

Studio sul Mesotelioma della pleura pubblicato su Oncotarget

27 Ottobre, 2016

Uno studio di collaborazione tra ricercatori di UNIFE, UNITS e OSPAL coordinato dal Prof. Mauro Tognon sui marcatori del mesotelioma maligno della pleura, il tumore da esposizione all'amianto, pubblicato dalla prestigiosa rivista americana Oncotarget.

Uno studio di collaborazione tra i gruppi della Scuola di Medicina UNIFE dei Proff. Mauro Tognon, Piera Boschetto, Massimo Negrini, della Scuola di Medicina dell'Università di Trieste dei Proff. **Manola Comar** e **Massimo Bovenzi**, dell'Ospedale di Alessandria dei Dottori Roberta Libener e Roberto Guaschino, ha consentito di identificare nuovi marcatori nel siero di pazienti affetti da mesotelioma maligno della pleura, e di lavoratori ex-esposti all'amianto. I risultati della ricerca sono stati pubblicati dalla prestigiosa rivista scientifica americana di oncologia molecolare [ONCOTARGET](#).

«**La ricerca** eseguita presso le Università di Ferrara e Trieste, e Ospedale di Alessandria – affermano i ricercatori - ha impiegato sieri di pazienti affetti da mesotelioma maligno della pleura, di lavoratori ex-esposti all'amianto e di individui sani. **Obiettivo dello studio** era ricercare nel siero la presenza variabile, sia come numero che come concentrazione, di diverse piccole molecole denominate microRNA tra le circa 1.200 indagate.»

«I **risultati** dell'indagine molecolare – proseguono i ricercatori – sono molto significativi perché ci hanno permesso di verificare una maggiore e alta concentrazione principalmente di tre molecole di microRNA nel siero dei pazienti affetti dal tumore, mentre altre molecole di microRNA sono presenti con minore concentrazione nel siero di lavoratori ex-esposti all'amianto. La diversa quantità di specifiche molecole di microRNA, e la presenza/assenza di altre molecole di microRNA, permetterà ora di valutare se questi microRNA sono dei nuovi marcatori dosabili nel siero in una larga casistica. Infatti, i microRNA individuati nel siero sono potenzialmente da considerarsi come marcatori del tumore e prognostici dell'insorgenza del mesotelioma maligno della pleura. Inoltre, i microRNA e le proteine da essi regolate potrebbero diventare nuovi bersagli per terapie innovative. I dati di questo lavoro lasciano intravedere una possibile applicazione per identificare il tumore già nelle prime fasi e predittivo del rischio di insorgenza del mesotelioma maligno della pleura nei lavoratori ex-esposti all'amianto. I risultati conseguiti sono preliminari e necessitano di ulteriori studi per una loro validazione e impiego in medicina.»

La ricerca è stata finanziata dall'AIRC, dal LIONS Club International Distretto 108 TB, Fondazione Buzzi UNICEM, ASLEM, Fondazione Cassa di Risparmio di Cento, Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia.

[Oncotarget](#), 3 ottobre 2016

Contatti:

Prof. Massimo Bovenzi

Dipartimento Universitario Clinico di Scienze mediche, chirurgiche e della salute

Tel. 0403992313 – 040632797

e-mail: bovenzi@units.it

Nuovi possibili marcatori per il mesotelioma pleurico

Ultimo aggiornamento: 22 luglio 2019



Titolo originale dell'articolo: **Potential Diagnostic and Prognostic Role of Microenvironment in Malignant Pleural Mesothelioma** Titolo della rivista: **Journal of Thoracic Oncology**

Data di pubblicazione originale: **9 maggio 2019**

Le caratteristiche delle cellule immunitarie che infiltrano il tessuto tumorale sembrano offrire indicazioni preziose per ottimizzare diagnosi e prognosi della malattia e scegliere le terapie più appropriate.

Per una medicina sempre più precisa è fondamentale disporre di **strumenti di diagnosi e prognosi dei tumori sempre più accurati**. Solo così, infatti, si possono capire bene le caratteristiche del tumore di ciascun paziente e gli eventuali punti deboli, per stabilire la terapia più opportuna. Vanno proprio in questa direzione i risultati, pubblicati sul *Journal of Thoracic Oncology*, di uno studio condotto dal gruppo di ricerca di Chiara Riganti dell'Università di Torino. Nello studio i ricercatori hanno cercato **nuovi possibili marcatori diagnostici e prognostici per il mesotelioma pleurico**.

I ricercatori si sono concentrati sul microambiente tumorale e in particolare sulle **cellule immunitarie che infiltrano il tumore** stesso. "Il mesotelioma pleurico possiede un'elevata

capacità di neutralizzare la naturale azione antitumorale del sistema immunitario, il che spiega anche gli **scarsi successi dell'immunoterapia contro questa malattia**" spiega Riganti. "Sapere quali sono le cellule immunitarie che infiltrano il tumore è il primo passo per ottimizzare questi approcci terapeutici."

Riganti e collaboratori hanno lavorato con campioni biologici di **275 pazienti che si erano sottoposti a toracosopia per un versamento pleurico**, possibile sintomo di un tumore della pleura. Con tecniche di analisi come la selezione cellulare accoppiata a citofluorimetria, hanno **esaminato le cellule immunitarie eventualmente presenti sia in biopsie di tessuto pleurico sia nel liquido di versamento**, scoprendo che le caratteristiche delle cellule presenti nella pleura – ma non nel liquido – cambiavano a seconda che il paziente fosse affetto da pleurite non maligna, mesotelioma pleurico o metastasi di altro tumore. In caso di mesotelioma, inoltre, permettevano di **prevedere l'evoluzione della malattia** in risposta alla terapia. Tra le caratteristiche associate a una prognosi peggiore c'era per esempio una **bassa percentuale di linfociti antitumorali** come i linfociti T CD8 e **un'alta percentuale di cellule immunitarie tolleranti il tumore** (come linfociti T regolatori e cellule mieloidi che sopprimono la reazione di difesa).

Secondo i ricercatori, il cui studio è stato sostenuto da AIRC, la scoperta potrebbe essere utile anche per **indirizzare meglio eventuali terapie**, per esempio puntando su trattamenti che a seconda dei casi sopprimano la componente immunitaria più tollerante o potenzino quella più attiva contro il tumore. "Per passare davvero all'ambito clinico, però, servono ulteriori studi più ampi" conclude Riganti.

L'amianto induce la trasformazione delle cellule mesoteliali tramite l'autofagia guidata da HMGB1

Jiaming Xue , Simone Patergnani — , Carlotta Giorgi —,+15, e Haining Yang — [Informazioni sugli autori e affiliazioni](#)

Contributo di Tak W. Mak, 10 agosto 2020 (inviato per la revisione il 28 aprile 2020; rivisto da Timothy R. Billiar e Antonio Giordano)

30 settembre 2020

117 (41) 25543 - 25552

<https://doi.org/10.1073/pnas.2007622117>

Significato

Milioni di persone sono state esposte all'amianto e corrono un rischio maggiore di sviluppare il mesotelioma, un tumore maligno aggressivo resistente alle attuali terapie. Qui, chiariamo i passaggi critici nella carcinogenesi dell'amianto: l'amianto induce il rilascio della casella di gruppo 1 ad alta mobilità che innesca l'autofagia. L'attivazione dell'autofagia costituisce un processo biologico chiave che consente ad alcune cellule mesoteliali di sopravvivere alla citotossicità dell'amianto e di conseguenza aumenta la frazione di cellule mesoteliali umane danneggiate dal DNA suscettibili alla trasformazione maligna. Abbiamo scoperto che l'inibizione dell'autofagia utilizzando la cloroquina o il farmaco antidepressivo desmetilclomipramina aumentava la morte cellulare indotta dall'amianto e riduceva la trasformazione cellulare mediata dall'amianto.

Astratto

L'amianto provoca la trasformazione maligna delle cellule mesoteliali umane primarie (HM), portando al mesotelioma. I meccanismi della carcinogenesi dell'amianto rimangono enigmatici, poiché l'esposizione all'amianto induce la morte degli HM. Tuttavia, alcuni HM esposti all'amianto sfuggono alla morte cellulare, accumulano danni al DNA e possono trasformarsi. Abbiamo precedentemente dimostrato che, in seguito all'esposizione all'amianto, HM e i macrofagi reattivi rilasciano la proteina HMGB1 (High Mobility Group Box 1) che diventa rilevabile nei tessuti vicino ai depositi di amianto dove HMGB1 innesca l'infiammazione cronica. HMGB1 è rilevabile anche nel siero di individui e topi esposti all'amianto. Cercando ulteriori biomarcatori, abbiamo trovato livelli più elevati del marcatore autofagico ATG5 nei sieri di individui esposti all'amianto rispetto ai controlli non esposti. Mentre studiavamo i meccanismi alla base di questa scoperta, abbiamo scoperto che il rilascio di HMGB1 in seguito all'esposizione all'amianto promuoveva l'autofagia, consentendo a una frazione più elevata di HM di sopravvivere all'esposizione all'amianto. Il silenziamento di HMGB1 ha inibito l'autofagia e aumentato la morte di HM indotta dall'amianto, diminuendo così la trasformazione di HM indotta dall'amianto. Dimostriamo che l'autofagia è stata indotta dalle frazioni citoplasmatiche ed extracellulari di HMGB1 attraverso l'impegno del recettore RAGE e della via Beclin 1, mentre l'HMGB1 nucleare non ha partecipato a questo processo. Abbiamo convalidato i nostri risultati in un nuovo modello murino mesoteliale condizionale HMGB1-knockout (HMGB1-cKO). Rispetto ai topi HMGB1 wild-type, le cellule mesoteliali dei topi HMGB1-cKO hanno mostrato un'autofagia significativamente ridotta e un aumento della morte cellulare. Gli inibitori dell'autofagia, la cloroquina e la desmetilclomipramina, hanno aumentato la morte cellulare e ridotto la formazione di focolai causati dall'amianto. In sintesi, l'HMGB1 rilasciato in seguito all'esposizione all'amianto induce l'autofagia, promuovendo la sopravvivenza dell'HM e la trasformazione maligna.

I meccanismi della carcinogenesi dell'amianto hanno lasciato perplessi i ricercatori sin dalla scoperta che queste fibre causavano il mesotelioma ([1](#)). Amianto è un nome generico utilizzato per identificare sei tipi di fibre minerali utilizzate commercialmente da secoli: crocidolite, crisotilo, amosite, antofillite, tremolite e actinolite ([2](#)). L'amianto veniva commercializzato liberamente prima che nel mondo occidentale venissero implementate, negli anni '80, norme che ne limitavano o proibivano l'uso. Attualmente, solo l'amianto crisotilo viene ancora estratto e utilizzato in grandi quantità in Asia e Africa ([1](#) , [3](#)). Pertanto, milioni di persone sono state esposte e corrono un rischio maggiore di sviluppare mesotelioma e altre neoplasie maligne correlate all'amianto ([1](#)). Oltre all'amianto, nell'ambiente sono presenti circa 400 fibre minerali naturali ([1](#) , [2](#)). Molti di essi sono cancerogeni per l'uomo potenziali o accertati; tuttavia, poiché queste fibre non sono regolamentate, possono, e alcune sono state, estratte e utilizzate ([2](#)). Tra queste fibre presenti in natura, la zeolite erionite, considerata la fibra cancerogena più potente, è presente in diverse regioni del mondo, compresi gli Stati Uniti ([4](#) , [5](#)).

