



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

Dipartimento di Biotecnologie Molecolari e Scienze per la Salute

Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche e Oncologia

Ciclo XXXIII

***Valutazione dei profili di metilazione del DNA per la diagnosi
del mesotelioma pleurico maligno***

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore del dottorato:

Prof. Emilio Hirsch

Presentata dal

Tutor:

Dott. Luca Bertero

Prof.ssa Paola Cassoni

Anno accademico: 2018/2019

SSD di afferenza: MED/08 – Anatomia Patologica

Sommario

Introduzione e stato dell'arte	3
Epidemiologia: incidenza e fattori di rischio	3
Diagnosi	4
Profilo molecolare	9
Fattori prognostici e predittivi.....	11
Trattamento	12
Classificazione dei tumori basata sul profilo di metilazione del DNA	12
Studio sperimentale	16
Obiettivi dello studio	16
Metodi	16
Selezione e raccolta della casistica e delle coorti di riferimento	16
Analisi del profilo di metilazione e valutazione del profilo copy number	18
Analisi statistiche	19
Risultati.....	19
Valutazione e confronto del profilo di metilazione del MPM con i profili delle altre entità neoplastiche	19
Valutazione e confronto del profilo di metilazione del MPM con i profili delle alterazioni pleuriche reattive.....	24
Valutazione e confronto complessivo del profilo di metilazione del MPM con i profili delle altre entità sia neoplastiche che reattive	27
Valutazione del potenziale diagnostico dei profili CNV.....	30
Discussione	33
Bibliografia	38

Introduzione e stato dell'arte

Epidemiologia: incidenza e fattori di rischio

Il mesotelioma maligno pleurico (MPM) è una neoplasia tipica dell'età avanzata (>60 anni) con una netta prevalenza, in termini di incidenza, nel sesso maschile (4:1). Questi dati epidemiologici sono fortemente influenzati dall'esposizione ai fattori di rischio, asbesto *in primis*, che hanno modellato nel corso del tempo l'epidemiologia di questa neoplasia portando anche a significative differenze tra le diverse regioni geografiche. In particolare, in diverse aree geografiche si sta raggiungendo in questi anni il picco di incidenza a causa della lunga latenza media tra esposizione ai fattori di rischio e sviluppo della neoplasia (30-40 anni) (Figura 1).^{1, 2} Considerata quindi la progressiva messa al bando dell'asbesto dagli anni '70 in avanti, è attesa una marcata riduzione degli effetti di tale esposizione tra il 2040 e il 2050 con significativa riduzione della differenza tra sesso maschile e femminile.³

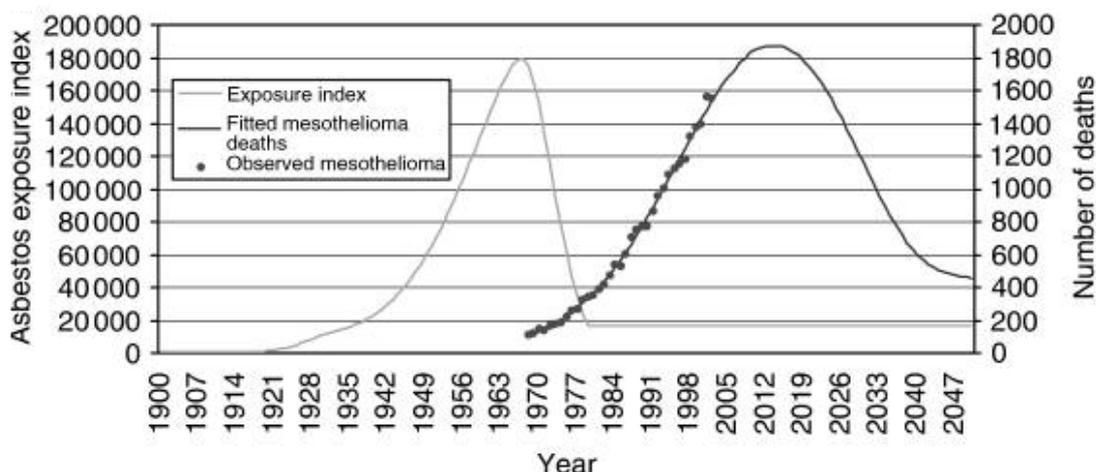


Figura 1. Decessi stimati a causa del MPM nel Regno Unito (Hodgson JT et al., Br J Cancer 2005).

