that other trials testing angiokinase inhibitors like cediranib and nintedanib (LUME-Meso trial) were not effective [5,122,123]. In spite of that, ramucirumab, an anti-VEGFR-2 antibody, was combined with gemcitabine and compared with gemcitabine as single agent in second line for MPM not previously exposed to anti-angiogenic drugs in a randomized phase II trial (RAMES trial). The combination doubled the median OS (7.5 x 13.8 months) and the median PFS (3.3 x 6.2 months), although no difference in ORR have been observed [124].

The use of immune checkpoint inhibitors has revolutionized the treatment of several types of tumors in recent years [23]. Immunotherapy is a treatment modality that directs the patient's immune system to eliminate tumor cells. Examples of immunotherapeutic approaches under investigation include inhibitors of T cell immune checkpoints or agonists of T cell activation pathways, the use of cytokines such as IL-12 and IL-15, therapeutic vaccines, elimination of immunosuppressive cells and modulation of other components of the immune response [125].

The CTLA4 is a T cell receptor that plays a key role in preventing T cell hyperactivation [126]. CTLA4 signaling decreases T cell activation and the ability of memory T cells to support an immune response [127]. Greater inhibition of tumor growth was observed when anti-CTLA4 monoclonal antibody was administered between cycles of cisplatin in mesothelioma murine models [128]. In addition, CTLA4 blockade alternated with cisplatin treatment inhibited tumor cell proliferation, while the number of T lymphocytes infiltrating the tumor increased. Despite these findings, DETERMINE, a multicenter, randomized, placebo-controlled phase IIB study, failed to demonstrate any improvement in OS with the use of tremelimumab (an anti-CTLA4 antibody), when compared to a placebo, in patients with mesothelioma in the second and third-lines of treatment [129].



PD1 is also an immune checkpoint and has two ligands: PD-L1 and PD-L2. Overexpression of the PD1 receptor plays a key role in the exhaustion of T cells and is an important factor during the normal immune response to prevent the occurrence of autoimmunity [130]. PD-L1 is highly expressed in MPM [131]. Positive PD-L1 expression was reported in 40% of 106 mesothelioma samples, 21% in the epithelioid subtype, 94% in the sarcomatoid subtype and 57% in the biphasic subtype [132]. Some studies reported worse survival rates in cases of MM with tumor PD-L1 expression [133,134], while others reported no significant difference in survival between cases of MM with and without PD-L1 expression [135].

Various phase II studies evaluated the activity of anti-PD1 antibodies as second line therapy for pleural mesothelioma and reported ORR ranging from 9,4% to 29% and median PFS from 2.6 to 6.2 months (Table 3). Recently, though, a phase III study, PROMISE-meso, included 144 patients and randomized them to receive pembrolizumab or chemotherapy (gemcitabine or vinorelbine) and showed no significant difference in PFS (primary endpoint) or OS, but there was an increase in the response rate in patients treated with pembrolizumab when compared to chemotherapy (22% x 6%). No association with PD-L1 expression was observed [136].

A French multicenter, randomized, phase II, study (MAPS-2) compared the use of nivolumab (anti-PD-1) versus nivolumab in combination with ipilimumab (anti-CTLA4) in patients who failed first and/or second line therapy. The 12-week disease control rate was 44% in the nivolumab group and 50% in the combination group. High expression of PD-L1 was associated with a higher response rate [5]. Other single arm, phase II trials, showed similar results in second line (Table 2).

In the wake of these promising results, the study CheckMate 743, a randomized phase III trial, compared the combination of ipilimumab and nivolumab (IO+IO) with cisplatin/carboplatin plus pemetrexed as first line treatment for unresectable MPM. The study showed longer OS in the group of patients treated with IO+IO (18.1 x 14.1 meses; HR 0.74 95%CI 0.6-0.91; p=0.002). OS at 2 years was 41% and 27%, respectively, for IO and chemotherapy. Both histologies benefited of treatment with IO+IO, albeit the relative improvement among patients with non-epithelioid tumors have been larger benefit. This established the combination of ipilimumab and nivolumab as the new standard treatment in first line for metastatic or unresectable MPM.

More recently, two single-arm phase 2 studies investigated the role of durvalumab associated with standard chemotherapy based on platinum and pemetrexed in the first-

line treatment for MPM. The first study (PrECOG 0505) demonstrated a median OS of 20.4 months [137]. The OS at 12 months was 70.4% and at 24 months, 44.2%. The second study (DREAM) showed a median OS of 18.4 months, median PFS of 6.7 months and an ORR of 48% [138]. In view of the promising data presented, a phase III study will start recruiting shortly.

This serious disease still represents an unmet medical need and lacks prospective and randomized studies to better understand its pathophysiology as well as to provide more effective treatments to patients. There are several ongoing clinical trials for MPM and the future probable will bring new hope for these patients (Table 3).

#### Acknowledgements

This work was supported by the National Institute of Translational Oncology and Innovation (INCITO-INOTE). CAPES fellowships to CHC and GV are gratefully acknowledged.

## 1. References

- [1] A. Marinaccio, A. Binazzi, D. Di Marzio, A. Scarselli, M. Verardo, D. Mirabelli, V. Gennaro, C. Mensi, L. Riboldi, E. Merler, R. De Zotti, A. Romanelli, E. Chellini, S. Silvestri, C. Pascucci, E. Romeo, S. Menegozzo, M. Musti, D. Cavone, G. Cauzillo, R. Tumino, C. Nicita, M. Melis, S. Iavicoli, Pleural malignant mesothelioma epidemic: Incidence, modalities of asbestos exposure and occupations involved from the Italian National Register, *Int. J. Cancer*. 130 (2012) 2146–2154. <https://doi.org/10.1002/ijc.26229>.
- [2] S.C. Grondin, D.J. Sugarbaker, Malignant mesothelioma of the pleural space., *Oncology (Williston Park)*. 13 (1999) 919–26; discussion 926, 931–2.
- [3] V. Delgermaa, K. Takahashi, E.K. Park, G.V. Le, T. Hara, T. Sorahan, Les décès mondiaux par mésothéliome rapportés à l'Organisation mondiale de la Santé entre 1994 et 2008, *Bull. World Health Organ.* 89 (2011) 716–724. <https://doi.org/10.2471/BLT.11.086678>.
- [4] A. Bridda, I. Padoan, R. Mencarelli, M. Frego, Peritoneal mesothelioma: a review., *MedGenMed*. 9 (2007) 32.
- [5] A. Scherpereel, F. Wallyn, S.M. Albelda, C. Munck, Novel therapies for malignant

- pleural mesothelioma, *Lancet Oncol.* 19 (2018) e161–e172. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30100-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30100-1).
- [6] S. Jane Henley, T.C. Larson, M. Wu, V.C.S. Antao, M. Lewis, G.A. Pinheiro, C. Ehemann, Mesothelioma incidence in 50 states and the District of Columbia, United States, 2003– 2008, *Int. J. Occup. Environ. Health.* 19 (2013) 1–10. <https://doi.org/10.1179/2049396712Y.0000000016>.
- [7] A.S. Tsao, I. Wistuba, J.A. Roth, H.L. Kindler, Malignant pleural mesothelioma., *J. Clin. Oncol.* 27 (2009) 2081–90. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.8523>.
- [8] J. Ai, J.P. Stevenson, Current Issues in Malignant Pleural Mesothelioma Evaluation and Management, *Oncologist.* 19 (2014) 975–984. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2014-0122>.
- [9] J. Kim, S. Bhagwandin, D.M. Labow, Malignant peritoneal mesothelioma: A review, AME Publishing Company, 2017. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.03.96>.
- [10] B. Price, A. Ware, Special Article, *J. Am. Med. Assoc.* 131 (1946) 1053. <https://doi.org/10.1001/jama.1946.02870300021006>.
- [11] M. Carbone, P.S. Adusumilli, H.R. Alexander, P. Baas, F. Bardelli, A. Bononi, R. Bueno, E. Felley-Bosco, F. Galateau-Salle, D. Jablons, A.S. Mansfield, M. Minaai, M. Perrot, P. Pesavento, V. Rusch, D.T. Severson, E. Taioli, A. Tsao, G. Woodard, H. Yang, M.G. Zauderer, H.I. Pass, Mesothelioma: Scientific clues for prevention, diagnosis, and therapy, *CA. Cancer J. Clin.* 69 (2019) 402–429. <https://doi.org/10.3322/caac.21572>.
- [12] V. Panou, M. Gadiraju, A. Wolin, C.M. Weipert, E. Skarda, A.N. Husain, J.D. Patel, B. Rose, S.R. Zhang, M. Weatherly, V. Nelakuditi, A.K. Johnson, M. Helgeson, D. Fischer, A. Desai, N. Sulai, L. Ritterhouse, O.D. Røe, K.K. Turaga, D. Huo, J. Segal, S. Kadri, Z. Li, H.L. Kindler, J.E. Churpek, Frequency of germline mutations in cancer susceptibility genes in malignant mesothelioma, *J. Clin. Oncol.* 36 (2018) 2863–2871. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.78.5204>.
- [13] S. Pastorino, Y. Yoshikawa, H.I. Pass, M. Emi, M. Nasu, I. Pagano, Y. Takinishi, R. Yamamoto, M. Minaai, T. Hashimoto-Tamaoki, M. Ohmuraya, K. Goto, C. Goparaju, K.Y. Sarin, M. Tanji, A. Bononi, A. Napolitano, G. Gaudino, M. Hesdorffer, H. Yang, M. Carbone, A subset of mesotheliomas with improved survival occurring in carriers of BAP1 and other germline mutations, *J. Clin. Oncol.* 36 (2018) 3485–3494. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.79.0352>.