L'amianto è cancerogeno per le cellule mesoteliali umane primarie (HM), le cellule che danno origine al mesotelioma ([1](#)). La deposizione di amianto nella pleura provoca infiammazione cronica e iperplasia mesoteliale atipica, il che significa che il singolo strato piatto di cellule mesoteliali che formano la pleura e il peritoneo si accumulano e spesso formano strati multicellulari da cui nel tempo può originare il mesotelioma ([1](#)). Quando gli HM primari nella coltura dei tessuti vengono esposti all'amianto, muoiono per apoptosi ([6](#)) e necrosi ([7](#) , [8](#)). Abbiamo dimostrato che la crocidolite, l'amianto crisotilo e l'erionite ([5](#) , [7](#) , [8](#)) inducono necrosi cellulare programmata ([9](#)) in HM. Le cellule necrotiche rilasciano la proteina proinfiammatoria High Mobility Group Box 1 (HMGB1) nello spazio extracellulare ([8](#)), dove HMGB1 avvia l'infiammazione ([10](#) – [12](#)), innesca la via

dell'inflammasoma ([13](#)) e sostiene il processo infiammatorio cronico caratteristico dell'amianto. depositi di fibre nei tessuti ([8](#) , [14](#)). Questo processo può auto-propagarsi poiché l'amianto è biopersistente e non può essere facilmente rimosso una volta depositatosi nei tessuti. A causa dell'infiammazione cronica, i radicali reattivi mutageni dell'ossigeno, il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF α) e altre citochine vengono rilasciati e promuovono il danno al DNA che può derivare da una trasformazione maligna ([8](#) , [14](#) , [15](#)). Pertanto, l'infiammazione indotta dall'amianto precede la trasformazione maligna ([16](#)). Sperimentalmente, la carcinogenesi dell'amianto può essere studiata nei topi dove provoca risposte patologiche simili e provoca il mesotelioma per un periodo compreso tra 6 e 18 mesi ([8](#) , [17](#)). Negli esseri umani, la carcinogenesi dell'amianto può essere studiata in vitro misurando la formazione di focolai tridimensionali in HM coltivati con terreni contenenti TNF α ed esposti all'amianto ([7](#) , [18](#)).

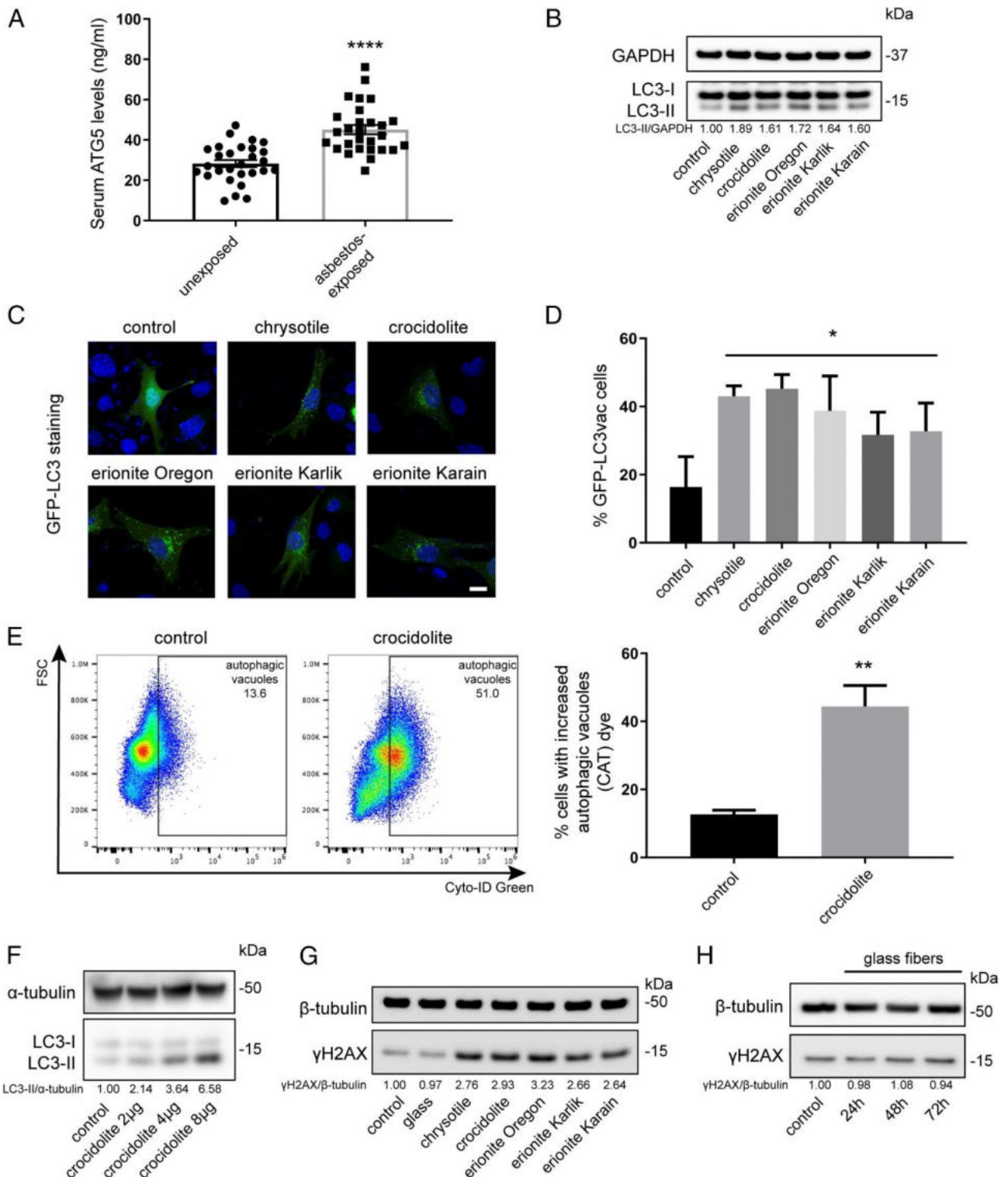
Oltre al suo ruolo proinfiammatorio, HMGB1 modula l'autofagia nelle cellule sottoposte a stress proautofagico ([19](#) – [22](#)). L'autofagia si presenta in due forme: autofagia costitutiva (di fondo) e autofagia indotta (reattiva) ([23](#) – [25](#)). L'autofagia costitutiva ricicla i componenti cellulari da organelli invecchiati/danneggiati. L'autofagia indotta si verifica in risposta alle sfide ambientali e protegge le cellule dall'apoptosi e dalla necrosi. In seguito alla deprivazione nutrizionale, il flusso autofagico viene avviato dall'inibizione di mTOR e dalla successiva attivazione della via mTOR-ULK-PI3K ([26](#) , [27](#)). Nello specifico, l'inibizione di mTOR porta all'assemblaggio del complesso della chinasi simile a Unc-51 (ULK), che, a sua volta, fosforila e attiva il complesso Beclin 1 della fosfatidilinositolo 3-chinasi di classe III (PI3K-III) ([28](#)). Durante questo processo, vengono reclutate diverse proteine correlate all'autofagia (ATG) per facilitare la lipidazione della catena leggera 3B delle proteine associate ai microtubuli 1A/1B (LC3-I) in LC3-II e l'inserimento di LC3-II nella membrana di autofagosoma. In parallelo, la proteina adattatrice del carico p62/sequestosoma-1 (p62) fornisce sostanze autofagiche all'autofagosoma per la degradazione. Nella fase avanzata dell'autofagia, gli autofagosomi si fondono con i lisosomi per diventare l'autolisosoma dove il contenuto dell'autofagosoma viene digerito e riciclato. I livelli di LC3-II e p62 possono essere utilizzati per valutare l'autofagia e per distinguere l'induzione dell'autofagia (caratterizzata da un aumento di LC3-II e una diminuzione di p62) dal blocco del flusso autofagico (caratterizzato da aumenti di LC3-II e p62) ([29](#)).

Qui abbiamo studiato il possibile ruolo dell'autofagia nella carcinogenesi dell'amianto.

Risultati

L'amianto e altre fibre cancerogene inducono l'autofagia.

Abbiamo studiato campioni di siero di 30 individui sani senza storia di esposizione all'amianto e 29 individui con storie di esposizione professionale all'amianto ([Materiali e metodi](#)). I livelli del marcatore autofagico ATG5 erano significativamente elevati nei sieri di individui esposti all'amianto rispetto a quelli di individui non esposti ([Fig. 1 A](#)). Questa scoperta ci ha spinto a indagare se l'amianto fosse un induttore dell'autofagia e a studiare i possibili meccanismi sottostanti.



L'amianto promuove l'autofagia nell'HM primario. (A) Livelli sierici del marcatore autofagico ATG5 di 30 individui non esposti e 29 individui esposti all'amianto. I livelli di ATG5 erano significativamente elevati negli individui esposti all'amianto ($45,11 \pm 12,14$ ng/mL) rispetto al gruppo non esposto ($28,29 \pm 9,4$ ng/mL) (ANOVA, **** $P < 0,0001$). (B) Il Western blot rappresentativo ha mostrato un aumento della lipidazione di LC3 (conversione di LC3-I, banda superiore, in LC3-II, banda inferiore) 48 ore dopo l'esposizione a $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ delle fibre cancerogene indicate, rispetto alle cellule di controllo non esposte. Sono stati riportati i rapporti densitometrici di LC3-II (un marcatore di autofagia) rispetto a GAPDH rispetto al controllo. (C e D) HM sono stati trasdotti con adenovirus GFP-LC3, seguito dall'esposizione alle fibre cancerogene indicate. I punti

autofagici sono stati visualizzati mediante microscopia a fluorescenza (C) e le percentuali di cellule vacuolate LC3 per campo sono state quantificate (ANOVA, * $P < 0,05$) (D). (Barra della scala in C , 10 μm .) (E) L'autofagia indotta dall'amianto è stata misurata con colorazione Cyto-ID Green (tracciante anfifilico cationico fluorescente [CAT]) mediante citometria a flusso. Gli HM sottoposti ad autofagia (indicati dai vacuoli autofagici) sono stati quantificati nel grafico a destra (test t non accoppiato a due code, ** $P < 0,01$). (f) L'autofagia indotta dalla crocidolite nell'HM era correlata alla densità delle fibre: l'autofagia (LC3-II) è diventata rilevabile dopo l'esposizione a concentrazioni di 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ di crocidolite ed è aumentata fino a 8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. (G) Western blot rappresentativo che misura i livelli di γH2AX (un marcatore di danno/riparazione del DNA). Gli HM esposti a 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ delle fibre cancerogene indicate per 48 ore mostrano livelli aumentati di γH2AX rispetto agli HM non esposti o agli HM esposti a fibre di vetro non cancerogene. (H) HM esposto a fibre di vetro non cancerogene a 24, 48 e 72 ore: non sono stati osservati cambiamenti in γH2AX in nessun momento.