Come accennato, la maggior parte dei casi di MPM sono dovuti all'esposizione a fattori di rischio specifici. Prendendo in considerazione l'asbesto, diversi elementi influenzano il rischio di sviluppare la malattia nel singolo individuo: la dose cumulativa, il tempo dalla prima esposizione e il tipo specifico di fibra a cui si è stati esposti. Le fibre di asbesto anfibole amosite e crocidolite possiedono un potere cancerogeno 2-3 superiore rispetto all'asbesto serpentino crisotilo.^{4, 5} Altri minerali sono associati allo sviluppo di MPM in specifiche aree geografiche come l'erionite.⁶

Altri fattori di rischio associati allo sviluppo di MPM sono l'esposizione a radiazioni ionizzanti, per esempio per il trattamento di un tumore mammario o di un linfoma di Hodgkin^{7,8} e anche in questo caso la latenza è di solito superiore a diversi anni.

Mutazioni germline di *BAP1* sono un fattore di rischio genetico per lo sviluppo di MPM e di altre neoplasie come il melanoma uveale, il carcinoma renale a cellule chiare e il colangiocarcinoma intraepatico, ma la percentuale complessiva di MPM dovuti a mutazioni germline di *BAP1* è stimata essere <5%.⁹⁻¹¹

Diagnosi

Il sospetto di MPM si basa inizialmente sul quadro clinico e sugli esami di imaging strumentali (TC, PET), tuttavia l'esordio di malattia è spesso insidioso e la conferma diagnostica richiede comunque un esame patologico considerato che numerose altre condizioni sia neoplastiche che non-neoplastiche possono mimare un MPM sia dal punto di vista clinico che radiologico. Il MPM può infatti presentarsi in modo subdolo con episodi irregolari di dolore pleurico accompagnato da un modesto versamento pleurico alternati a periodi anche prolungati in assenza di sintomi.

Dal punto di vista macroscopico, in fase iniziale il MPM è solitamente limitato ad un emitorace con piccoli nodi sulla superficie pleurica parietale e più raramente viscerale. Con la progressione della malattia, la neoplasia interessa progressivamente l'intera superficie pleurica incarcerando il polmone ed estendendosi lungo le scissure interlobari, le strutture mediastiniche e controlateralmente. L'interessamento diretto del peritoneo è più raro, mentre le metastasi a distanza sono frequenti in fase avanzata di malattia.¹²

Il MPM è suddiviso sulla base delle caratteristiche istopatologiche in alcune varianti principali epitelioide, sarcomatoide, bifasico e desmoplastico. Viene considerata invece un'entità a parte il mesotelioma maligno localizzato in quanto presenta un decorso clinico più favorevole e può essere curato mediante resezione chirurgica.¹³ Il MPM epitelioide rappresenta il 70-80% dei casi, il bifasico il 10-15%, il sarcomatoide <10% e il desmoplastico risulta ancora più raro (<2%).

Il MPM epitelioide è molto eterogeneo dal punto di vista istologico, anche nell'ambito di uno stesso tumore. Le caratteristiche citologiche appaiono di solito

complessivamente più blande rispetto ad un carcinoma (Figura 2), ma i possibili aspetti morfologici e pattern di crescita sono molteplici: solido, tubulopapillare e trabecolare, mentre più raramente è possibile osservare una crescita micropapillare, adenomatoide, aspetti a cellule chiare, deciduoidi e a piccole cellule. Questa variabilità morfologica rende la diagnosi di MPM problematica, nel processo di diagnosi differenziale devono infatti essere prese in considerazione numerose entità: in primo luogo, il carcinoma polmonare non a piccole cellule, ma anche metastasi di altre neoplasie. In alcuni casi può essere presente un ricco infiltrato infiammatorio che può nascondere gli elementi neoplastici e portare al sospetto di linfoma.¹⁴