- [14] H. Yang, J.R. Testa, M. Carbone, Mesothelioma epidemiology, carcinogenesis, and pathogenesis., *Curr. Treat. Options Oncol.* 9 (2008) 147–57. <https://doi.org/10.1007/s11864-008-0067-z>.
- [15] V.L. CAPELOZZI, Asbesto, asbestose e câncer: critérios diagnósticos, *J. Pneumol.* 27 (2001) 206–218. <https://doi.org/10.1590/s0102-35862001000400007>.
- [16] M. Carbone, R.A. Kratzke, J.R. Testa, The pathogenesis of mesothelioma, *Semin. Oncol.* 29 (2002) 2–17. <https://doi.org/10.1053/sonc.2002.30227>.
- [17] P.A. Zucali, G.L. Ceresoli, F. De Vincenzo, M. Simonelli, E. Lorenzi, L. Gianoncelli, A. Santoro, Advances in the biology of malignant pleural mesothelioma, *Cancer Treat. Rev.* 37 (2011) 543–558. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.01.001>.
- [18] K.E. Driscoll, J.K. Maurer, J. Higgins, J. Poynter, Alveolar macrophage cytokine and growth factor production in a rat model of crocidolite-induced pulmonary inflammation and fibrosis., *J. Toxicol. Environ. Health.* 46 (1995) 155–69. <https://doi.org/10.1080/15287399509532026>.
- [19] E. Marchi, W. Liu, V.C. Broaddus, Mesothelial cell apoptosis is confirmed in vivo by morphological change in cytokeratin distribution., *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278 (2000) L528-35. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.3.L528>.
- [20] L.E. Leard, V.C. Broaddus, Mesothelial cell proliferation and apoptosis., *Respirology.* 9 (2004) 292–9. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2004.00602.x>.
- [21] D.W. Cugell, D.W. Kamp, Asbestos and the pleura: A review, *Chest.* 125 (2004) 1103–1117. <https://doi.org/10.1378/chest.125.3.1103>.
- [22] S.E. Mutsaers, Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair., *Respirology.* 7 (2002) 171–91.
- [23] K. Suzuki, K. Kadota, C.S. Sima, M. Sadelain, V.W. Rusch, W.D. Travis, P.S. Adusumilli, Chronic inflammation in tumor stroma is an independent predictor of prolonged survival in epithelioid malignant pleural mesothelioma patients., *Cancer Immunol. Immunother.* 60 (2011) 1721–8. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1073-8>.
- [24] M.E. Ramos-Nino, J.R. Testa, D.A. Altomare, H.I. Pass, M. Carbone, M. Bocchetta, B.T. Mossman, Cellular and molecular parameters of mesothelioma., *J. Cell. Biochem.* 98 (2006) 723–34. <https://doi.org/10.1002/jcb.20828>.

- [25] N.W. Lukacs, C. Hogaboam, S.W. Chensue, K. Blease, S.L. Kunkel, Type 1/type 2 cytokine paradigm and the progression of pulmonary fibrosis., *Chest*. 120 (2001) 5S-8S.
- [26] C.B. Manning, A.B. Cummins, M.W. Jung, I. Berlinger, C.R. Timblin, C. Palmer, D.J. Taatjes, D. Hemenway, P. Vacek, B.T. Mossman, A mutant epidermal growth factor receptor targeted to lung epithelium inhibits asbestos-induced proliferation and proto-oncogene expression., *Cancer Res*. 62 (2002) 4169–75.
- [27] J.C. Pfau, S. Li, S. Holland, J.J. Sentissi, Alteration of fibroblast phenotype by asbestos-induced autoantibodies., *J. Immunotoxicol*. 8 (2011) 159–69. <https://doi.org/10.3109/1547691X.2011.562257>.
- [28] B.T. Mossman, M. Lippmann, T.W. Hesterberg, K.T. Kelsey, A. Barchowsky, J.C. Bonner, Pulmonary endpoints (lung carcinomas and asbestosis) following inhalation exposure to asbestos., *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev*. 14 (2011) 76–121. <https://doi.org/10.1080/10937404.2011.556047>.
- [29] F. Martinon, V. Pétrilli, A. Mayor, A. Tardivel, J. Tschopp, Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome., *Nature*. 440 (2006) 237–41. <https://doi.org/10.1038/nature04516>.
- [30] C. Dostert, V. Pétrilli, R. Van Bruggen, C. Steele, B.T. Mossman, J. Tschopp, Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica., *Science*. 320 (2008) 674–7. <https://doi.org/10.1126/science.1156995>.
- [31] R. Cornelissen, L.A. Lieverse, A.P. Maat, R.W. Hendriks, H.C. Hoogsteden, A.J. Bogers, J.P. Hegmans, J.G. Aerts, Ratio of Intratumoral Macrophage Phenotypes Is a Prognostic Factor in Epithelioid Malignant Pleural Mesothelioma, *PLoS One*. 9 (2014) e106742. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106742>.
- [32] H. Ujiie, K. Kadota, J.-I. Nitadori, J.G. Aerts, K.M. Woo, C.S. Sima, W.D. Travis, D.R. Jones, L.M. Krug, P.S. Adusumilli, The tumoral and stromal immune microenvironment in malignant pleural mesothelioma: A comprehensive analysis reveals prognostic immune markers., *Oncoimmunology*. 4 (2015) e1009285. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1009285>.
- [33] A. Linton, N. van Zandwijk, G. Reid, S. Clarke, C. Cao, S. Kao, Inflammation in malignant mesothelioma - friend or foe?, *Ann. Cardiothorac. Surg*. 1 (2012) 516–22. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2225-319X.2012.10.02>.
- [34] T. Yamagishi, N. Fujimoto, H. Nishi, Y. Miyamoto, N. Hara, M. Asano, Y. Fuchimoto, S. Wada, K. Kitamura, S. Ozaki, T. Kishimoto, Prognostic significance

- of the lymphocyte-to-monocyte ratio in patients with malignant pleural mesothelioma., *Lung Cancer*. 90 (2015) 111–7. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2015.07.014>.
- [35] H. Yang, M. Bocchetta, B. Kroczyńska, A.G. Elmishad, Y. Chen, Z. Liu, C. Bubici, B.T. Mossman, H.I. Pass, J.R. Testa, G. Franzoso, M. Carbone, TNF- $\alpha$  inhibits asbestos-induced cytotoxicity via a NF- $\kappa$ B-dependent pathway, a possible mechanism for asbestos-induced oncogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 10397–10402. <https://doi.org/10.1073/pnas.0604008103>.
- [36] S.X.L. Huang, M.-C. Jaurand, D.W. Kamp, J. Whysner, T.K. Hei, Role of mutagenicity in asbestos fiber-induced carcinogenicity and other diseases., *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 14 (2011) 179–245. <https://doi.org/10.1080/10937404.2011.556051>.
- [37] H.I. Pass, M. Carbone, Current status of screening for malignant pleural mesothelioma., *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 21 (2009) 97–104. <https://doi.org/10.1053/j.semtevs.2009.06.007>.
- [38] R. Ismail-Khan, L.A. Robinson, C.C. Williams, C.R. Garrett, G. Bepler, G.R. Simon, Malignant pleural mesothelioma: a comprehensive review., *Cancer Control*. 13 (2006) 255–63. <https://doi.org/10.1177/107327480601300402>.
- [39] H. Otsuka, K. Terazawa, N. Morita, Y. Otomi, K. Yamashita, H. Nishitani, Is FDG-PET/CT useful for managing malignant pleural mesothelioma?, *J. Med. Investig.* 56 (2009) 16–20. <https://doi.org/10.2152/jmi.56.16>.
- [40] C. Boutin, F. Rey, Thoracoscopy in pleural malignant mesothelioma: a prospective study of 188 consecutive patients. Part 1: Diagnosis., *Cancer*. 72 (1993) 389–93.
- [41] F. Galateau-Salle, A. Churg, V. Roggli, W.D.D. Travis, World Health Organization Committee for Tumors of the Pleura, The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Pleura: Advances since the 2004 Classification., *J. Thorac. Oncol.* 11 (2016) 142–54. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.11.005>.
- [42] A.G. Nicholson, J.L. Sauter, A.K. Nowak, H.L. Kindler, R.R. Gill, M. Remy-Jardin, S.G. Armato, L. Fernandez-Cuesta, R. Bueno, N. Alcala, M. Foll, H. Pass, R. Attanoos, P. Baas, M.B. Beasley, L. Brcic, K.J. Butnor, L.R. Chirieac, A. Churg, P. Courtiol, S. Dacic, M. De Perrot, T. Frauenfelder, A. Gibbs, F.R. Hirsch, K. Hiroshima, A. Husain, S. Klebe, S. Lantuejoul, A. Moreira, I. Opitz, M. Perol, A. Roden, V. Roggli, A. Scherpereel, F. Tirode, H. Tazelaar, W.D. Travis, M.S. Tsao,