Abbiamo testato se l'esposizione a fibre cancerogene susciterebbe risposte autofagiche nell'HM primario. L'immunoblotting di HM esposto a fibre cancerogene ha rivelato conversioni marcatamente aumentate di LC3-I in LC3-II, evidenza di attivazione dell'autofagia (Fig. 1 B). Gli HM trasdotti con adenovirus GFP-LC3 sono stati esposti a diverse fibre cancerogene. I punti autofagici erano evidenti nel citoplasma degli HM esposti alle fibre, mentre erano da bassi a non rilevabili negli HM di controllo non esposti (Fig. 1 C e D). La prevalenza delle cellule sottoposte ad autofagia è stata quantificata etichettando HM contenente vacuolo autofagico con una sonda Cyto-ID Green. Le analisi di citometria a flusso hanno mostrato un aumento più che doppio dell'autofagia nelle cellule esposte all'amianto rispetto alle cellule HM non esposte (Fig. 1 E) ed è stato osservato anche un effetto dose-dipendente (Fig. 1 F).

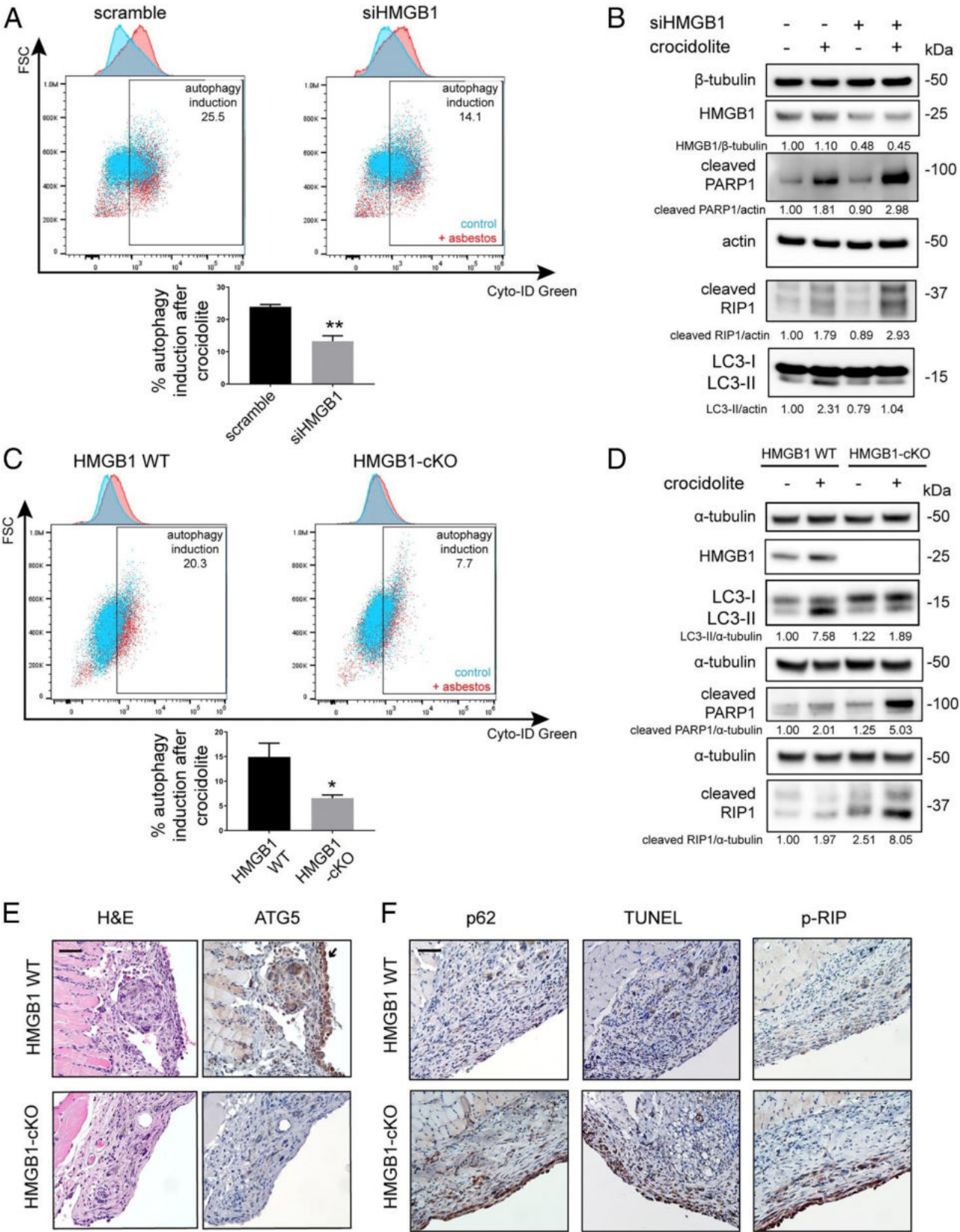
Abbiamo studiato gli effetti dell'amianto sul flusso autofagico misurando i livelli di LC3-II in presenza o assenza del cloruro di ammonio (NH_4Cl) che blocca l'autofagia (29). Abbiamo riscontrato ulteriori aumenti dei livelli di LC3-II negli HM esposti all'amianto in presenza di NH_4Cl , rispetto agli HM esposti all'amianto senza NH_4Cl ([Appendice SI, Fig. S1 A](#)), prova ulteriore a sostegno del fatto che l'amianto ha indotto l'autofagia.

Gli HM esposti all'amianto hanno accumulato danni al DNA, come indicato dall'aumento di γH2AX , mentre le fibre di vetro non cancerogene no (Fig. 1 G e H e [Appendice SI, Fig. S1 B](#)). Quando abbiamo misurato la tossicità dell'amianto in HM 48 ore dopo l'esposizione all'amianto utilizzando la citometria a flusso ([Appendice SI, Fig. S2 A](#)), Western blot ([Appendice SI, Fig. S2 B](#)) e immunofluorescenza ([Appendice SI, Fig. S2 C](#)), abbiamo rilevato un aumento significativo e consistente della morte cellulare attraverso necrosi e apoptosi. Le induzioni di autofagia, apoptosi e necrosi nell'HM esposto all'amianto sono state visualizzate anche mediante immunofluorescenze di LC3 (autofagia), caspasi 3 scissa e proteina interagente con il recettore 1 (RIP1) ([Appendice SI, Fig. S3 A](#)). Gli HM esposti a fibre di vetro non hanno mostrato alcun aumento dell'autofagia o della morte cellulare ([Appendice SI, Fig. S3 B](#)).

HMGB1 media l'autofagia indotta dall'amianto in vitro.

Quando gli HM sono stati esposti all'amianto, i livelli sia di HMGB1 citoplasmatico ([Appendice SI, Fig. S4 A e B](#)) che di HMGB1 extracellulare ([Appendice SI, Fig. S4 C](#)) sono aumentati significativamente, in linea con le osservazioni precedenti (8). Abbiamo ipotizzato che l'HMGB1 citoplasmatico e/o extracellulare potrebbe attivare l'autofagia, che, a sua volta, potrebbe proteggere una frazione di HM dalla tossicità dell'amianto. Pertanto, abbiamo silenziato HMGB1 e misurato l'autofagia nell'HM esposto all'amianto. L'analisi della citometria a flusso delle cellule marcate con Cyto-ID Green ha rivelato che l'autofagia indotta dall'amianto era significativamente ridotta negli HM silenziati con HMGB1 rispetto

agli HM non silenziati ([Fig. 2 A](#) e [Appendice SI, Fig. S4 D](#)). Allo stesso tempo, un aumento della morte cellulare si è verificato per apoptosi (PARP1 scisso) o per necrosi (RIP1 scisso) in HM silenziato con HMGB1 ([Fig. 2 B](#)). Pertanto, il silenziamento di HMGB1 ha ridotto l'autofagia e ha sensibilizzato le cellule alla tossicità dell'amianto.



La perdita di HMGB1 riduce l'autofagia indotta dall'amianto e promuove la morte cellulare in seguito all'esposizione all'amianto crocidolite. (A) Citometria a flusso con marcatura Cyto-ID Green di HM 48 ore dopo l'esposizione a $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di crocidolite. Nei dot plot sovrapposti con gli istogrammi corrispondenti (grafico superiore superiore), il blu rappresenta l'autofagia nel controllo non esposto e il rosso rappresenta l'autofagia dopo l'esposizione alla crocidolite. La differenza tra blu e rosso è stata segnalata come "induzione dell'autofagia". Il silenziamento di HMGB1 ha portato a una significativa diminuzione dell'autofagia indotta dall'amianto (grafico in basso) (test t non accoppiato a due code , $** P < 0,01$). (B) Western blot che mostra che il silenziamento di HMGB1 (siHMGB1) ha portato alla riduzione di LC3-II (autofagia) in HM esposto a crocidolite mentre i marcatori per le vie apoptotiche e necrotiche sono aumentati, come dimostrato dai livelli più elevati di PARP1 scisso (apoptosi) e RIP1 scisso (necrosi). (C) Citometria a flusso di cellule mesoteliali murine primarie marcate con Cyto-ID esposte a crocidolite. L'autofagia indotta dall'amianto è stata significativamente ridotta nelle cellule mesoteliali isolate dai topi HMGB1-cKO rispetto alle cellule dei topi HMGB1 WT (test t non accoppiato a due code , $* P < 0,05$). Nei dot plot sovrapposti con i corrispondenti istogrammi come in A, il blu rappresenta l'autofagia nelle cellule di controllo non esposte e il rosso rappresenta l'autofagia negli HM esposti alla crocidolite. La differenza tra blu e rosso è stata segnalata come "induzione dell'autofagia". (D) Western blot rappresentativo di cellule mesoteliali primarie di topi HMGB1-cKO che mostrano una diminuzione di LC3-II e un aumento di PARP1 e RIP1 scissi rispetto alle cellule di HMGB1 WT dopo esposizione alla crocidolite. (E) Colorazione H&E rappresentativa (ematossilina ed eosina) e ATG5 di biopsie peritoneali/diaframma di topi esposti a crocidolite. Si noti l'importante infiammazione cronica e la formazione di cellule giganti di corpi estranei vicino ai depositi di fibre in tutte le microfotografie. I topi HMGB1 WT mostravano una colorazione ATG5 prominente nelle cellule mesoteliali iperplastiche (freccia), mentre i topi HMGB1-cKO no. Guarda anche [Appendice SI, fig. S5 D](#). (Barra della scala, $50 \mu\text{m}$.) (F) Rispetto alle biopsie da HMGB1 WT, le cellule mesoteliali dei topi HMGB1-cKO hanno mostrato un aumento dell'apoptosi (TUNEL, colorazione marrone) e della necrosi (p-RIP, colorazione marrone) e una ridotta autofagia (aumento di p62, un marcatore di autofagia, colorazione marrone). (Barra della scala, $50 \mu\text{m}$.)