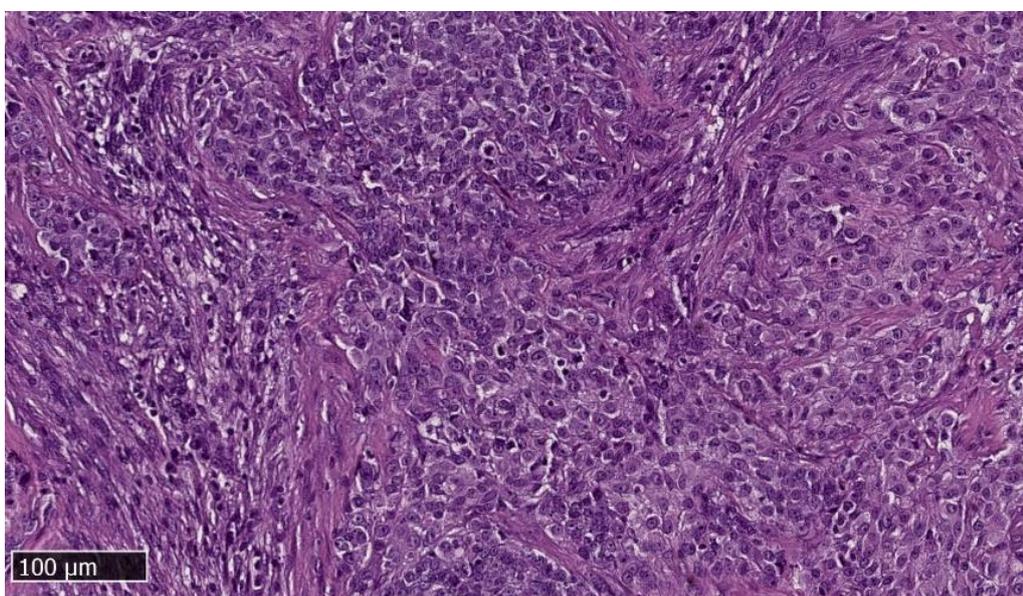


Figura 2. Esempio di MPM epitelioide con crescita prevalentemente solida (EE, 200X).

Il mesotelioma sarcomatoide è caratterizzato da cellule neoplastiche fusate di aspetto mesenchimale con crescita fascicolata o disordinata (Figura 3), mentre il sottotipo bifasico per essere definito tale deve mostrare almeno il 10% della componente minoritaria (epitelioide o sarcomatoide). Infine, la variante desmoplastica è assegnata se almeno il 50% della neoplasia presenta le cellule neoplastiche mesoteliali all'interno di una densa trama di collagene con crescita patternless.

Dal punto di vista del decorso clinico, il mesotelioma sarcomatoide è associato ad una minore incidenza di versamenti pleurici, ma sono frequentemente presenti metastasi a distanza.¹⁵ Il MPM desmoplastico mostra spesso un comportamento rapidamente aggressivo.

Le diagnosi differenziali principali in questi istotipi sono con sarcomi dei tessuti molli primitivi o metastatici della parete toracica, come ad esempio un angiosarcoma o un sarcoma sinoviale.