- P. van Schil, J.M. Vignaud, B. Weynand, L. Lang-Lazdunski, I. Cree, V.W. Rusch, N. Girard, F. Galateau-Salle, EURACAN/IASLC Proposals for Updating the Histologic Classification of Pleural Mesothelioma: Towards a More Multidisciplinary Approach, *J. Thorac. Oncol.* 15 (2020) 29–49. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.08.2506>.
- [43] D.W. Henderson, G. Reid, S.C. Kao, N. Van Zandwijk, S. Klebe, Challenges and controversies in the diagnosis of mesothelioma: Part 1. Cytology-only diagnosis, biopsies, immunohistochemistry, discrimination between mesothelioma and reactive mesothelial hyperplasia, and biomarkers, *J. Clin. Pathol.* 66 (2013) 847–853. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2012-201303>.
- [44] F. Galateau Salle, N. Le Stang, A.G. Nicholson, D. Pissaloux, A. Churg, S. Klebe, V.L. Roggli, H.D. Tazelaar, J.M. Vignaud, R. Attanoos, M.B. Beasley, H. Begueret, F. Capron, L. Chirieac, M.C. Copin, S. Dacic, C. Danel, A. Foulet-Roge, A. Gibbs, S. Giusiano-Courcambeck, K. Hiroshima, V. Hofman, A.N. Husain, K. Kerr, A. Marchevsky, K. Nabeshima, J.M. Picquenot, I. Rouquette, C. Sagan, J.L. Sauter, F. Thivolet, W.D. Travis, M.S. Tsao, B. Weynand, F. Damiola, A. Scherpereel, J.C. Pairon, S. Lantuejoul, V. Rusch, N. Girard, New Insights on Diagnostic Reproducibility of Biphasic Mesotheliomas: A Multi-Institutional Evaluation by the International Mesothelioma Panel From the MESOPATH Reference Center, *J. Thorac. Oncol.* 13 (2018) 1189–1203. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2018.04.023>.
- [45] A.N. Husain, T. V. Colby, N.G. Ordóñez, T.C. Allen, R.L. Attanoos, M.B. Beasley, K.J. Butnor, L.R. Chirieac, A.M. Churg, S. Dacic, F. Galateau-Sallé, A. Gibbs, A.M. Gown, T. Krausz, L.A. Litzky, A. Marchevsky, A.G. Nicholson, V.L. Roggli, A.K. Sharma, W.D. Travis, A.E. Walts, M.R. Wick, Guidelines for Pathologic Diagnosis of Malignant Mesothelioma 2017 Update of the Consensus Statement From the International Mesothelioma Interest Group, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 142 (2018) 89–108. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0124-RA>.
- [46] D.W.W. Henderson, H.D.D. Attwood, T.J.J. Constance, K.B.B. Shilkin, R.H.H. Steele, Lymphohistiocytoid mesothelioma: a rare lymphomatoid variant of predominantly sarcomatoid mesothelioma., *Ultrastruct. Pathol.* 12 (1988) 367–84. <https://doi.org/10.3109/01913128809064207>.
- [47] M. Zhuo, Q. Zheng, Y. Chi, B. Jia, J. Zhao, W.U. Meina, A.N. Tongtong, Y. Wang, L.I. Jianjie, X. Zhao, X. Yang, J. Zhong, H. Chen, Z. Dong, J. Wang, X. Zhai, Z.

- Wang, Survival analysis via nomogram of surgical patients with malignant pleural mesothelioma in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database, *Thorac. Cancer*. 10 (2019) 1193–1202. <https://doi.org/10.1111/1759-7714.13063>.
- [48] S.A. Saddoughi, Z.M. Abdelsattar, S.H. Blackmon, National Trends in the Epidemiology of Malignant Pleural Mesothelioma: A National Cancer Data Base Study, *Ann. Thorac. Surg.* 105 (2018) 432–437. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2017.09.036>.
- [49] R.R. Meyerhoff, C.-F.J. Yang, P.J. Speicher, B.C. Gulack, M.G. Hartwig, T.A. D’Amico, D.H. Harpole, M.F. Berry, Impact of mesothelioma histologic subtype on outcomes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database., *J. Surg. Res.* 196 (2015) 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2015.01.043>.
- [50] J.Q. Cheng, W.C. Lee, M.A. Klein, G.Z. Cheng, S.C. Jhanwar, J.R. Testa, Frequent mutations of NF2 and allelic loss from chromosome band 22q12 in malignant mesothelioma: Evidence for a two-hit mechanism of NF2 inactivation, *Genes Chromosom. Cancer*. 24 (1999) 238–242. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2264\(199903\)24:3<238::AID-GCC9>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2264(199903)24:3<238::AID-GCC9>3.0.CO;2-M).
- [51] A. De Rienzo, M.A. Archer, B.Y. Yeap, N. Dao, D. Sciaranghella, A.C. Sideris, Y. Zheng, A.G. Holman, Y.E. Wang, P.S. Dal Cin, J.A. Fletcher, R. Rubio, L. Croft, J. Quackenbush, P.E. Sugarbaker, K.J. Munir, J.R. Battilana, C.E. Gustafson, L.R. Chirieac, S.M. Ching, J. Wong, L.C. Tay, S. Rudd, R. Hercus, D.J. Sugarbaker, W.G. Richards, R. Bueno, Gender-Specific Molecular and Clinical Features Underlie Malignant Pleural Mesothelioma., *Cancer Res.* 76 (2016) 319–28. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0751>.
- [52] P.M. Lindholm, K. Salmenkivi, H. Vauhkonen, A.G. Nicholson, S. Anttila, V.L. Kinnula, S. Knuutila, Gene copy number analysis in malignant pleural mesothelioma using oligonucleotide array CGH, *Cytogenet. Genome Res.* 119 (2007) 46–52. <https://doi.org/10.1159/000109618>.
- [53] S. V Ivanov, J. Miller, R. Lucito, C. Tang, A. V Ivanova, J. Pei, M. Carbone, C. Cruz, A. Beck, C. Webb, D. Nonaka, J.R. Testa, H.I. Pass, Genomic events associated with progression of pleural malignant mesothelioma., *Int. J. Cancer*. 124 (2009) 589–99. <https://doi.org/10.1002/ijc.23949>.
- [54] M. Cheung, J. Pei, Y. Pei, S.C. Jhanwar, H.I. Pass, J.R. Testa, S. Program, F. Chase, HHS Public Access, 29 (2010) 1633–1640. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.455.The>.



- [55] S.S. Murthy, J.R. Testa, Asbestos, chromosomal deletions, and tumor suppressor gene alterations in human malignant mesothelioma, *J. Cell. Physiol.* 180 (1999) 150–157. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199908\)180:2<150::AID-JCP2>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199908)180:2<150::AID-JCP2>3.0.CO;2-H).
- [56] J.Q. Cheng, S.C. Jhanwar, W.M. Klein, D.W. Bell, W.C. Lee, D.A. Altomare, T. Nobori, O.I. Olopade, A.J. Buckler, J.R. Testa, p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma., *Cancer Res.* 54 (1994) 5547–51.
- [57] A.B. Bianchi, S.I. Mitsunaga, J.Q. Cheng, W.M. Klein, S.C. Jhanwar, B. Seizinger, N. Kley, A.J.P. Klein-Szanto, J.R. Testa, High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 10854–10858. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.10854>.
- [58] Y. Sekido, H.I. Pass, S. Bader, D.J. Mew, M.F. Christman, A.F. Gazdar, J.D. Minna, Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer., *Cancer Res.* 55 (1995) 1227–31.
- [59] M. Bott, M. Brevet, B.S. Taylor, S. Shimizu, T. Ito, L. Wang, J. Creaney, R.A. Lake, M.F. Zakowski, B. Reva, C. Sander, R. Delsite, S. Powell, Q. Zhou, R. Shen, A. Olshen, V. Rusch, M. Ladanyi, The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma., *Nat. Genet.* 43 (2011) 668–72. <https://doi.org/10.1038/ng.855>.
- [60] J.R. Testa, M. Cheung, J. Pei, J.E. Below, Y. Tan, E. Sementino, N.J. Cox, A.U. Dogan, H.I. Pass, S. Trusa, M. Hesdorffer, M. Nasu, A. Powers, Z. Rivera, S. Comertpay, M. Tanji, G. Gaudino, H. Yang, M. Carbone, Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma, *Nat. Genet.* 43 (2011) 1022–1025. <https://doi.org/10.1038/ng.912>.
- [61] R. Bueno, E.W. Stawiski, L.D. Goldstein, S. Durinck, A. De Rienzo, Z. Modrusan, F. Gnad, T.T. Nguyen, B.S. Jaiswal, L.R. Chirieac, D. Sciaranghella, N. Dao, C.E. Gustafson, K.J. Munir, J.A. Hackney, A. Chaudhuri, R. Gupta, J. Guillory, K. Toy, C. Ha, Y.-J. Chen, J. Stinson, S. Chaudhuri, N. Zhang, T.D. Wu, D.J. Sugarbaker, F.J. de Sauvage, W.G. Richards, S. Seshagiri, Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations, *Nat. Genet.* 48 (2016) 407–416. <https://doi.org/10.1038/ng.3520>.

- [62] S. Xio, D. Li, J. Vijg, D.J. Sugarbaker, J.M. Corson, J.A. Fletcher, Codeletion of p15 and p16 in primary malignant mesothelioma., *Oncogene*. 11 (1995) 511–5.
- [63] C.J. Jennings, B. Murer, A. O’Grady, L.M. Hearn, B.J. Harvey, E.W. Kay, W. Thomas, Differential p16/INK4A cyclin-dependent kinase inhibitor expression correlates with chemotherapy efficacy in a cohort of 88 malignant pleural mesothelioma patients., *Br. J. Cancer*. 113 (2015) 69–75. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.187>.
- [64] F. López-Ríos, S. Chuai, R. Flores, S. Shimizu, T. Ohno, K. Wakahara, P.B. Illei, S. Hussain, L. Krug, M.F. Zakowski, V. Rusch, A.B. Olshen, M. Ladanyi, Global gene expression profiling of pleural mesotheliomas: overexpression of aurora kinases and P16/CDKN2A deletion as prognostic factors and critical evaluation of microarray-based prognostic prediction., *Cancer Res*. 66 (2006) 2970–9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3907>.
- [65] S. Dacic, H. Kothmaier, S. Land, Y. Shuai, I. Halbwedl, P. Morbini, B. Murer, C. Comin, F. Galateau-Salle, F. Demirag, H. Zeren, R. Attanoos, A. Gibbs, P. Cagle, H. Popper, Prognostic significance of p16/cdkn2a loss in pleural malignant mesotheliomas., *Virchows Arch*. 453 (2008) 627–35. <https://doi.org/10.1007/s00428-008-0689-3>.
- [66] W. Li, L. You, J. Cooper, G. Schiavon, A. Pepe-Caprio, L. Zhou, R. Ishii, M. Giovannini, C.O. Hanemann, S.B. Long, H. Erdjument-Bromage, P. Zhou, P. Tempst, F.G. Giancotti, Merlin/NF2 suppresses tumorigenesis by inhibiting the E3 ubiquitin ligase CRL4(DCAF1) in the nucleus., *Cell*. 140 (2010) 477–90. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.029>.
- [67] T. Mizuno, H. Murakami, M. Fujii, F. Ishiguro, I. Tanaka, Y. Kondo, S. Akatsuka, S. Toyokuni, K. Yokoi, H. Osada, Y. Sekido, YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle-promoting genes., *Oncogene*. 31 (2012) 5117–22. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.5>.
- [68] Y. Yoshikawa, M. Emi, T. Hashimoto-Tamaoki, M. Ohmuraya, A. Sato, T. Tsujimura, S. Hasegawa, T. Nakano, M. Nasu, S. Pastorino, A. Szymiczek, A. Bononi, M. Tanji, I. Pagano, G. Gaudino, A. Napolitano, C. Goparaju, H.I. Pass, H. Yang, M. Carbone, High-density array-CGH with targeted NGS unmask multiple noncontiguous minute deletions on chromosome 3p21 in mesothelioma, *Proc. Natl. Acad. Sci*. 113 (2016) 13432–13437.