HMGB1 è necessario per l'autofagia indotta dall'amianto nei topi.

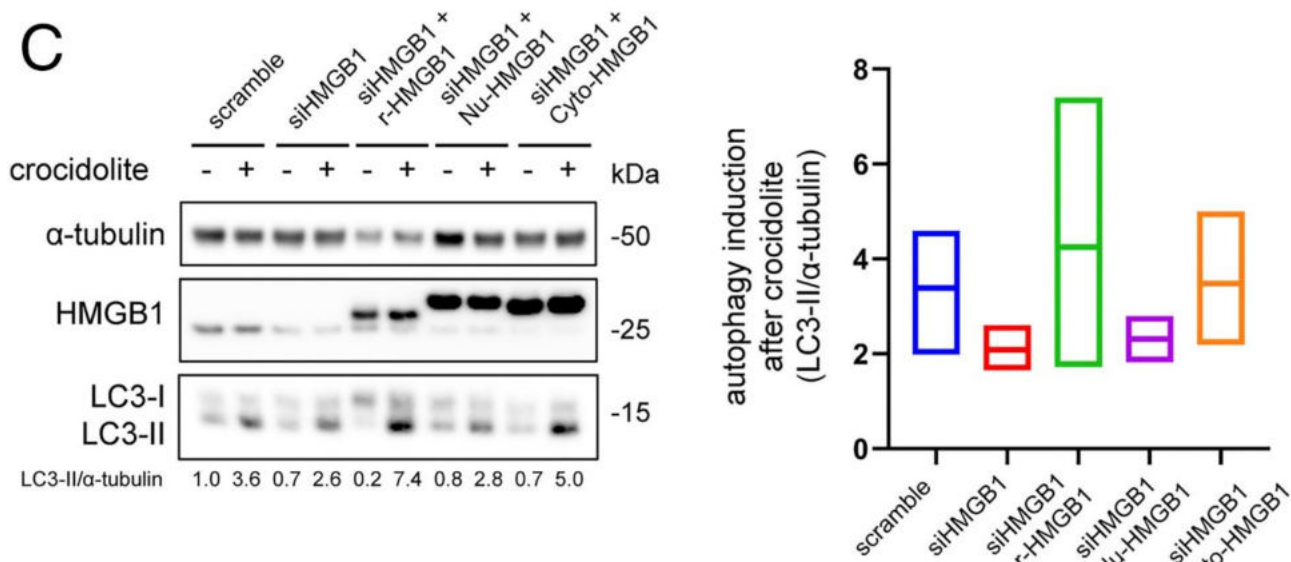
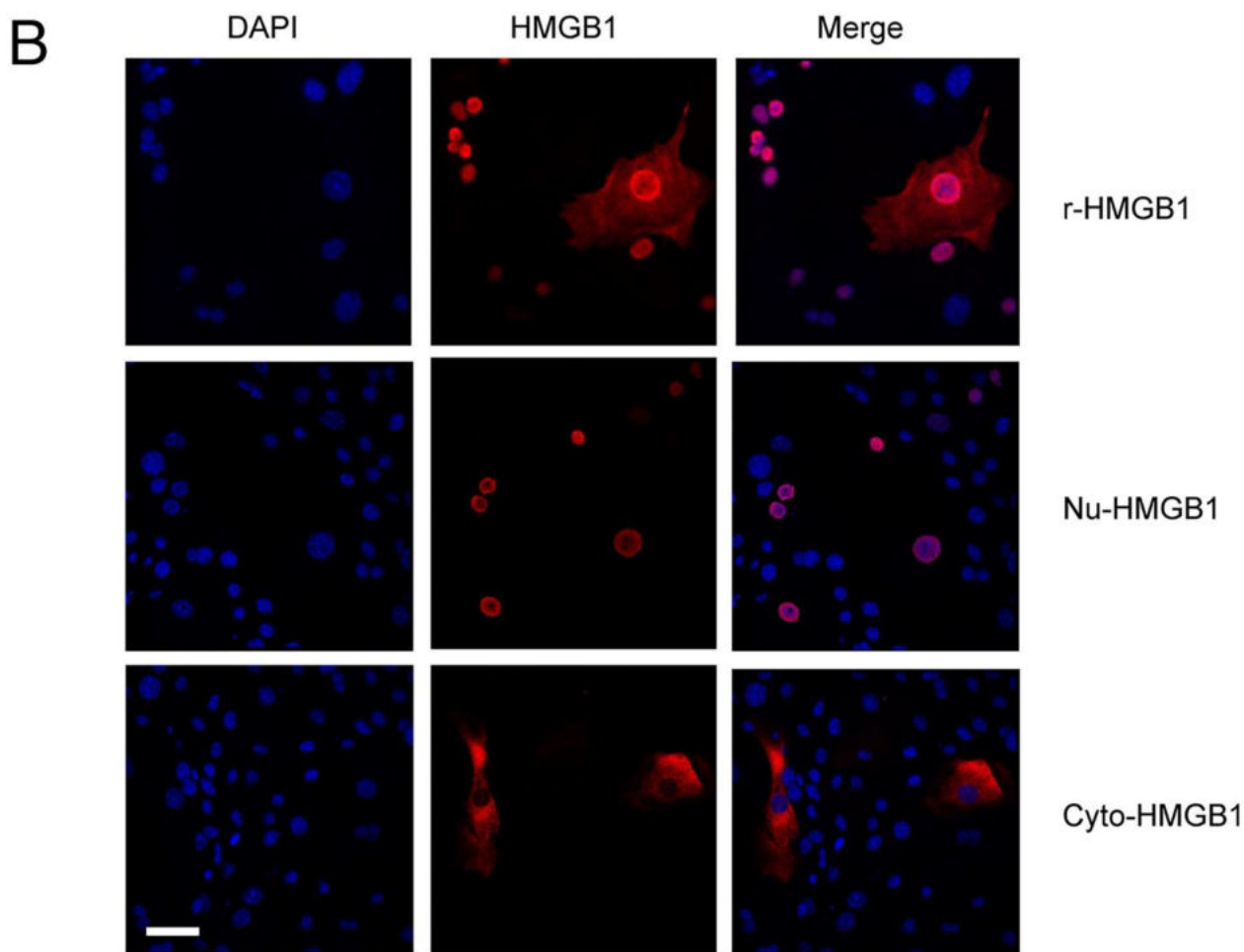
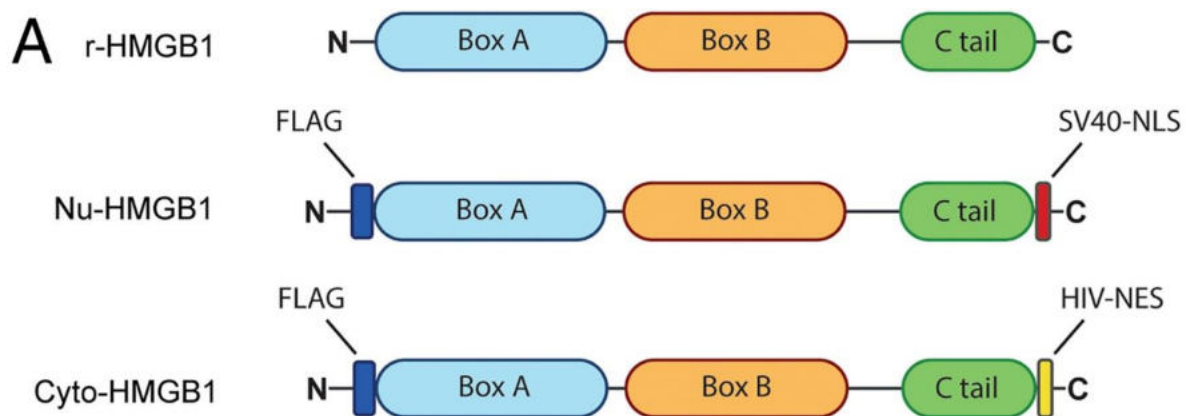
Per convalidare i nostri risultati in vitro con HM, abbiamo progettato un modello murino knockout HMGB1 condizionale mesoteliale (HMGB1-cKO) ([Appendice SI, Fig. S5 A](#)). Abbiamo scoperto che l'autofagia indotta dall'amianto era significativamente ridotta nelle cellule mesoteliali primarie dei topi HMGB1-cKO, rispetto alle cellule mesoteliali dei topi HMGB1 wild-type (HMGB1 WT). Al contrario, l'apoptosi e la necrosi sono aumentate significativamente nelle cellule derivate da topi HMGB1-cKO rispetto alle cellule di controllo di topi HMGB1 WT ([Fig. 2 C e D](#) e [Appendice SI, Fig. S5 B](#)).

Abbiamo testato questi risultati in vivo ([Materiali e metodi](#) e [Appendice SI, Fig. S5 C](#)). Dieci topi HMGB1-cKO ($Hmgb1^{ff} Wt1^{ERT2-Cre/+}$) e 10 topi HMGB1 WT ($Wt1^{ERT2-Cre/+}$) sono stati pretrattati con tamoxifene per indurre la ricombinazione mediata da Cre, con conseguente delezione dei loci HMGB1 in le cellule mesoteliali dei topi adulti. Tre settimane dopo, a questi topi è stato iniettato per via intraperitoneale asbesto crocidolite alla dose di $0,5 \text{ mg/settimana}$ per 10 settimane, per una dose totale di 5 mg di crocidolite, una dose standard che induce il mesotelioma nei topi WT (17) [.](#) Una settimana dopo l'iniezione finale di amianto, questi topi sono stati soppressi e sono state eseguite le necroscopie. L'istologia del peritoneo e degli organi peritoneali ha rivelato aree di deposizione di amianto accompagnate da infiammazione cronica e iperplasia mesoteliale. All'interno di queste aree, ATG5 era altamente espresso dalle cellule

mesoteliali e, in misura minore, dalle cellule giganti del corpo estraneo e dai macrofagi che circondano le fibre di amianto nei topi WT. Al contrario, l'espressione di ATG5 era minima o nulla nelle cellule mesoteliali e nei macrofagi dei topi HMGB1-cKO ([Fig. 2 E](#) e [Appendice SI, Fig. S5 D](#)). Di conseguenza, negli stessi campioni biotici, la colorazione di p62 era bassa nei topi WT [bassi livelli di p62 si riscontrano nelle cellule sottoposte ad autofagia ([30](#))]; invece, p62 era altamente espresso nelle cellule mesoteliali dei topi HMGB1-cKO ([Fig. 2 F](#)). Inoltre, la colorazione TUNEL e p-RIP, che indicano rispettivamente apoptosi ([31](#)) e necrosi ([32](#)), erano basse nelle cellule mesoteliali dei topi WT ed elevate nei topi HMGB1-cKO ([Fig. 2 F](#)). Questi risultati erano coerenti con i nostri risultati in vitro e suggerivano che l'induzione dell'autofagia da parte di HMGB1 proteggeva le cellule mesoteliali dalla morte cellulare indotta dall'amianto.