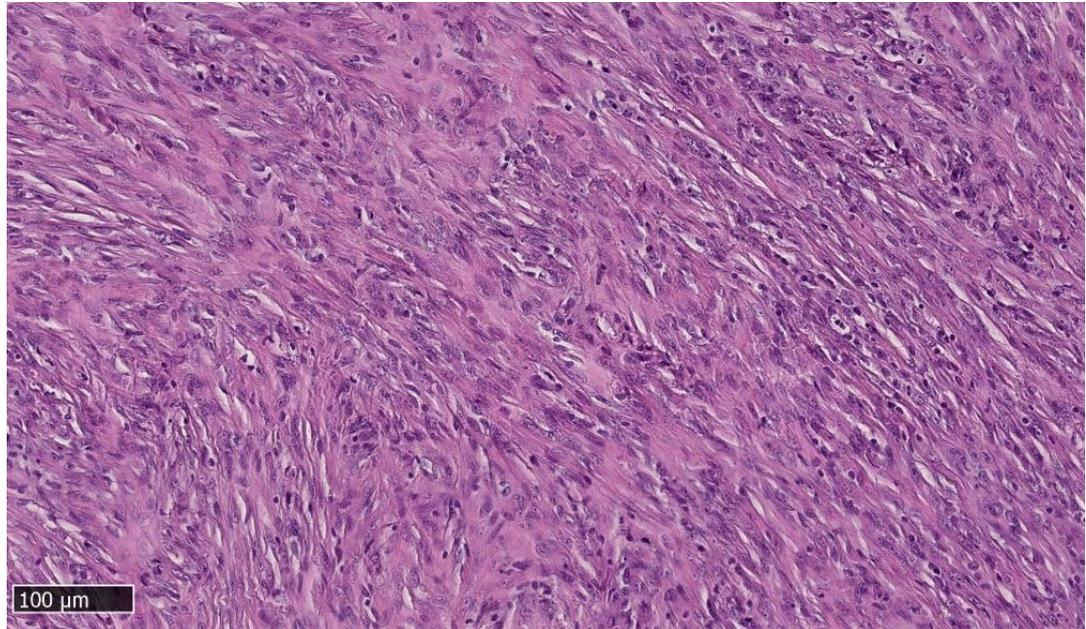


Figura 3. Esempio di MPM sarcomatoide (EE, 200X).

Dal punto di vista anatomico-patologico, la diagnosi di MPM è possibile sia mediante un esame citologico dell'eventuale versamento pleurico sia attraverso l'esame istologico di un campionamento biotico. Nel primo caso, la diagnosi è spesso difficile: le cellule neoplastiche possono apparire in modo molto variabile presentando anche solo blande atipie mentre le cellule mesoteliali sfaldate in un quadro "benigno" reattivo possono al contrario mostrare marcate atipie e mitosi. Un carcinoma polmonare rappresenta comunque la principale diagnosi differenziale. Mediante un esame citologico, inoltre, non è possibile valutare l'infiltrazione dei tessuti adiacenti, un marker diagnostico fondamentale. L'accuratezza diagnostica dell'esame citologico è quindi significativamente bassa rispetto all'esame istologico.^{16, 17}

L'esame istologico consente un insieme maggiore di valutazioni rispetto alla citologia, ma la diagnosi di MPM rimane comunque impegnativa in quanto esso essere distinto sia da altri tipi di neoplasie sia da quadri reattivi. Anche in questo caso, il MPM epitelioido deve essere in primo luogo distinto dall'adenocarcinoma polmonare. Essendo la valutazione morfologica insoddisfacente, attualmente viene consigliata la valutazione di almeno 4 marker immunoistochimici (2 attesi positivi nel mesotelioma e 2 nel

carcinoma). Una possibile combinazione spesso utilizzata nella routine diagnostica comprende calretinina, WT1, BerEP4 e CEA. Altri marker sono riportati nella Tabella 1.¹³

Tabella 1. Colorazioni immunoistochimiche utili per la diagnosi differenziale tra mesotelioma maligno epitelioide e metastasi di carcinoma (WHO 2015)

Marker mesoteliali		
Marker	Sensibilità	Specificità verso l'adenocarcinoma polmonare
Calretinina	<90%	90%-95%
CK5/6	75%-100%	80%-90%
WT1	70%-95%	~100%
D2-40	90%-100%	85%
Marker epiteliali		
Marker	Sensibilità	Specificità verso il MPM
MOC31	95%-100%	85%-98%
BerEP4	95%-100%	74%-87%
BG8 (Lewis Y)	90%-100%	93%-97%
B72.3	25%-85%	>95%
Monoclonal CEA	80%-100%	>95%