<https://doi.org/10.1073/pnas.1612074113>.

- [69] L. Urso, F. Calabrese, A. Favaretto, P. Conte, G. Pasello, Critical review about MDM2 in cancer: Possible role in malignant mesothelioma and implications for treatment., *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 97 (2016) 220–30. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.08.019>.
- [70] R.F.H. Walter, F.D. Mairinger, S. Ting, C. Vollbrecht, T. Mairinger, D. Theegarten, D.C. Christoph, K.W. Schmid, J. Wohlschlaeger, MDM2 is an important prognostic and predictive factor for platin-pemetrexed therapy in malignant pleural mesotheliomas and deregulation of P14/ARF (encoded by CDKN2A) seems to contribute to an MDM2-driven inactivation of P53., *Br. J. Cancer.* 112 (2015) 883–90. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.27>.
- [71] C.A. Vaslet, N.J. Messier, A.B. Kane, Accelerated progression of asbestos-induced mesotheliomas in heterozygous p53<sup>+/-</sup> mice., *Toxicol. Sci.* 68 (2002) 331–8.
- [72] D.T. Severson, A. De Rienzo, R. Bueno, Mesothelioma in the age of “Omics”: Before and after The Cancer Genome Atlas, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 160 (2020) 1078-1083.e2. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2020.02.141>.
- [73] M. Hylebos, G. Van Camp, J.P. Van Meerbeeck, K.O. De Beeck, The genetic landscape of malignant pleural mesothelioma: Results from massively parallel sequencing, *J. Thorac. Oncol.* 11 (2016) 1615–1626. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.05.020>.
- [74] R. Bueno, A. de Rienzo, L. Dong, G.J. Gordon, C.F. Hercus, W.G. Richards, R. V. Jensen, A. Anwar, G. Maulik, L.R. Chirieac, K.F. Ho, B.E. Taillon, C.L. Turcotte, R.G. Hercus, S.R. Gullans, D.J. Sugarbaker, Second generation sequencing of the mesothelioma tumor genome, *PLoS One.* 5 (2010). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010612>.
- [75] G. Guo, J. Chmielecki, C. Goparaju, A. Heguy, I. Dolgalev, M. Carbone, S. Seepo, M. Meyerson, H.I. Pass, Whole-exome sequencing reveals frequent genetic alterations in BAP1, NF2, CDKN2A, and CUL1 in malignant pleural mesothelioma., *Cancer Res.* 75 (2015) 264–9. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1008>.
- [76] J. Hmeljak, F. Sanchez-Vega, K.A. Hoadley, J. Shih, C. Stewart, D. Heiman, P. Tarpey, L. Danilova, E. Drill, E.A. Gibb, R. Bowlby, R. Kanchi, H.U. Osmanbeyoglu, Y. Sekido, J. Takeshita, Y. Newton, K. Graim, M. Gupta, C.M.

Gay, L. Diao, D.L. Gibbs, V. Thorsson, L. Iype, H. Kantheti, D.T. Severson, G. Ravegnini, P. Desmeules, A.A. Jungbluth, W.D. Travis, S. Dacic, L.R. Chiriac, F. Galateau-Sallé, J. Fujimoto, A.N. Husain, H.C. Silveira, V.W. Rusch, R.C. Rintoul, H.I. Pass, H. Kindler, M.G. Zauderer, D.J. Kwiatkowski, R. Bueno, A.S. Tsao, J. Creaney, T. Lichtenberg, K. Leraas, J. Bowen, I. Felau, J.C. Zenklusen, R. Akbani, A.D. Cherniack, L.A. Byers, M.S. Noble, J.A. Fletcher, A.G. Robertson, R. Shen, H. Aburatani, B.W. Robinson, P. Campbell, M. Ladanyi, A. Ally, P. Anur, J. Armenia, J.T. Auman, M. Balasundaram, S. Balu, S.B. Baylin, M. Becich, C. Behrens, R. Beroukhim, C. Bielski, T. Bodenheimer, M.S. Bootwalla, D. Brooks, F.M. Cárcano, R. Carlsen, A.L. Carvalho, D. Cheung, L. Chiriac, J. Cho, E. Chuah, S. Chudamani, C. Cibulskis, L. Cope, D. Crain, E. Curley, A. De Rienzo, T. DeFreitas, J.A. Demchok, N. Dhalla, R. Dhir, M. Feldman, M.L. Ferguson, S. Fukuda, S.B. Gabriel, F.G. Sallé, J. Gao, J. Gardner, J.M. Gastier-Foster, N. Gehlenborg, M. Gerken, G. Getz, C. Goparaju, B. Gross, G. Guo, S. Hasegawa, D. Haussler, D.N. Hayes, D.I. Heiman, Z. Heins, R.A. Holt, A.P. Hoyle, A. Husain, C.M. Hutter, S.R. Jefferys, S.J.M. Jones, C.D. Jones, R.S. Kanchi, K. Kasaian, J. Kim, N. Kondo, T. Krausz, R. Kundra, K. Kuribayashi, P.H. Lai, P.W. Laird, M.S. Lawrence, D. Lee, K.M. Leraas, T.M. Lichtenberg, P. Lin, J. Liu, W. Liu, E.M. Liu, L. Lolla, A. Longatto-Filho, Y. Lu, J. Luketich, Y. Ma, D.T. Maglinte, D. Mallory, M.A. Marra, M. Mayo, S. Meier, J. Melamed, S. Meng, M. Meyerson, P.A. Mieczkowski, G.B. Mills, R.A. Moore, C. Moran, S. Morris, L.E. Mose, A.J. Mungall, K. Mungall, T. Nakano, R. Naresh, A. Ochoa, H. Osmanbeyoglu, J.S. Parker, J. Paulauskis, A. Pennathur, N.A. Pennell, R. Penny, C.M. Perou, T. Pihl, N.C. Ramirez, D.M. Rassl, G. Reid, R.M. Reis, S.M. Reynolds, D. Rice, W.G. Richards, J. Roach, V. Rusch, S. Sadeghi, G. Saksena, C. Sander, A. Sato, C. Scapulatempo-Neto, J.E. Schein, N. Schultz, S.E. Schumacher, T. Seiwert, C. Shelton, T. Shelton, R. Sheridan, Y. Shi, Y. Shiraishi, I. Shmulevich, H.C.S. Silveira, J. V. Simons, P. Sipahimalani, T. Skelly, H.J. Sofia, M.G. Soloway, P. Spellman, J. Stuart, Q. Sun, A. Tam, D. Tan, R. Tarnuzzer, K. Tatsuno, B.S. Taylor, N. Thiessen, E. Thompson, A. Tsao, K. Tse, T. Tsujimura, F. Valdivieso, D.J. Van Den Berg, N. van Zandwijk, U. Veluvolu, L.S. Viana, D. Voet, Y. Wan, Z. Wang, J. Wang, J. Weaver, J.N. Weinstein, D.J. Weisenberger, M.D. Wilkerson, L. Wise, I. Wistuba, T. Wong, Y. Wu, S. Yamamoto, L. Yang, J. Zhang, H. Zhang, H. Zhang, E. Zmuda, Integrative

- molecular characterization of malignant pleural mesothelioma, *Cancer Discov.* 8 (2018) 1549–1565. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0804>.
- [77] S. Kato, B.N. Tomson, T.P.H. Buys, S.K. Elkin, J.L. Carter, R. Kurzrock, Genomic landscape of malignant mesotheliomas, *Mol. Cancer Ther.* 15 (2016) 2498–2507. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-16-0229>.
- [78] L. Quetel, C. Meiller, J.B. Assié, Y. Blum, S. Imbeaud, F. Montagne, R. Tranchant, J. de Wolf, S. Caruso, M.C. Copin, V. Hofman, L. Gibault, C. Badoual, E. Pintilie, P. Hofman, I. Monnet, A. Scherpereel, F. Le Pimpec-Barthes, J. Zucman-Rossi, M.C. Jaurand, D. Jean, Genetic alterations of malignant pleural mesothelioma: association with tumor heterogeneity and overall survival, *Mol. Oncol.* 14 (2020) 1207–1223. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12651>.
- [79] M. Lo Iacono, V. Monica, L. Righi, F. Grosso, R. Libener, S. Vatrano, P. Bironzo, S. Novello, L. Musmeci, M. Volante, M. Papotti, G. V Scagliotti, Targeted next-generation sequencing of cancer genes in advanced stage malignant pleural mesothelioma: a retrospective study., *J. Thorac. Oncol.* 10 (2015) 492–9. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000436>.
- [80] T. Shukuya, M. Serizawa, M. Watanabe, H. Akamatsu, M. Abe, H. Imai, T. Tokito, A. Ono, T. Taira, H. Kenmotsu, T. Naito, H. Murakami, T. Takahashi, M. Endo, Y. Ohde, T. Nakajima, N. Yamamoto, Y. Koh, Identification of actionable mutations in malignant pleural mesothelioma, *Lung Cancer.* 86 (2014) 35–40. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.08.004>.
- [81] A. Nastase, A. Mandal, S.K. Lu, H. Anbunathan, D. Morris-Rosendahl, Y.Z. Zhang, X.-M. Sun, S. Gennatas, R. Rintoul, M. Edwards, A. Bowman, T. Chernova, T. Benepal, E. Lim, A. Newman Taylor, A. Nicholson, S. Papat, A. Willis, M. MacFarlane, M. Lathrop, A. Bowcock, M. Moffatt, W.O. Cookson, Multiple therapeutic pathways in malignant mesothelioma identified by genomic mapping, (2020) 1–38. <https://doi.org/10.1101/2020.01.23.20018523>.
- [82] N.M. Joseph, Y.Y. Chen, A. Nasr, I. Yeh, E. Talevich, C. Onodera, B.C. Bastian, J.T. Rabban, K. Garg, C. Zaloudek, D.A. Solomon, Genomic profiling of malignant peritoneal mesothelioma reveals recurrent alterations in epigenetic regulatory genes BAP1, SETD2, and DDX3X, *Mod. Pathol.* 30 (2017) 246–254. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2016.188>.
- [83] A.D. Singhi, A.M. Krasinskas, H.A. Choudry, D.L. Bartlett, J.F. Pingpank, H.J. Zeh, A. Luvison, K. Fuhrer, N. Bahary, R.R. Seethala, S. Dacic, The prognostic