L'HMGB1 citoplasmatico modula l'autofagia nell'HM esposto all'amianto.

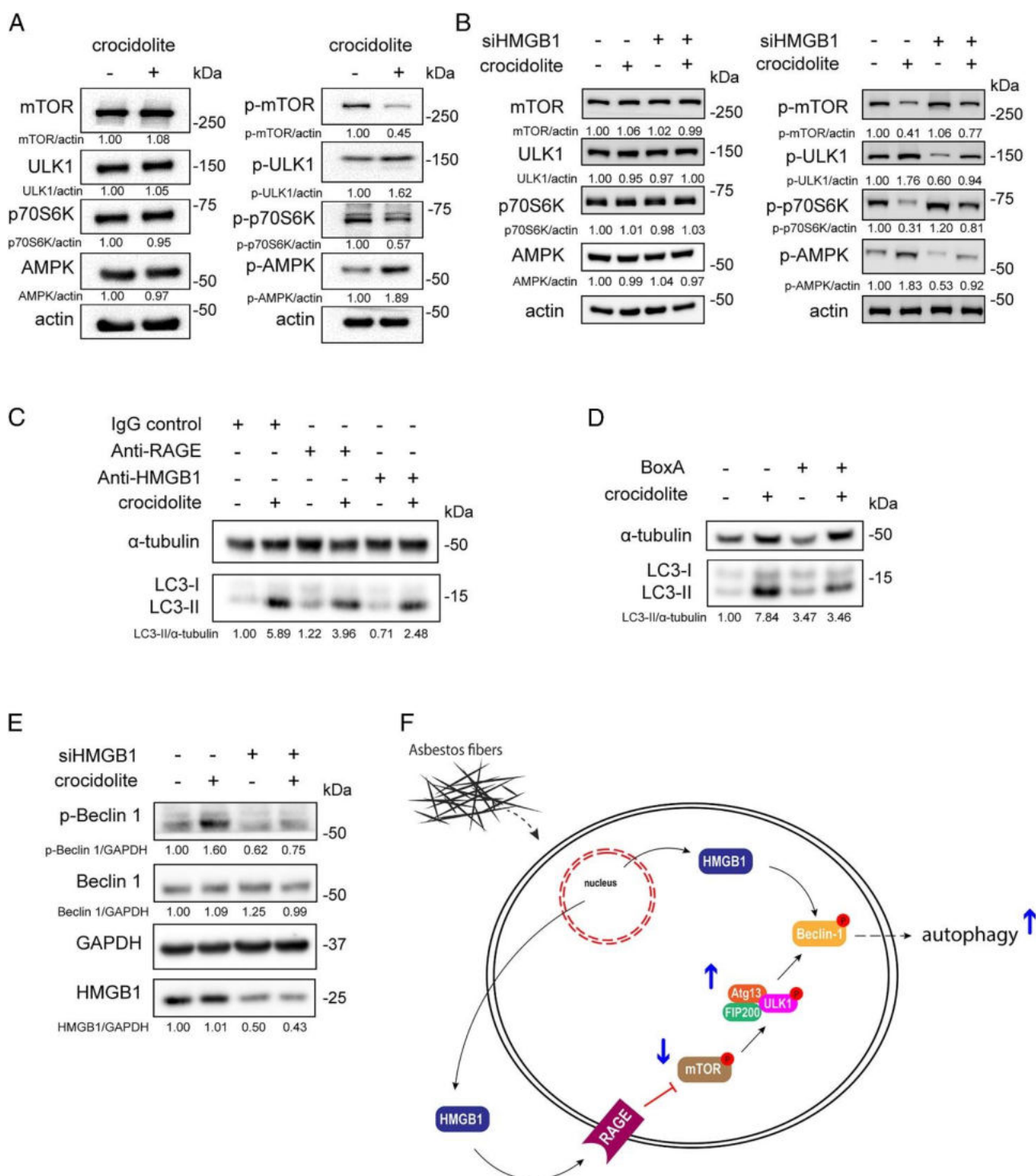
Per identificare la fonte di HMGB1 che modulava l'autofagia, abbiamo progettato e subclonato in vettori adenovirali due chimere HMGB1, Nu-HMGB1 e Cyto-HMGB1, per indurre specificamente l'espressione di HMGB1 rispettivamente nel nucleo o nel citoplasma ([Fig. 3 A](#)). Come controllo è stato utilizzato un adenovirus che esprime HMGB1 umano WT ricombinante a lunghezza intera (r-HMGB1) localizzato sia nel nucleo che nel citoplasma. Le cellule di topo HMGB1-KO sono state trasdotte con i corrispondenti costrutti di adenovirus e le localizzazioni intracellulari di HMGB1 sono state verificate mediante immunofluorescenza ([Fig. 3 B](#)). L'r-HMGB1 e due chimere sono stati utilizzati in un esperimento di salvataggio con HM, in cui gli HM sono stati prima silenziati da HMGB1 mediante un piccolo RNA interferente e quindi trasdotti con uno dei tre costrutti. Il silenziamento dell'HMGB1 ha ridotto i livelli di LC3-II (autofagia) negli HM esposti all'amianto. Questa riduzione è stata invertita in modo riproducibile in seguito alla trasduzione adenovirale delle chimere r-HMGB1 o Cyto-HMGB1, ma non di Nu-HMGB1 ([Fig. 3 C](#)). Inoltre, quando gli HM sono stati trasdotti con uno dei tre costrutti senza silenziare HMGB1, abbiamo osservato un andamento simile: in seguito all'esposizione all'amianto, gli HM trasdotti con r-HMGB1 e Cyto-HMGB1 hanno mostrato livelli di LC3-II più elevati rispetto agli HM trasdotti con Nu-HMGB1 ([Appendice SI, Fig. S6 A](#)). In sintesi, i nostri risultati indicano che l'HMGB1 citoplasmatico modula l'autofagia indotta dall'amianto. Poiché l'HMGB1 citoplasmatico viene rilasciato a livello extracellulare, abbiamo studiato se l'HMGB1 extracellulare può modulare ulteriormente l'autofagia tramite i recettori della membrana plasmatica ([20](#)).



L'HMGB1 citoplasmatico media l'autofagia indotta dall'amianto. (A) Rappresentazione schematica dei tre costrutti HMGB1. R-HMGB1: HMGB1 umano ricombinante. Nu-HMGB1: HMGB1 modificato mediante inserimento del segnale di localizzazione nucleare (NLS) del virus SV40. Cyto-HMGB1: HMGB1 recante il segnale di esportazione nucleare (NES) dell'HIV. (B) Colorazione con immunofluorescenza della linea cellulare HMGB1-KO trasdotta con uno dei tre costrutti HMGB1 designati tramite adenovirus. R-HMGB1 era presente sia nel nucleo che nel citoplasma, mentre Nu-HMGB1 poteva essere visto solo all'interno del nucleo e Cyto-HMGB1 solo all'interno del citoplasma. (Barra della scala, 50 μ m.) (C) Gli HM sono stati silenziati con siHMGB1 per 48 ore seguiti dalla trasduzione dei costrutti HMGB1 indicati per altre 24 ore prima dell'esposizione alla crocidolite. Il silenziamento di HMGB1 ha portato a una riduzione dell'autofagia indotta dalla crocidolite (LC3-II), che è stata salvata mediante trasduzione con r-HMGB1 o Cyt-HMGB1, ma non con Nu-HMGB1 (a sinistra) . Gli esperimenti di salvataggio sono stati ripetuti tre volte su diversi HM e sono state quantificate le medie di induzione dell'autofagia dopo l'esposizione alla crocidolite (a destra). Le linee centrali di ciascuna barra rappresentano i valori medi.

HMGB1 extracellulare regola l'autofagia attraverso il percorso RAGE-mTOR-ULK e la fosforilazione di Beclin 1.

L'immunoblotting ha rivelato che l'esposizione all'amianto ha promosso la fosforilazione della proteina chinasi attivata da adenosina monofosfato 5' (AMPK) e la defosforilazione di mTOR e p70S6K, che porta alla fosforilazione di ULK e all'induzione dell'autofagia. Questi risultati hanno suggerito che la via mTOR-ULK era coinvolta nell'autofagia indotta dall'amianto (Fig. 4 A). Al contrario, quando HMGB1 veniva silenziato, l'attivazione della via mTOR-ULK era marcatamente ridotta (Fig. 4 B). Tuttavia, l'autofagia mediata da mTOR-ULK non può essere completamente inibita, probabilmente a causa del silenziamento incompleto di HMGB1 (riduzione del 50% mostrata dal Western blot, Fig. 2 B). Poiché mTOR è un effettore a valle di RAGE, un recettore HMGB1 presente sulla membrana plasmatica, abbiamo ipotizzato che HMGB1 extracellulare potrebbe modulare l'autofagia indotta dall'amianto attraverso la via RAGE-mTOR-ULK. Bloccando l'interazione HMGB1-RAGE utilizzando anticorpi monoclonali RAGE o HMGB1, abbiamo ridotto l'autofagia indotta dall'amianto (Fig. 4 C). Tuttavia, l'induzione dell'autofagia da parte dell'amianto non è stata completamente abolita inibendo l'interazione RAGE-HMGB1, che abbiamo attribuito all'attività proautofagica dell'HMGB1 citoplasmatico. Di conseguenza, quando abbiamo trattato HM esposto all'amianto con BoxA, un antagonista di HMGB1 che inibisce molteplici funzioni citoplasmatiche ed extracellulari di HMGB1 e che riduce il rilascio di HMGB1 (33 – 37), abbiamo completamente soppresso l'autofagia indotta dall'amianto (Fig. 4 D). Poiché sia l'autofagia citoplasmatica mediata da HMGB1 che quella extracellulare mediata da HMGB1 convergevano sulla fosforilazione di Beclin 1 nel complesso Beclin 1/PI3K-III (21 , 38), abbiamo testato questi percorsi. Quando gli HM erano esposti all'amianto, il (p)-Beclin 1 fosforilato era sovraregolato; al contrario, quando HMGB1 è stato silenziato, p-Beclin 1 è stato significativamente ridotto, in linea con le nostre previsioni (Fig. 4 E e F).