- significance of BAP1, NF2, and CDKN2A in malignant peritoneal mesothelioma, *Mod. Pathol.* 29 (2016) 14–24. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.121>.
- [84] A.C. Borczuk, J. Pei, R.N. Taub, B. Levy, O. Nahum, J. Chen, K. Chen, J.R. Testa, Genome-wide analysis of abdominal and pleural malignant mesothelioma with DNA arrays reveals both common and distinct regions of copy number alteration, *Cancer Biol. Ther.* 17 (2016) 328–335. <https://doi.org/10.1080/15384047.2016.1145850>.
- [85] Y.P. Hung, F. Dong, J.C. Watkins, V. Nardi, R. Bueno, P.D. Cin, J.J. Godleski, C.P. Crum, L.R. Chirieac, Identification of ALK rearrangements in malignant peritoneal mesothelioma, *JAMA Oncol.* 4 (2018) 235–238. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.2918>.
- [86] J.H. Rüschoff, E. Gradhand, A. Kahraman, H. Rees, J.L. Ferguson, A. Curioni-Fontecedro, M. Zoche, H. Moch, B. Vrugt, STRN -ALK Rearranged Malignant Peritoneal Mesothelioma With Dramatic Response Following Ceritinib Treatment, *JCO Precis. Oncol.* 2 (2019) 1–6. <https://doi.org/10.1200/po.19.00048>.
- [87] IARC, Asbestos (Chrysotile, Amosite, Crocidolite, Tremolite, Actinolite and Anthophyllite), IARC Monogr. Eval. Carcinogenic Risks to Humans. (2012) 92.
- [88] M. Carbone, B.H. Ly, R.F. Dodson, I. Pagano, P.T. Morris, U.A. Dogan, A.F. Gazdar, H.I. Pass, H. Yang, Malignant mesothelioma: facts, myths, and hypotheses., *J. Cell. Physiol.* 227 (2012) 44–58. <https://doi.org/10.1002/jcp.22724>.
- [89] T. Wiesner, A.C. Obenaus, R. Murali, I. Fried, K.G. Griewank, P. Ulz, C. Windpassinger, W. Wackernagel, S. Loy, I. Wolf, A. Viale, A.E. Lash, M. Pirun, N.D. Socci, A. Rütten, G. Palmedo, D. Abramson, K. Offit, A. Ott, J.C. Becker, L. Cerroni, H. Kutzner, B.C. Bastian, M.R. Speicher, Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors., *Nat. Genet.* 43 (2011) 1018–21. <https://doi.org/10.1038/ng.910>.
- [90] J.A. Ohar, M. Cheung, J. Talarchek, S.E. Howard, T.D. Howard, M. Hesdorffer, H. Peng, F.J. Rauscher, J.R. Testa, Germline BAP1 Mutational Landscape of Asbestos-Exposed Malignant Mesothelioma Patients with Family History of Cancer, *Cancer Res.* 76 (2016) 206–215. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0295>.
- [91] M. Betti, E. Casalone, D. Ferrante, A. Aspesi, G. Morleo, A. Biasi, M. Sculco, G. Mancuso, S. Guarrera, L. Righi, F. Grosso, R. Libener, M. Pavesi, N. Mariani, C. Casadio, R. Boldorini, D. Mirabelli, B. Pasini, C. Magnani, G. Matullo, I.

- Dianzani, Germline mutations in DNA repair genes predispose asbestos-exposed patients to malignant pleural mesothelioma, *Cancer Lett.* 405 (2017) 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.06.028>.
- [92] M. Carbone, H. Yang, H.I. Pass, T. Krausz, J.R. Testa, G. Gaudino, BAP1 and cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 13 (2013) 153–159. <https://doi.org/10.1038/nrc3459>.
- [93] K.H. Ventii, N.S. Devi, K.L. Friedrich, T.A. Chernova, M. Tighiouart, E.G. Van Meir, K.D. Wilkinson, BRCA1-associated protein-1 is a tumor suppressor that requires deubiquitinating activity and nuclear localization., *Cancer Res.* 68 (2008) 6953–62. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0365>.
- [94] Y. Fang, D. Fu, X.-Z. Shen, The potential role of ubiquitin c-terminal hydrolases in oncogenesis., *Biochim. Biophys. Acta.* 1806 (2010) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2010.03.001>.
- [95] M. Cheung, J.R. Testa, BAP1 , a tumor suppressor gene driving malignant mesothelioma, 6 (2017) 270–278. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2017.05.03>.
- [96] Y. Yoshikawa, A. Sato, T. Tsujimura, M. Emi, T. Morinaga, K. Fukuoka, S. Yamada, A. Murakami, N. Kondo, S. Matsumoto, Y. Okumura, F. Tanaka, S. Hasegawa, T. Nakano, T. Hashimoto-Tamaoki, Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma, *Cancer Sci.* 103 (2012) 868–874. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02223.x>.
- [97] M. Nasu, M. Emi, S. Pastorino, M. Tanji, A. Powers, H. Luk, F. Baumann, Y.A. Zhang, A. Gazdar, S. Kanodia, M. Tiirikainen, E. Flores, G. Gaudino, M.J. Becich, H.I. Pass, H. Yang, M. Carbone, High incidence of somatic BAP1 alterations in sporadic malignant mesothelioma, *J. Thorac. Oncol.* 10 (2015) 565–576. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000471>.
- [98] C. Luchini, N. Veronese, S. Yachida, L. Cheng, A. Nottegar, B. Stubbs, M. Solmi, P. Capelli, A. Pea, M. Barbareschi, M. Fassan, L.D. Wood, A. Scarpa, Different prognostic roles of tumor suppressor gene BAP1 in cancer: A systematic review with meta-analysis., *Genes. Chromosomes Cancer.* 55 (2016) 741–9. <https://doi.org/10.1002/gcc.22381>.
- [99] G.J. Gordon, G.N. Rockwell, R. V Jensen, J.G. Rheinwald, J.N. Glickman, J.P. Aronson, B.J. Pottorf, M.D. Nitz, W.G. Richards, D.J. Sugarbaker, R. Bueno, Identification of Novel Candidate Oncogenes and Tumor Suppressors in Malignant Pleural Mesothelioma Using Large-Scale Transcriptional Profiling, 166 (2005) 1827–1840.

- [100] R.A. Kratzke, Gene Expression Profiling Identifies Matriptase Overexpression in Malignant Mesothelioma \*, *Chest.* 125 (2004) 1843–1852. <https://doi.org/10.1378/chest.125.5.1843>.
- [101] J. Zucman-rossi, D. Jean, Molecular Classification of Malignant Pleural Mesothelioma: Identification of a Poor Prognosis Subgroup Linked to the Epithelial-to-Mesenchymal Transition, (2014) 1323–1335. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2429>.
- [102] Y. Blum, C. Meiller, L. Quetel, N. Elarouci, M. Ayadi, D. Tashtanbaeva, L. Armenoult, F. Montagne, R. Tranchant, A. Renier, L. De Koning, M. Copin, P. Hofman, V. Hofman, H. Porte, F. Le Pimpec-barthes, J. Zucman-rossi, M. Jaurand, Dissecting heterogeneity in malignant pleural mesothelioma through histomolecular gradients for clinical applications, *Nat. Commun.* (2019) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09307-6>.
- [103] D. Curran, T. Sahmoud, P. Therasse, J. van Meerbeeck, P.E. Postmus, G. Giaccone, Prognostic factors in patients with pleural mesothelioma: the European Organization for Research and Treatment of Cancer experience., *J. Clin. Oncol.* 16 (1998) 145–52. <https://doi.org/10.1200/JCO.1998.16.1.145>.
- [104] J.E. Herndon, M.R. Green, A.P. Chahinian, J.M. Corson, Y. Suzuki, N.J. Vogelzang, Factors predictive of survival among 337 patients with mesothelioma treated between 1984 and 1994 by the Cancer and Leukemia Group B, *Chest.* 113 (1998) 723–731. <https://doi.org/10.1378/chest.113.3.723>.
- [105] F.J.H. Brims, T.M. Meniawy, I. Duffus, D. De Fonseca, A. Segal, J. Creaney, N. Maskell, R.A. Lake, N. De Klerk, A.K. Nowak, A novel clinical prediction model for prognosis in malignant pleural mesothelioma using decision tree analysis, *J. Thorac. Oncol.* 11 (2016) 573–582. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2015.12.108>.
- [106] H.I. Pass, D. Giroux, C. Kennedy, E. Ruffini, A.K. Cangir, D. Rice, H. Asamura, D. Waller, J. Edwards, W. Weder, H. Hoffmann, J.P. Van Meerbeeck, V.W. Rusch, Supplementary prognostic variables for pleural mesothelioma: A report from the IASLC staging committee, *J. Thorac. Oncol.* 9 (2014) 856–864. <https://doi.org/10.1097/JTO.000000000000181>.
- [107] M. De Perrot, R. Feld, B.C.J. Cho, A. Bezjak, M. Anraku, R. Burkes, H. Roberts, M.S. Tsao, N. Leighl, S. Keshavjee, M.R. Johnston, Trimodality therapy with induction chemotherapy followed by extrapleural pneumonectomy and adjuvant high-dose hemithoracic radiation for malignant pleural mesothelioma, *J. Clin.*