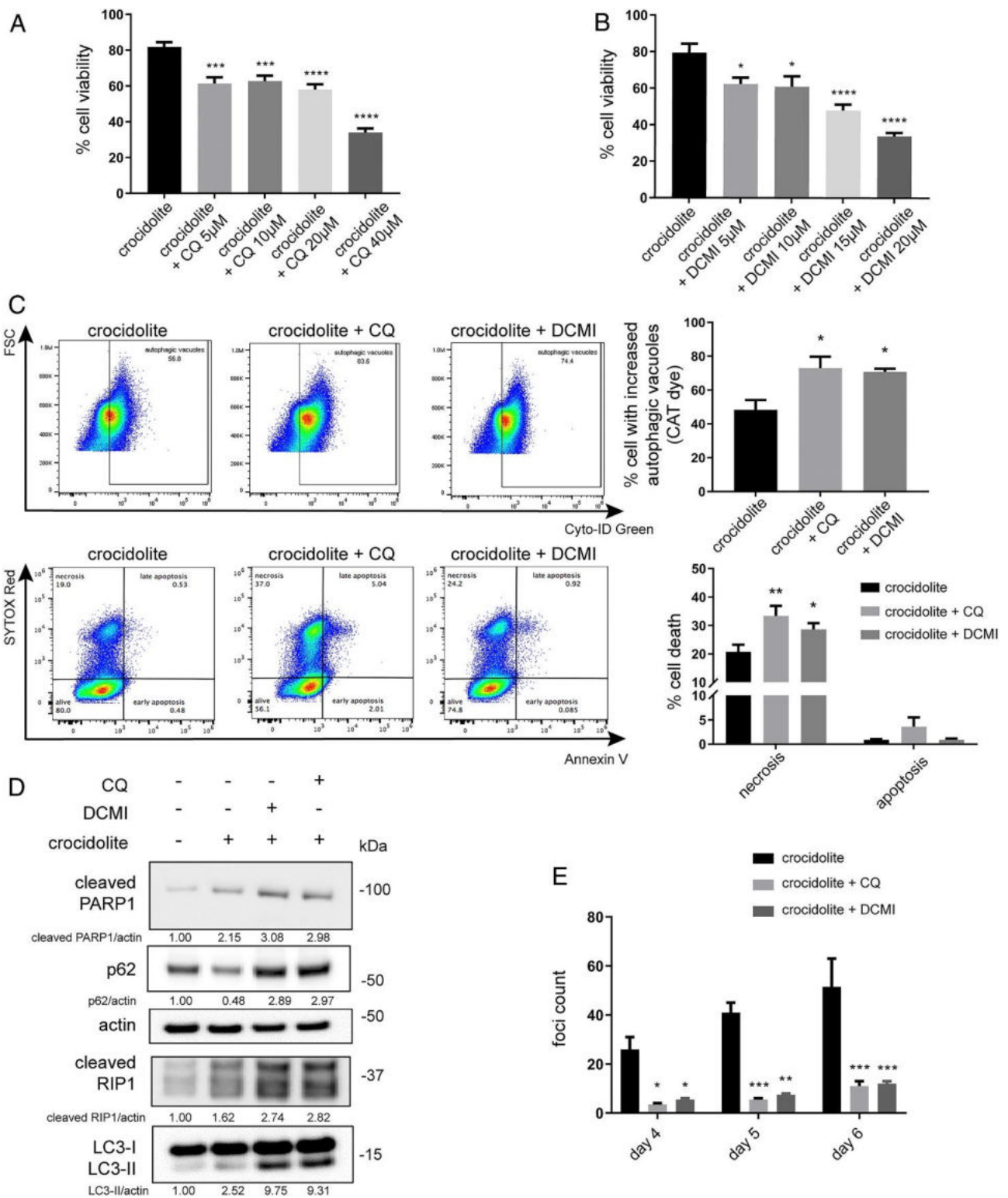


Sia l'HMGB1 citoplasmatico che quello extracellulare modulano l'autofagia indotta dall'amianto. (A) Western blot rappresentativo che mostra l'attivazione della via autofagica mTOR-ULK1 in HM dopo 48 ore di esposizione a $4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di crocidolite. La riduzione della fosforilazione di mTOR è stata accompagnata dall'iperfosforilazione di ULK1 e AMPK. Il livello di p-p70S6K, un target di mTOR, era ridotto, in linea con la diminuzione dell'attività di mTOR. (B) Il silenziamento di HMGB1 in HM ha attenuato l'attivazione di mTOR-ULK1 in seguito all'esposizione alla crocidolite. (C) Autofagia indotta dall'amianto (LC3-II) in HM trattato con controllo IgG di topo ($1,7 \mu\text{g}/\text{mL}$), anti-RAGE ($1,7 \mu\text{g}/\text{mL}$) o anti-HMGB1 ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$). I livelli di LC3-II erano parzialmente ridotti quando si utilizzavano gli anticorpi neutralizzanti contro RAGE o HMGB1. (D) Western blot rappresentativo di HM esposto a crocidolite in presenza o assenza di $100 \text{ ng}/\text{mL}$ di BoxA. BoxA ha bloccato l'aumento indotto

dalla crocidolite di LC3-II in HM. (*E*) Western blot rappresentativo di p-Beclin 1 in HM silenziato per HMGB1 e quindi esposto a crocidolite. La crocidolite ha indotto l'attivazione di Beclin 1 (p-Beclin 1), che è stata inibita quando HMGB1 è stato silenziato. (*f*) Rappresentazione schematica del percorso dell'autofagia dell'amianto-HMGB1. L'amianto ha indotto la traslocazione di HMGB1 dal nucleo al citoplasma dove HMGB1 viene rilasciato anche a livello extracellulare. L'HMGB1 extracellulare ha esercitato il suo effetto attraverso la via RAGE-mTOR-ULK, che convergeva con l'HMGB1 citoplasmatico per attivare Beclin 1 e indurre l'autofagia.

L'inibizione dell'autofagia sensibilizza l'HM alla tossicità dell'amianto e interferisce con la trasformazione cellulare.

La cloroquina (CQ) blocca il flusso autofagico ([39](#) , [40](#)). Abbiamo trattato HM con concentrazioni crescenti (5, 10, 20 e 40 μ M) di CQ per 24 ore, seguite da esposizione all'amianto per 48 ore. Il pretrattamento con CQ ha aumentato significativamente la morte cellulare indotta dall'amianto in modo dose-dipendente ([Fig. 5 A](#)). Gli antidepressivi triciclici come la clomipramina e il suo metabolita attivo desmetilclomipramina (DCMI) inibiscono la formazione di autolisosomi bloccando il flusso autofagico ([41](#) , [42](#)). Quando abbiamo confrontato gli effetti del DCMI con quello del CQ, abbiamo scoperto che, analogamente al CQ, il DCMI aumentava significativamente la citotossicità dell'HM indotta dall'amianto ([Fig. 5 B](#)). Il trattamento con CQ o DCMI da soli non era tossico per HM tranne che alle dosi più elevate ([Appendice SI](#) , [Fig. S6 B](#)).



L'inibitore dell'autofagia CQ e l'antidepressivo DCMI sensibilizzano l'HM alla tossicità dell'amianto e riducono la trasformazione dell'HM indotta dall'amianto. (*A* e *B*) I test MTS hanno rivelato che il pretrattamento con CQ (*A*) o DCMI (*B*) per 24 ore, seguito da esposizione alla crocidolite per 48 ore, riduceva la vitalità dell'HM (ANOVA, * $P < 0,05$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$). (*C*) Citometria a flusso di HM pretrattato con 10 μM di CQ o DCMI prima dell'esposizione alla crocidolite. Il trattamento concomitante con CQ o DCMI e crocidolite ha aumentato l'accumulo di vacuoli autofagici a causa dell'inibizione del flusso autofagico (*Top*). Parallelamente, abbiamo osservato un aumento della morte cellulare in seguito al cotrattamento CQ o DCMI con crocidolite (*in basso*). Vengono mostrate le

quantificazioni dell'autofagia e della morte cellulare (*in alto* e *in basso* a destra) (ANOVA, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$). (*D*) Western blot per marcatori di autofagia (LC3-II e p62), apoptosi (PARP1 scisso) e necrosi (RIP1 scisso) in HM pretrattato con CQ o DCMI prima dell'esposizione alla crocidolite. Il cotrattamento con CQ o DCMI e crocidolite ha portato ad un aumento dell'espressione sia di LC3-II che di p62, prova che il flusso autofagico era bloccato. Gli aumenti di PARP1 scisso e RIP1 scisso hanno dimostrato un aumento della morte cellulare, in linea con i risultati della citometria a flusso mostrati in *C*. (*E*) Saggio di formazione dei fuochi. Gli HM sono stati pretrattati per 24 ore con CQ o DCMI e quindi esposti a $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di crocidolite. Successivamente il terreno fresco contenente CQ o DCMI è stato sostituito ogni 48 ore. Il numero di focolai tridimensionali formati era significativamente inferiore negli HM trattati con CQ o DCMI ed esposti alla crocidolite, rispetto agli HM esposti solo alla crocidolite (ANOVA, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Abbiamo valutato l'autofagia, l'apoptosi e la necrosi mediante citometria a flusso in HM esposti all'amianto e trattati con CQ o DCMI ([43](#)). Utilizzando la sonda Cyto-ID Green, abbiamo misurato l'accumulo di vacuoli autofagici ([44](#)). Quando gli HM sono stati trattati con CQ o DCMI ed esposti all'amianto, abbiamo osservato un aumento significativo dell'accumulo di vacuoli autofagici perché questi farmaci bloccavano la fusione di autofagosomi e lisosomi (Fig. [5 C](#)). Come induttore dell'autofagia, l'amianto ha aumentato il numero di vacuoli autofagici e quando gli inibitori dell'autofagia (CQ o DCMI) sono stati aggiunti insieme all'amianto, abbiamo osservato ulteriori aumenti dei vacuoli autofagici, prova che il flusso autofagico era stato arrestato. Parallelamente, abbiamo osservato una percentuale significativamente più elevata di morte cellulare (principalmente per necrosi) negli HM esposti all'amianto e trattati con CQ o DCMI, rispetto agli HM di controllo trattati solo con amianto (Fig. [5 C](#)). Poiché sia CQ che DCMI hanno bloccato il flusso autofagico, hanno portato ad un aumento dei livelli di LC3-II e p62 ([Fig. 5 D](#)). Gli ulteriori aumenti dei livelli di LC3-II negli HM esposti ad amianto crocidolite e trattati con CQ o DCMI rispetto agli HM trattati solo con crocidolite erano coerenti con l'aumento osservato negli HM trattati con amianto e NH 4 Cl (Appendice SI, Fig. [S1 A](#)). Parallelamente, abbiamo osservato un aumento delle espressioni di PARP1 scisso (apoptosi) e RIP1 scisso (necrosi) ([Fig. 5 D](#)). Poiché CQ e DCMI, inibendo l'autofagia, hanno promosso la morte cellulare negli HM danneggiati dall'amianto, dovrebbero anche ridurre la trasformazione mediata dall'amianto. Abbiamo testato questa ipotesi in vitro utilizzando un test di formazione di fuochi tridimensionali ([7](#) , [18](#)). Abbiamo trattato gli HM con CQ o DCMI per 24 ore e li abbiamo esposti all'amianto crocidolite. Il numero di focolai era significativamente ridotto negli HM pretrattati con CQ o DCMI rispetto agli HM non trattati esposti all'amianto ([Fig. 5 E](#)). Pertanto, utilizzando gli inibitori dell'autofagia CQ e DCMI, abbiamo ridotto la trasformazione HM indotta dall'amianto.

Discussione

I meccanismi della carcinogenesi dell'amianto hanno lasciato perplessi i ricercatori per decenni ([1](#) , [45](#) , [46](#)). La carcinogenesi dell'amianto è stata collegata al rilascio di radicali mutageni dell'ossigeno ([47](#) , [48](#)) e alla secrezione di citochine e fattori di crescita che promuovono l'infiammazione cronica, l'invasione dei leucociti e il danno al DNA ([49](#)). Abbiamo dimostrato che, in seguito all'esposizione all'amianto, l'HMGB1 secreto dagli HM e dai macrofagi reattivi promuove la trasformazione maligna ([7](#) , [8](#) , [14](#)). Tuttavia, il processo molecolare responsabile dell'attività pro-oncogenica di HMGB1 rimane poco chiaro ([50](#)).

Qui riportiamo che l'esposizione all'amianto induce autofagia, che a sua volta promuove la sopravvivenza degli HM danneggiati dall'amianto. Abbiamo collegato l'autofagia alla traslocazione di HMGB1 indotta dall'amianto dal nucleo al citoplasma e allo spazio

extracellulare. Abbiamo scoperto che sia l'HMGB1 citoplasmatico che quello extracellulare, ma non l'HMGB1 nucleare, mediano l'autofagia indotta dall'amianto attraverso le vie RAGE-mTOR-ULK e p-Beclin 1. L'HMGB1 citoplasmatico può attivare p-Beclin 1 spostando Bcl-2 (21). Abbiamo scoperto che HMGB1 extracellulare contribuisce all'attivazione di p-Beclin 1 e all'autofagia attraverso il legame con il recettore della superficie cellulare RAGE, che, a sua volta, avvia un percorso a valle che culmina in un aumento dei livelli di p-Beclin 1 (Fig. 4 F). Quando abbiamo silenziato HMGB1 in HM, l'autofagia è stata inibita, mentre la frazione di HM sottoposta ad apoptosi e necrosi è aumentata. Inoltre, bloccando l'autofagia utilizzando CQ o DCMI, abbiamo ridotto significativamente la sopravvivenza degli HM danneggiati dopo l'esposizione all'amianto e, di conseguenza, abbiamo soppresso la trasformazione cellulare guidata dall'amianto.

Abbiamo sviluppato un modello murino mesoteliale HMGB1-cKO unico in cui abbiamo convalidato il ruolo dell'autofagia mediata da HMGB1. Rispetto ai topi WT, le cellule mesoteliali primarie dei topi HMGB1-cKO nella coltura dei tessuti hanno dimostrato una capacità limitata di innescare un'efficace risposta autofagica, rendendole più suscettibili alla morte cellulare indotta dall'amianto. L'amianto iniettato nella cavità peritoneale ha indotto iperplasia mesoteliale atipica sia nei topi HMGB1 WT che in quelli HMGB1-cKO. Tuttavia, nei topi WT, nelle aree di depositi di amianto, le cellule mesoteliali esprimevano alti livelli di ATG5 e bassi livelli di p62, evidenza di autofagia. Al contrario, nei topi HMGB1-cKO, le cellule mesoteliali esprimevano livelli bassi di ATG5 e l'espressione di p62 era elevata. Di conseguenza, la morte delle cellule mesoteliali era molto più evidente nei topi HMGB1-cKO rispetto ai topi di controllo HMGB1 WT.

I nostri risultati riuniscono precedenti osservazioni del nostro laboratorio e di altri ricercatori che hanno collegato l'esposizione all'amianto e lo sviluppo del mesotelioma al rilascio di HMGB1, all'attivazione dell'inflammasoma e all'infiammazione cronica (7 , 8 , 12 , 50 – 52). Da un lato, HMGB1 innescava un'infiammazione cronica, che a sua volta porta al rilascio di radicali mutageni reattivi dell'ossigeno (12). D'altra parte, e parallelamente, l'HMGB1 citoplasmatico ed extracellulare inducono l'autofagia, che consente agli HM esposti all'amianto che hanno subito danni al DNA di sopravvivere. Questi HM danneggiati dal DNA sono predisposti alla malignità che si manifesta come formazione di focolai nella coltura dei tessuti.

I nostri risultati hanno una potenziale rilevanza clinica. Innanzitutto, il rilevamento del marcatore autofagico ATG5 nei campioni di siero di individui esposti all'amianto è interessante. In studi precedenti, abbiamo dimostrato che gli individui esposti all'amianto avevano livelli sierici più elevati di HMGB1 (8 , 53), risultati probabilmente correlati all'induzione dell'autofagia qui riportata. Pertanto, i livelli di ATG5 possono essere utilizzati, da soli o in combinazione con HMGB1, come biomarcatori per l'esposizione all'amianto. Questa ipotesi deve essere convalidata in studi più ampi progettati per affrontare questa domanda. In secondo luogo, sia CQ che DCMI sono farmaci approvati dalla Food and Drug Administration: CQ è un farmaco immunosoppressore e antiparassitario che è stato utilizzato per trattare malattie autoimmuni, malaria e sperimentalmente in pazienti con COVID-19 (54). Il DCMI è un antidepressivo triciclico ampiamente utilizzato (42). Inibendo l'autofagia, sia CQ che DCMI hanno soppresso la formazione di focolai indotti dall'amianto nell'HM danneggiato dal DNA. Questi risultati suggeriscono la possibilità di riproporre CQ e DCMI come farmaci preventivi per interferire con la carcinogenesi dell'amianto. Questo approccio potrebbe essere utile per i portatori di *BAP1* e di altre mutazioni genetiche che sono più suscettibili alla carcinogenesi dell'amianto e al mesotelioma (1 , 55 – 57).

In sintesi, il nostro studio ha chiarito il meccanismo (autofagia), i mediatori (HMGB1 citoplasmatico/extracellulare) e i percorsi correlati che modulano la carcinogenesi mediata dall'amianto. I marcatori sierici autofagici e l'aumento dei livelli sierici di HMGB1 possono

essere rilevati negli individui esposti all'amianto ben prima che sviluppino tumori maligni. L'inibizione dell'autofagia riduce la trasformazione guidata dall'amianto nella coltura dei tessuti. Insieme, i nostri risultati aprono la strada per convalidare possibili biomarcatori dell'esposizione all'amianto e per testare in vivo l'ipotesi che, inibendo l'autofagia, potremmo essere in grado di ridurre l'incidenza del mesotelioma indotto dall'amianto. In effetti, il lungo periodo di latenza, compreso tra 30 e 50 anni, tra l'esposizione iniziale all'amianto e lo sviluppo del mesotelioma fornirebbe ampio tempo per l'intervento medico.

Materiali e metodi

Per materiali e metodi dettagliati, fare riferimento [all'Appendice SI](#).

Campioni umani.

Campioni di siero di 29 lavoratori con una storia di quattro o più anni di esposizione continua a fibre di amianto e di 30 controlli non esposti sono stati ottenuti da una raccolta di siero descritta in dettaglio in precedenti pubblicazioni ([58](#) , [59](#)). I donatori erano in buona salute al momento del prelievo di sangue, come valutato da una revisione delle loro cartelle cliniche. I sieri, in piccole aliquote, sono stati conservati a -80 °C fino al momento delle analisi e sono stati evitati ripetuti cicli di congelamento-scongelo. I sieri raccolti in modo anonimo sono stati codificati con indicazioni di età e sesso. Per le analisi comparative, i sieri di lavoratori esposti all'amianto e non esposti sono stati selezionati tra partecipanti con un'età mediana simile (esposti all'amianto: 65 + 8; non esposti: 54 + 12 anni + DS). Tutti i sieri provenivano da maschi. Sono stati ottenuti consensi informati scritti da tutti i partecipanti/pazienti. Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico della Regione dell'Università di Ferrara.

Livelli ATG5.

I livelli sierici di ATG5 sono stati misurati in campioni di siero umano ottenuti da lavoratori con storie di esposizione a fibre di amianto (esposti all'amianto, $n = 29$) e da partecipanti sani (non esposti, $n = 30$) ([58](#) , [59](#)). Le concentrazioni sieriche di ATG5 sono state determinate utilizzando kit di test immunoassorbenti legati a un enzima (ELISA) disponibili in commercio (My BioSource; MS7209535 per ATG5) seguendo le istruzioni del produttore precedentemente pubblicate ([60](#) , [61](#)). Per rilevare l'ATG5 nei topi, abbiamo utilizzato l'immunoistochimica ([62](#)) anziché l'ELISA perché tutti i kit disponibili in commercio per l'ATG5 non erano sufficientemente sensibili nei topi.

Culture cellulari.

Nel nostro laboratorio, stabiliamo regolarmente l'HM primario da fluidi pleurici di donatori non identificati sottoposti a toracentesi a causa di insufficienza cardiaca congestizia come descritto ([7](#) , [8](#) , [15](#)). Queste cellule possono essere coltivate in coltura per quattro o cinque passaggi prima di raggiungere la senescenza.

Topi HMGB1-cKO.

Topi mesoteliali HMGB1-cKO sono stati generati sulla base di topi floxati Hmgb1 costruiti da Tadatsugu Taniguchi, Università di Tokyo, Tokyo, Giappone ([63](#)). I dettagli sono riportati [nell'Appendice SI](#) , [Materiali e metodi SI](#) . Le cellule mesoteliali primarie del topo HMGB1-cKO sono state isolate dal peritoneo dei topi HMGB1-cKO.

Trattamenti.

Le fibre di amianto sono state manipolate e smaltite nel rispetto delle normative del nostro istituto e come precedentemente descritto ([7](#) , [8](#)). La densità delle fibre per l'esperimento in vitro era pari a 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in base ai risultati della titolazione e alla pubblicazione precedente ([47](#)); per la formazione dei fuochi, tuttavia, abbiamo utilizzato 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ in

accordo con le nostre precedenti pubblicazioni ([7](#) , [18](#)). Le cellule sono state esposte a fibre cancerogene per 48 ore se non diversamente specificato. CQ e DCMI sono stati utilizzati in vitro a 10 μ M.

Animali.

Le procedure che coinvolgono gli animali e la loro cura erano conformi alle linee guida del Comitato istituzionale per la cura e l'uso degli animali della nostra istituzione.

Rilevamento della morte cellulare/autofagia.

La morte cellulare e l'autofagia sono state rilevate con diversi metodi, tra cui citometria a flusso, Western blot e immunofluorescenza.

Disponibilità dei dati

Tutti i dati dello studio sono inclusi nell'articolo e nelle informazioni di supporto.