- Oncol. 27 (2009) 1413–1418. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.17.5604>.
- [108] V.W. Rusch, S. Piantadosi, E.C. Holmes, THORACIC AND The role of extrapleural pneumonectomy in malignant pleural mesothelioma, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 102 (1991) 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0022-5223\(19\)36577-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5223(19)36577-8).
- [109] S. Phs, R. Agarwal, Pleurodesis for malignant pleural effusions ( Review ), *Cochrane Database Syst. Rev.* (2004). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002916.pub2.www.cochranelibrary.com>.
- [110] R.M. Flores, H.I. Pass, V.E. Seshan, J. Dycoco, M. Zakowski, M. Carbone, M.S. Bains, V.W. Rusch, Extrapleural pneumonectomy versus pleurectomy/decortication in the surgical management of malignant pleural mesothelioma: Results in 663 patients, (2008). <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2007.10.054>.
- [111] T. Treasure, L. Lang-lazdunski, D. Waller, J.M.M. Bliss, C. Tan, J. Entwisle, M. Snee, M. O'Brien, G. Thomas, S. Senan, K. O'Byrne, L.S. Kilburn, J. Spicer, D. Landau, J. Edwards, G. Coombes, L. Darlison, J. Peto, MARS trialists, M.O. Brien, G. Thomas, S. Senan, L. Royal, Extra-pleural pneumonectomy versus no extra-pleural pneumonectomy for patients with malignant pleural mesothelioma: clinical outcomes of the Mesothelioma and Radical Surgery (MARS) randomised feasibility study., *Lancet. Oncol.* 12 (2011) 763–72. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70149-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70149-8).
- [112] D.R. Gomez, A. Rimner, C.B. Simone, B.C.J. Cho, M. de Perrot, A.A. Adjei, R. Bueno, R.R. Gill, D.H. Harpole, M. Hesdorffer, F.R. Hirsch, A.A. Jackson, H.I. Pass, D.C. Rice, V.W. Rusch, A.S. Tsao, E. Yorke, K. Rosenzweig, The Use of Radiation Therapy for the Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma: Expert Opinion from the National Cancer Institute Thoracic Malignancy Steering Committee, *International Association for the Study of Lung Cancer, and Mesothelioma Applied Re, J. Thorac. Oncol.* 14 (2019) 1172–1183. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2019.03.030>.
- [113] C. Thieke, N.H. Nicolay, F. Sterzing, H. Hoffmann, F. Roeder, S. Safi, J. Debus, P.E. Huber, Long-term results in malignant pleural mesothelioma treated with neoadjuvant chemotherapy, extrapleural pneumonectomy and intensity-modulated radiotherapy, *Radiat. Oncol.* 10 (2015) 267. <https://doi.org/10.1186/s13014-015-0575-5>.
- [114] R.A. Stahel, O. Riesterer, A. Xyrafas, I. Opitz, M. Beyeler, A. Ochsenein, M.

- Früh, R. Cathomas, K. Nackaerts, S. Peters, C. Mamot, A. Zippelius, C. Mordasini, C.B. Caspar, K. Eckhardt, R.A. Schmid, D.M. Aegersold, O. Gautschi, W. Nagel, M. Töpfer, J. Krayenbuehl, K. Ribi, Ilja F. Ciernik, W. Weder, Neoadjuvant chemotherapy and extrapleural pneumonectomy of malignant pleural mesothelioma with or without hemithoracic radiotherapy (SAKK 17/04): a randomised, international, multicentre phase 2 trial, *Lancet Oncol.* 16 (2015) 1651–1658. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00208-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00208-9).
- [115] M. Trovo, A. Revelant, J.P. Scd, E. Muraro, L. Barresi, A. Drigo, T. Baresic, A. Bearz, G. Fanetti, A. Del Conte, F. Matrone, C. Reverberi, C. Furlan, U. Zuccon, P. Fontana, G. Franchin, E. Minatel, Radical Hemithoracic Radiotherapy vs. Palliative Radiotherapy in Non-metastatic Malignant Pleural Mesothelioma: Results from a Phase III, Randomized Clinical Trial, *Int. J. Radiat. Oncol.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2020.11.057>.
- [116] M. de Perrot, R. Feld, N.B. Leighl, A. Hope, T.K. Waddell, S. Keshavjee, B.C.J. Cho, Accelerated hemithoracic radiation followed by extrapleural pneumonectomy for malignant pleural mesothelioma, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 151 (2016) 468–475. <https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2015.09.129>.
- [117] A. Rimner, M.G. Zauderer, D.R. Gomez, P.S. Adusumilli, P.K. Parhar, A.J. Wu, K.M. Woo, R. Shen, M.S. Ginsberg, E.D. Yorke, D.C. Rice, A.S. Tsao, K.E. Rosenzweig, V.W. Rusch, L.M. Krug, Phase II Study of Hemithoracic Intensity-Modulated Pleural Radiation Therapy (IMPRINT) As Part of Lung-Sparing Multimodality Therapy in Patients With Malignant Pleural Mesothelioma, *J. Clin. Oncol.* 34 (2016) 2761–2768. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.2675>.
- [118] C.B. Simone, II, MD, N. Vapiwala, MD, M.K. Hampshire, BSN, J.M. Metz, MD, Palliative care in the management of lung cancer: Analgesic utilization and barriers to optimal pain management, *J. Opioid Manag.* 8 (2012) 9–16. <https://doi.org/10.5055/jom.2012.0091>.
- [119] P. Ellis, A.M. Davies, W.K. Evans, A.E. Haynes, N.S. Lloyd, The Use of Chemotherapy in Patients with Advanced Malignant Pleural Mesothelioma: A Systematic Review and Practice Guideline, *J. Thorac. Oncol.* 1 (2006) 591–601. [https://doi.org/10.1016/s1556-0864\(15\)30366-x](https://doi.org/10.1016/s1556-0864(15)30366-x).
- [120] N.P. Campbell, H.L. Kindler, Update on malignant pleural mesothelioma., *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 32 (2011) 102–10. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1272874>.

- [121] G. Zalcman, J. Mazieres, J. Margery, L. Greillier, C. Audigier-Valette, D. Moro-Sibilot, O. Molinier, R. Corre, I. Monnet, V. Gounant, F. Rivière, H. Janicot, R. Gervais, C. Locher, B. Milleron, Q. Tran, M.-P. Lebitasy, F. Morin, C. Creveuil, J.-J. Parienti, A. Scherpereel, French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT), Bevacizumab for newly diagnosed pleural mesothelioma in the Mesothelioma Avastin Cisplatin Pemetrexed Study (MAPS): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial., *Lancet* (London, England). 387 (2016) 1405–1414. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)01238-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)01238-6).
- [122] A.S. Tsao, J. Miao, I.I. Wistuba, N.J. Vogelzang, J. V. Heymach, F. V. Fossella, C. Lu, M.R. Velasco, B. Box-Noriega, J.G. Hueftle, S. Gadgeel, M.W. Redman, D.R. Gandara, K. Kelly, Phase II trial of cediranib in combination with cisplatin and pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with unresectable malignant pleural mesothelioma (SWOG S0905), *J. Clin. Oncol.* 37 (2019) 2537–2547. <https://doi.org/10.1200/JCO.19.00269>.
- [123] G. V. Scagliotti, R. Gaafar, A.K. Nowak, T. Nakano, J. van Meerbeeck, S. Papat, N.J. Vogelzang, F. Grosso, R. Aboelhasan, M. Jakopovic, G.L. Ceresoli, P. Taylor, F. Orlandi, D.A. Fennell, S. Novello, A. Scherpereel, K. Kuribayashi, S. Cedres, J.B. Sørensen, N. Pavlakis, M. Reck, D. Velema, U. von Wangenheim, M. Kim, J. Barrueco, A.S. Tsao, Nintedanib in combination with pemetrexed and cisplatin for chemotherapy-naïve patients with advanced malignant pleural mesothelioma (LUME-Meso): a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 trial, *Lancet Respir. Med.* 7 (2019) 569–580. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30139-0](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30139-0).
- [124] M. Pagano, G.L. Ceresoli, P.A. Zucali, G. Pasello, M.C. Garassino, F. Grosso, M. Tiseo, H.J. Soto Parra, F. Zanelli, F. Cappuzzo, F. Grossi, F. de Marinis, P. Pedrazzoli, R. Gnoni, C. Bonelli, A. Berselli, L. Boni, N. Normanno, C. Pinto, Randomized phase II study on gemcitabine with or without ramucirumab as second-line treatment for advanced malignant pleural mesothelioma (MPM): Results of Italian Rames Study., *J. Clin. Oncol.* 38 (2020) 9004–9004. [https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15\\_suppl.9004](https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.9004).
- [125] R. Hassan, E.W. Alley, H.L. Kindler, S.J. Antonia, T.M. Jahan, M. Jacobs-Small, J. Hull, K. McDougall, E. Lemmens, A. Murphy, J.J. Grous, T. Dubensky, D.G. Brockstedt, Antimesothelin vaccine CRS-207 plus chemotherapy as front-line treatment for malignant pleural mesothelioma (MPM)., *J. Clin. Oncol.* 32 (2014)

7532–7532. [https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15\\_suppl.7532](https://doi.org/10.1200/jco.2014.32.15_suppl.7532).