Ricerca e cancro | Task force Unife contro il mesotelioma pleurico maligno

01/10/2020

SCIENZA, CULTURA E RICERCA



Grazie alle sue eccezionali proprietà di resistenza al fuoco, isolamento termico ed elettrico e per la facilità di lavorazione, l'**amianto** (conosciuto anche come asbesto) è stato considerato per anni il **“materiale perfetto” per le industrie di tutto il mondo**.

Questo fino a **metà degli anni '80**, quando si è scoperto che le **fibre ottenute durante la sua lavorazione e macerazione possono essere facilmente inalate** a causa della loro grandezza infinitesimale, andare a danneggiare le cellule della pleura (cellule mesoteliali) e causare l'**insorgenza del mesotelioma pleurico maligno**, un tumore dal decorso nefasto a livello della membrana che avvolge il polmone: la **sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi del mesotelioma si ferma poco al di sotto del 20 per cento** e le **terapie convenzionali** (chirurgia, radioterapia e chemioterapia) risultano **poco efficaci** nel bloccare la progressione.

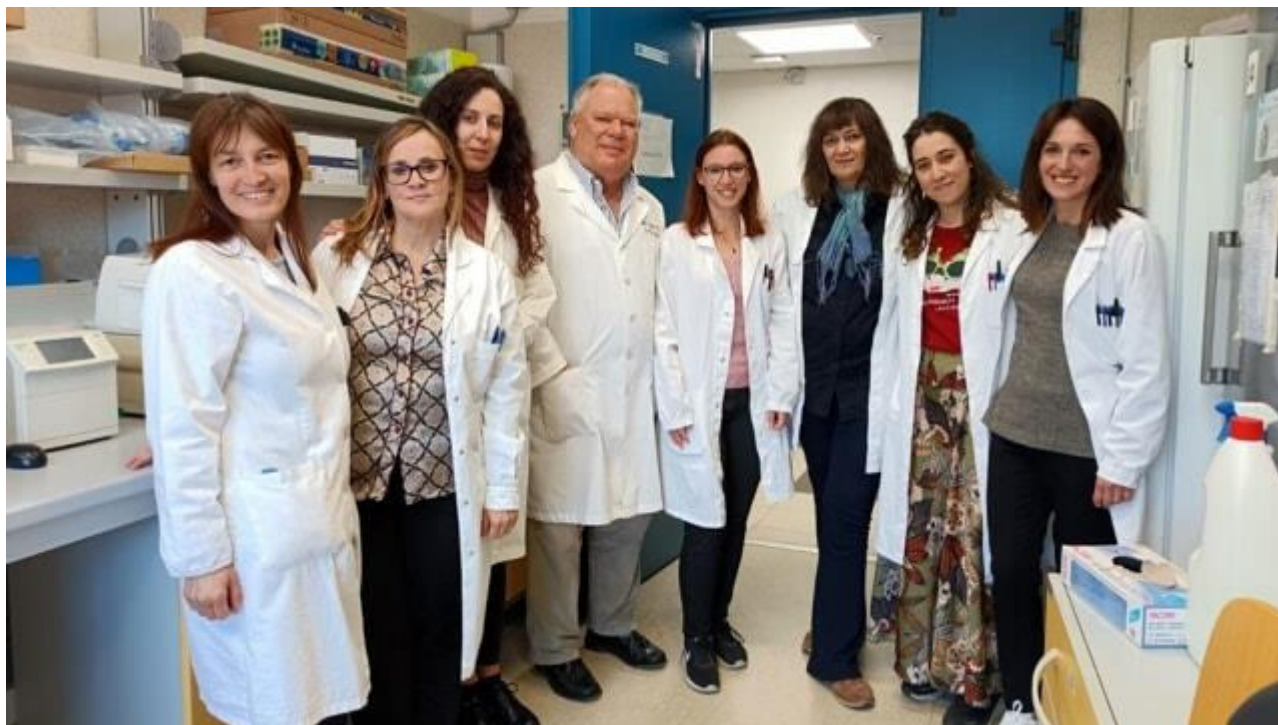
All'**Università di Ferrara** esiste una vera e propria **task force contro il mesotelioma** rappresentata dai **gruppi di ricerca** coordinati dai **Professori Paolo Pinton, Carlotta Giorgi, Mauro Tognon, Giorgio Cavallesco e Piera Boschetto** del Dipartimento di Scienze Mediche.

Studiando i meccanismi molecolari alla base del mesotelioma, i docenti **Pinton, Giorgi, Tognon** e il ricercatore Simone Patergnani in collaborazione con i **gruppi di ricerca americani** dei **Professori Michele Carbone e Haining Yang** (*Hawaii Cancer Center di Honolulu*) hanno individuato alcuni **aspetti fondamentali dell'oscuro connubio tra amianto e mesotelioma**.

I **risultati** di questo studio sono stati pubblicati oggi (1° ottobre 2020) sulla **prestigiosa rivista PNAS** (*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*) dell'Accademia delle Scienze americane comprendente diversi premi Nobel nel comitato editoriale.

Il processo di sviluppo della malattia è lungo e **passano in genere da 30 a 50 anni prima che compaia il cancro in seguito all'esposizione all'amianto**. Le fibre inalate sono **indistruttibili** e a partire dal momento del primo contatto con le cellule della pleura creano una condizione di danno che permane per anni” spiega il Prof. Paolo Pinton.

“Durante questo lungo periodo, **alcune cellule della pleura muoiono**, mentre **altre riescono a sopravvivere** - prosegue Pinton - Queste ultime, però, sono costrette a vivere in una condizione di stress e infiammazione cronica che ne causa la **trasformazione in cellule tumorali**. La nostra ricerca è riuscita ad evidenziare come uno **specifico mediatore dell'infiammazione (HMGB1)** e un **processo cellulare fondamentale per la sopravvivenza cellulare** e alla **risposta allo stress** (autofagia) **interagiscano** durante questo processo di trasformazione. I nostri studi presentano anche un interessante risvolto terapeutico. Infatti, andando a **bloccare l'attività di HMGB1 e del processo di autofagia** siamo riusciti ad **impedire la trasformazione delle cellule di mesotelio in cellule tumorali**. I risultati della nostra ricerca ci rendono molto orgogliosi e possono essere le piattaforme su cui **sviluppare una serie di terapie in grado non solo rallentare la progressione del** Questo studio – conclude il Prof. Pinton - conferma che all'interno delle mura della nostra città sia possibile fare ricerca di eccellenza e di come i nostri laboratori di ricerca siano fortemente impegnati e attivi nella ricerca contro i **mesotelioma, ma anche di prevenirne l'insorgenza**.



Una piccola molecola che circola nel sangue potrebbe diventare una 'spia' capace di predire il rischio di mesotelioma pleurico, **tumore maligno** della pleura polmonare che colpisce in maggioranza le persone esposte all'amianto.

Il gruppo di ricerca dell'**Università di Ferrara**, composto da Mauro Tognon e da Fernanda Martini del Dipartimento di Scienze Mediche, ha dimostrato che nei pazienti affetti da mesotelioma pleurico il marcatore nel siero denominato microRnr197-3p aumenta di oltre il 40% rispetto alle persone che hanno inalato le fibre di amianto.

"Statisticamente – spiega Tognon - si stima che il mesotelioma pleurico colpisca tra l'1 e il 10% delle **persone esposte all'amianto**. Al momento non è possibile diagnosticarne precocemente l'insorgenza, e per questo motivo il tumore, rilevato in fase tardiva, risulta nella maggioranza dei casi fatale".

"Possiamo ipotizzare – incalza il professore - che facendo un'analisi del siero dei lavoratori ex-esposti all'amianto, sarà possibile verificare chi avrà un aumento del livello del marcatore consentendo di indagare se il mesotelioma pleurico sta per insorgere. Tale analisi di laboratorio porterà un indubbio **beneficio** agli esposti all'amianto, soggetti più a rischio dell'insorgenza del tumore".

Indagine epigenetica sul microRNA 197-3p circolante nei sieri di pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno e di lavoratori ex esposti all'amianto

[Giulia Di Mauro](#) ^{#1}, [Francesca Frontini](#) ^{#1}, [Elena Torreggiani](#) ^{#1}, [Maria Rosa Iaquina](#) ¹, [Andrea Caselli](#) ¹, [Chiara Mazziotta](#) ¹, [Valentina](#)

Astratto

Il ruolo epigenetico dei microRNA è stabilito sia a livello fisiologico che patologico. I miRNA disregolati e i loro bersagli sembrano essere un approccio promettente per terapie antitumorali innovative. Nel nostro studio precedente, il miR-197-3p circolante è stato testato in modo disregolato nei lavoratori ex esposti all'amianto (WEA). Qui, un'indagine epigenetica su questo miRNA circolante è stata effettuata nei sieri di pazienti con mesotelioma pleurico maligno (MPM). MiR-197-3p è stato quantificato in sieri MPM (n = 75) e analizzato comparativamente con sieri WEA (n = 75) e soggetti sani (n = 75), utilizzando tecniche ddPCR e RT-qPCR. Le caratteristiche clinicopatologiche, le informazioni occupazionali e non occupazionali e la sopravvivenza globale (OS) sono state valutate in studi di correlazione. I livelli di MiR-197-3p, analizzati mediante ddPCR, erano significativamente più alti nel MPM rispetto alla coorte WEA, con una media di copie/μl rispettivamente di 981,7 e 525,01. Coerentemente, la RT-qPCR ha mostrato livelli di miR-197-3p più elevati nei sieri di MPM con una media di copie/μl di 603,7, rispetto alla WEA con 336,1 copie/μl. I dati sull'OS erano significativamente associati al sottotipo istologico e alla pleurectomia. Il miR-197-3p circolante è proposto come un nuovo potenziale biomarcatore per una diagnosi precoce dell'insorgenza del MPM. Infatti, le indagini epigenetiche del miR-197-3p insieme alla radiografia del torace, alla tomografia computerizzata e alla spirometria potrebbero fornire informazioni rilevanti utili per raggiungere una diagnosi precoce ed efficace per il MPM. I dati sull'OS erano significativamente associati al sottotipo istologico e alla pleurectomia. Il miR-197-3p circolante è proposto come un nuovo potenziale biomarcatore per una diagnosi precoce dell'insorgenza del MPM. Infatti, le indagini epigenetiche del miR-197-3p insieme alla radiografia del torace, alla tomografia computerizzata e alla spirometria potrebbero fornire informazioni rilevanti utili per raggiungere una diagnosi precoce ed efficace per il MPM. I dati sull'OS erano significativamente associati al sottotipo istologico e alla pleurectomia. Il miR-197-3p circolante è proposto come un nuovo potenziale biomarcatore per una diagnosi precoce dell'insorgenza del MPM. Infatti, le indagini epigenetiche del miR-197-3p insieme alla radiografia del torace, alla tomografia computerizzata e alla spirometria potrebbero fornire informazioni rilevanti utili per raggiungere una diagnosi precoce ed efficace per il MPM.