- [126] A.N. Husain, T. Colby, N. Ordonez, T. Krausz, R. Attanoos, M.B. Beasley, A.C. Borczuk, K. Butnor, P.T. Cagle, L.R. Chirieac, A. Churg, S. Dacic, A. Fraire, F. Galateau-Salle, A. Gibbs, A. Gown, S. Hammar, L. Litzky, A.M. Marchevsky, A.G. Nicholson, V. Roggli, W.D. Travis, M. Wick, International Mesothelioma Interest Group, Guidelines for pathologic diagnosis of malignant mesothelioma: 2012 update of the consensus statement from the International Mesothelioma Interest Group., *Arch. Pathol. Lab. Med.* 137 (2013) 647–67. <https://doi.org/10.5858/arpa.2012-0214-OA>.
- [127] C.A. Chambers, T.J. Sullivan, T. Truong, J.P. Allison, Secondary but not primary T cell responses are enhanced in CTLA-4-deficient CD8+ T cells., *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 3137–43. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199810\)28:10<3137::AID-IMMU3137>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199810)28:10<3137::AID-IMMU3137>3.0.CO;2-X).
- [128] M.A. Bonelli, C. Fumarola, S. La Monica, R. Alfieri, New therapeutic strategies for malignant pleural mesothelioma., *Biochem. Pharmacol.* 123 (2017) 8–18. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.07.012>.
- [129] M. Maio, A. Scherpereel, L. Calabrò, J. Aerts, S.C. Perez, A. Bearz, K. Nackaerts, D.A. Fennell, D. Kowalski, A.S. Tsao, P. Taylor, F. Grosso, S.J. Antonia, A.K. Nowak, M. Taboada, M. Puglisi, P.K. Stockman, H.L. Kindler, Tremelimumab as second-line or third-line treatment in relapsed malignant mesothelioma (DETERMINE): a multicentre, international, randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2b trial, *Lancet Oncol.* 18 (2017) 1261–1273. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30446-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30446-1).
- [130] H. Nishimura, T. Honjo, PD-1: an inhibitory immunoreceptor involved in peripheral tolerance., *Trends Immunol.* 22 (2001) 265–8. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(01\)01888-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(01)01888-9).
- [131] G.J. Freeman, A.J. Long, Y. Iwai, K. Bourque, T. Chernova, H. Nishimura, L.J. Fitz, N. Malenkovich, T. Okazaki, M.C. Byrne, H.F. Horton, L. Fouser, L. Carter, V. Ling, M.R. Bowman, B.M. Carreno, M. Collins, C.R. Wood, T. Honjo, Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation., *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1027–34. <https://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027>.
- [132] L. Calabrò, A. Morra, E. Fonsatti, O. Cutaia, C. Fazio, D. Annesi, M. Lenoci, G. Amato, R. Danielli, M. Altomonte, D. Giannarelli, A.M. Di Giacomo, M. Maio,

- Efficacy and safety of an intensified schedule of tremelimumab for chemotherapy-resistant malignant mesothelioma: an open-label, single-arm, phase 2 study., *Lancet. Respir. Med.* 3 (2015) 301–9. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00092-2](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00092-2).
- [133] C. Combaz-Lair, F. Galateau-Sallé, A. McLeer-Florin, N. Le Stang, L. David-Boudet, M. Duruisseaux, G.R. Ferretti, E. Brambilla, S. Lebecque, S. Lantuejoul, Immune biomarkers PD-1/PD-L1 and TLR3 in malignant pleural mesotheliomas., *Hum. Pathol.* 52 (2016) 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.01.010>.
- [134] S. Cedrés, S. Ponce-Aix, J. Zugazagoitia, I. Sansano, A. Enguita, A. Navarro-Mendivil, A. Martinez-Marti, P. Martinez, E. Felip, Analysis of expression of programmed cell death 1 ligand 1 (PD-L1) in malignant pleural mesothelioma (MPM)., *PLoS One.* 10 (2015) e0121071. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121071>.
- [135] S. Khanna, A. Thomas, D. Abate-Daga, J. Zhang, B. Morrow, S.M. Steinberg, A. Orlandi, P. Ferroni, J. Schlom, F. Guadagni, R. Hassan, Malignant Mesothelioma Effusions Are Infiltrated by CD3+ T Cells Highly Expressing PD-L1 and the PD-L1+ Tumor Cells within These Effusions Are Susceptible to ADCC by the Anti-PD-L1 Antibody Avelumab., *J. Thorac. Oncol.* 11 (2016) 1993–2005. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2016.07.033>.
- [136] S. Popat, A. Curioni-Fontecedro, U. Dafni, R. Shah, M. O'Brien, A. Pope, P. Fisher, J. Spicer, A. Roy, D. Gilligan, O. Gautschi, E. Nadal, W.D. Janthur, R. López Castro, R. García Campelo, S. Rusakiewicz, I. Letovanec, V. Polydoropoulou, H. Roschitzki-Voser, B. Ruepp, A. Gasca-Ruchti, S. Peters, R.A. Stahel, A multicentre randomised phase III trial comparing pembrolizumab versus single-agent chemotherapy for advanced pre-treated malignant pleural mesothelioma: the European Thoracic Oncology Platform (ETOP 9-15) PROMISE-meso trial, *Ann. Oncol.* (2020). <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.09.009>.
- [137] P.M. Forde, Z. Sun, V. Anagnostou, H.L. Kindler, W.T. Purcell, B.H.L. Goulart, A.Z. Dudek, H. Borghaei, J.R. Brahmer, S.S. Ramalingam, PrE0505: Phase II multicenter study of anti-PD-L1, durvalumab, in combination with cisplatin and pemetrexed for the first-line treatment of unresectable malignant pleural mesothelioma (MPM)—A PrECOG LLC study., *J. Clin. Oncol.* 38 (2020) 9003–9003. [https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15\\_suppl.9003](https://doi.org/10.1200/JCO.2020.38.15_suppl.9003).

- [138] A.K. Nowak, W.J. Lesterhuis, P.S. Kok, C. Brown, B.G. Hughes, D.J. Karikios, T. John, S.C.H. Kao, C. Leslie, A.M. Cook, N. Pavlakis, K. Briscoe, K.J. O'Byrne, C.S. Karapetis, W. Sen Lam, A. Langford, S. Yip, M.R. Stockler, Durvalumab with first-line chemotherapy in previously untreated malignant pleural mesothelioma (DREAM): a multicentre, single-arm, phase 2 trial with a safety run-in, *Lancet Oncol.* 21 (2020) 1213–1223. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(20\)30462-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(20)30462-9).
- [139] A.-M. Björkqvist, M. Wolf, S. Nordling, L. Tammilehto, Knuutila, J. Kere, K. Mattson, S. Knuutila, Deletions at 14q in malignant mesothelioma detected by microsatellite marker analysis, *Med. Genet.* 81 (1999) 1111–1115.
- [140] J. Prins, K.A.W. Illiamson, M.M.K.K. Amp, E.J.V.A.N.H. Ezik, T.H.V.A.N.D.E.R.K. Wast, A.H. Agemeijer, THE GENE FOR THE CYCLIN-DEPENDENT-KINASE-4 INHIBITOR , CDKN2A , IS PREFERENTIALLY DELETED IN MALIGNANT MESOTHELIOMA, 653 (1998) 649–653.
- [141] T. Taniguchi, S. Karnan, T. Fukui, T. Yokoyama, H. Tagawa, K. Yokoi, Y. Ueda, T. Mitsudomi, Y. Horio, T. Hida, Y. Yatabe, M. Seto, Y. Sekido, Genomic profiling of malignant pleural mesothelioma with array-based comparative chromosomal alteration regions including JUN, (2006). <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00386.x>.
- [142] M. Takeda, T. Kasai, Y. Enomoto, M. Takano, K. Morita, E. Kadota, N. Iizuka, H. Maruyama, A. Nonomura, Genomic gains and losses in malignant mesothelioma demonstrated by FISH analysis of paraffin-embedded tissues, (n.d.) 77–82. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2011-200208>.
- [143] H.C. Kang, H.K. Kim, S. Lee, P. Mendez, W. Kim, G. Woodard, J. Yoon, K. Jen, L.T. Fang, D.M. Jablons, I. Kim, Whole exome and targeted deep sequencing identify genome-wide allelic loss and frequent SETDB1 mutations in malignant pleural mesotheliomas, 7 (n.d.) 11–14.
- [144] G. Ugurluer, K. Chang, M.E. Gamez, A.L. Arnett, R. Jayakrishnan, R.C. Miller, T.T. Sio, Genome-based Mutational Analysis by Next Generation Sequencing in Patients with Malignant Pleural and Peritoneal Mesothelioma., *Anticancer Res.* 36 (2016) 2331–8.
- [145] P. Chirac, D. Maillet, F. Leprêtre, S. Isaac, O. Glehen, M. Figeac, L. Villeneuve, Genomic copy number alterations in 33 malignant peritoneal mesothelioma analyzed by comparative genomic hybridization array ☆ , ☆☆, *Hum. Pathol.* 55

(2016) 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2016.04.015>.

- [146] P. Desmeules, P. Joubert, L. Zhang, H.A. Al-Ahmadie, C.D. Fletcher, E. Vakiani, D.F. Delair, N. Rekhtman, M. Ladanyi, W.D. Travis, C.R. Antonescu, A Subset of Malignant Mesotheliomas in Young Adults Are Associated with Recurrent EWSR1/FUS-ATF1 Fusions, *Am. J. Surg. Pathol.* 41 (2017) 980–988. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000864>.
- [147] R. Hassan, B. Morrow, A. Thomas, T. Walsh, M.K. Lee, S. Gulsuner, M. Gadiraju, V. Panou, S. Gao, I. Mian, J. Khan, M. Raffeld, S. Patel, L. Xi, J.S. Wei, M. Hesdorffer, J. Zhang, K. Calzone, A. Desai, E. Padiernos, C. Alewine, D.S. Schrupp, S.M. Steinberg, H.L. Kindler, M.C. King, J.E. Churpek, Inherited predisposition to malignant mesothelioma and overall survival following platinum chemotherapy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (2019) 9008–9013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1821510116>.

**Table 1. Genomic alterations associated with malignant mesothelioma.**

Ref	Number of cases/samples	Techniques used	Main findings
[56]	40 cell lines and 23 primary tumors	Southern Blot and Targeted Seq of p16	Homozygous deletions on p16-INK in 85% both cell lines and 23% of tumors
[62]	50 primary tumors	FISH for p15 and p16.	Co-deletion of p15 and p16 in 72% of cases.
[58]	14 cell lines and 10 primary tumors	SSCP and Southern Blot for NF2	NF2 mutations in 41% of cases.
[57]	15 cell lines and 7 primary tumors	SSCP; Targeted Seq for NF2	NF2 mutations in 53% of cases.
[139]	34 primary tumors	CGH array; Southern Blot.	loss in 4q, 6q and 14q and gain in 15q and 7p
[140]	12 cell lines	PCR; FISH	Chromosome 9 deletion including <i>CDKN2A</i> but not <i>CDKN2B</i> .
[141]	17 primary tumors and 9 cell lines	CGH array; Southern Blot; Targeted Seq of NF2;	Gains in 1q, 5p, 7p, 8q24 and 20p; Loss in 1p36.33, 1p36.1, 1p21.3, 3p21.3, 4q22, 6q25, 9p21.3, 10p, 13q33.2, 14q32.13, 18q and 22q.
[53]	22 primary tumors	CNA array	Deletions in 22q12.2, 19q13.32 and 17p13.1 in 55-74% and gain in 5p, 18q, 8q and 17q in 23-55% of cases.
[54]	22 cell lines	CNA array	deletions of <i>CDKN2A/ARF</i> and <i>CDKN2B</i> , 1p36, 1p22, 3p21-22, 4q13-34, 11q23, 13q12-13, 14q32, 15q15, 18q12 and 22q12 in 55–90%
[142]	40 primary tumors	9p21 FISH	9p21 deletion in 35 of 40 cases (88%)
[59]	53 primary tumors	CGH array, FISH; Targeted Seq.	Deletions at 9p21, 22q and 3p21. Mutations in <i>BAP1</i> , <i>NF2</i> , <i>LATS1</i>
[96]	23 primary tumors	Targeted Seq of <i>BAP1</i>	biallelic <i>BAP1</i> gene alterations in 14 of 23 MMs (61%)
[75]	22 primary tumors	Whole-exome Seq	Major changes in copy numbers: <i>BAP1</i> , <i>NF2</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>CUL1</i> .
[79]	123 primary tumors	Targeted NGS of 52 genes	Alterations in p53/DNA repair ( <i>TP53</i> , <i>SMACB1</i> , and <i>BAP1</i> ) and PI3K–AKT pathways ( <i>PDGFRA</i> , <i>KIT</i> , <i>KDR</i> , <i>HRAS</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>STK11</i> , and <i>NF2</i> ).
[97]	22 primary tumors	Targeted <i>BAP1</i> Sanger Seq.; MLPA	alteration of <i>BAP1</i> in 63.6% of cases
[84]	48 peritoneal and 41 pleural tumors	CNA array	Loss in <i>BAP1</i> , <i>CDKN2A</i> and <i>NF2</i> in both tumor sites. Copy number gain were more common in peritoneum, loss were more common in pleura
[77]	42 primary tumors	Targeted NGS of 236 genes	Alterations in <i>BAP1</i> (47,6%), <i>NF2</i> (38,1%) and <i>CDKN2A/B</i> (35,7%).
[143]	78 primary tumors	Targeted Seq of <i>SETDB1</i>	Mutations in 7 patients
[144]	11 primary tumors	Targeted NGS of 236 mutations	Mutations in 86% of pleural and 50% of peritoneal cases. Most mutated genes were <i>BAP1</i> (36%), <i>CDKN2A/B</i> (27%) and <i>NF2</i> (27%).
[145]	33 peritoneal primary tumors	CGH array	Genomic pattern similar to pleural mesothelioma: loss of 3p21, 9p21, and 22q12. novel CNA included 15q26.2 and 8p11.22



[61]	216 primary tumors	Whole Exome Seq, Targeted NGS	BAP1, NF2, TP53, SETD2, DDX3X, ULK2, RYR2, CFAP45, SETDB1 and DDX51 significantly mutated genes. Gene fusion and splice alterations in NF2, BAP1 and SETD2. Alterations in Hippo, mTOR, histone methylation, RNA helicase and p53 signaling pathways.
[68]	33 primary tumors	CGH array for the 3p21 region; Targeted NGS of 4 genes	biallelic gene inactivation in SETD2 (9 of 33, 27%), BAP1 (16 of 33, 48%), PBRM1 (5 of 33, 15%), and SMARCC1 (2 of 33, 6%)
[146]	25 primary tumors	FISH	Identification of a <i>EWSR1/FUS-ATF1</i> gene fusion in 4 cases
[85]	88 peritoneal primary tumors	FISH; Targeted NGS for ALK	ALK rearrangements in 3 cases with ATG16L1, STRN, and TPM1
[9]	13 peritoneal primary tumors	Targeted NGS of 510 genes;	Bi-allelic inactivation of BAP1 (9/13 cases), mutation in <i>NF2</i> (3/13); <i>SETD2</i> (2/13) e <i>DDX3X</i> (2/13).
[76]	74 primary tumors	Whole Exome Seq.; CNA array	Inactivating alterations by mutation and CNA in: BAP1, CDKN2A, NF2, TP53, LATS2, and SETD2. Novel molecular subtype (3% of cases) genomic near-haploidization and TP53 and SETDB1 mutations
[147]	239 genomic DNA from MM patients	Targeted NGS of 73 genes	12% of cases had germline mutations: 16 in BAP1 and 12 distributed among CHEK2, PALB2, BRCA2, MLH1, POT1, TP53, and MRE11A
[81]	121 primary tumors	CNA array, Whole Exome Seq.;	CDKN2A deletion in 60% of tumours; BAP1 mutated or deleted in 54%; RASSF7 amplification in 33%; RB1 deleted or mutated in 26%; NF2 mutated in 20%; TP53 mutated in 8%; SETD2 in 6%; DDX3X in 5% and LATS2 in 5%.
[78]	266 primary tumors	Targeted NGS 21 genes	TERT promoter, <i>NF2</i> , and <i>TP53</i> mutations associated w/ worse survival.

**Table 2. Trials evaluating immunotherapy in second line for Malignant Pleural Mesothelioma.**

<b>Trial</b>	<b>Phase</b>	<b>Arms</b>	<b>N</b>	<b>ORR (%)</b>	<b>PFS median (months)</b>	<b>OS median (months)</b>	<b>PD-L1 expression</b>
<b>DETERMINE</b>	II	Tremelimumab	569	5	2.8	7.7	NE
<b>KEYNOTE-028</b>	IB	Pembrolizumab	25	20	5.4	18	All tumors were PD-L1+
<b>Kindler et al. (2016)</b>	II	Pembrolizumab	35	21	6.2	NR	NA
<b>NivoMes</b>	II	Nivolumab	34	24	2.6	11.8	Trend to higher ORR
<b>MERIT trial</b>	II	Nivolumab	34	29	6.1	17.3	Improved PFS and OS
<b>JAVELIN</b>	IB	Avelumab	53	9,4	4.3	NR	Trend to improved PFS
<b>NIBIT-MESO-1</b>	II	Tremelimumab + durvalumab	40	25	5.7	16.6	Improved ORR, OS and PFS
<b>INITIATE</b>	II	Nivolumab + ipilimumab	36	29	6.2	NR	Improved ORR
<b>MAPS2</b>	II (randomized)	Nivolumab + ipilimumab Nivolumab	125	28 9	5.6 4.0	15.9 11.9	No association with OS or PFS
<b>PROMISE</b>	III	Pembrolizumab Gemcitabine or Vinorelbine	144	20			NA

NE – not evaluated; NA – no association; NR – not reported.

**Table 3. Ongoing phase III first line treatment trials for Malignant Pleural Mesothelioma.**

<b>Title</b>	<b>Primary ID</b>	<b>ClinicalTrials.gov ID</b>
Phase III Randomized Trial of Pleurectomy/Decortication Plus Chemotherapy With or Without Adjuvant Hemithoracic Intensity-Modulated Pleural Radiation Therapy (IMPRINT) for MPM.	NRG-LU006	NCT04158141
Randomized, Double-Blind, Phase 2/3 Study in Subjects With MPM to Assess ADI-PEG 20 With Pemetrexed and Cisplatin (ATOMIC-Meso Phase 2/3 Study).	POLARIS2015-003	NCT02709512
A Phase III, Randomized, Open Label Trial of Nivolumab in Combination With Ipilimumab Versus Pemetrexed With Cisplatin or Carboplatin as First Line Therapy in Unresectable MPM	CA209-743	NCT02899299
A Multicentre Randomised Phase III Trial Comparing Atezolizumab Plus Bevacizumab and Standard Chemotherapy Versus Bevacizumab and Standard Chemotherapy as First-line Treatment for Advanced MPM.	ETOP 13-18	NCT03762018
A Randomized, Open-Label Phase II/III Study With Dendritic Cells Loaded With Allogeneic Tumour Cell Lysate (PheraLys) in Subjects With Mesothelioma as Maintenance Treatment (MesoPher) After Chemotherapy.	MM04	NCT03610360
A Phase II/III Randomized Study of Pembrolizumab in Patients With Advanced MPM.	IFCT-1901	NCT02784171

Declarations of interest: none