Ulteriori marcatori possono essere valutati in presenza di specifici dubbi diagnostici, ad esempio i recettori estrogenici e progestinici nel caso di diagnosi differenziale con una metastasi di carcinoma mammario o il PAX8 per distinguere il MPM da una metastasi di carcinoma renale. Anche alcuni tipi di sarcoma, come il sarcoma sinoviale o il sarcoma epitelioide, e il melanoma devono essere talvolta esclusi mediante specifici approfondimenti.¹⁸⁻²¹ Nel caso del mesotelioma sarcomatoide, la reattività per un cocktail anti-citocheratine è conservata anche in più del 90% dei casi e può quindi aiutare nella diagnosi differenziale con un sarcoma, sebbene alcuni sottotipi possano anch'essi risultare positivi, come ad esempio il sarcoma sinoviale che può anche esprimere la calretinina, rappresentando quindi un potenziale pitfall diagnostico.²²

Un secondo gruppo di entità deve essere distinto dal MPM: le patologie pleuriche reattive/benigne come l'iperplasia mesoteliale reattiva o la pleurite sclerosante. La prima condizione può svilupparsi nel contesto di numerose patologie infiammatorie e infettive e istologicamente può mimare un MPM epitelioide. Seppure molti aspetti morfologici possano essere valutati per cercare di discriminare tra iperplasia mesoteliale atipica reattiva e MPM (Tabella 2), molti aspetti, incluse la presenza di mitosi e di necrosi, non sono dirimenti. L'unico parametro efficace è l'infiltrazione dei tessuti molli della parete toracica o del parenchima polmonare, ma questo aspetto non è spesso apprezzabile nei prelievi bioptici. Un marker molecolare utile in questo setting è lo status di *CDKN2A*, valutabile mediante FISH: una delezione è spesso presente nel MPM, mentre è ovviamente assente in un tessuto reattivo.²³⁻²⁵ Tuttavia, va ricordato che questa alterazione è poco specifica essendo un marker di numerosissime entità tumorali.

Tabella 2. Criteri istologici per distinguere tra iperplasia mesoteliale atipica reattiva e mesotelioma maligno

Caratteristiche istologiche	Iperplasia mesoteliale atipica	Mesotelioma maligno
Criteri maggiori		
Invasione stromale	Assente	Presente, in particolare se profonda
Cellularità	Limitata alla superficie pleurica	Densa, con reazione stromale
Papille	Semplici, rivestite da un singolo strato cellulare	Complesse, rivestite da cellule stratificate
Pattern di crescita	Superficiale	In nodi, con pattern complesso e disorganizzato
“Zonation”	Diminuzione della cellularità dall'effusione alla parete toracica	Assente progressiva riduzione, con anzi spesso un incremento della cellularità
Vascularizzazione	Capillari perpendicolari alla superficie	Irregolari e con disposizione casuale
Criteri minori		

Atipie citologiche	Limitate alle aree di effusione	Possono presenti in qualsiasi area, ma spesso molte cellule appaiono relativamente monomorfe e prive di significative atipie
Necrosi	Rara, mentre può essere presente nel materiale essudato	Di solito è un segno in favore della diagnosi di mesotelioma
Mitosi	Possono essere numerose	Nella maggior parte dei casi sono rare (tuttavia le mitosi atipiche orientano in senso neoplastico).

Nel complesso, si può quindi dire che la diagnosi di MPM è impegnativa anche per patologi esperti e non sempre è possibile giungere ad un giudizio dirimente nonostante le numerose linee guida e raccomandazioni pubblicate sino ad oggi.^{16, 17}

Profilo molecolare

Alcune alterazioni molecolari specifiche, caratteristiche del mesotelioma sono note da anni, mentre più recentemente si è cercato di effettuare una valutazione più sistematica del profilo molecolare del MPM.

In generale, il MPM è caratterizzato dalla prevalenza di delezione di geni o di parti di cromosomi piuttosto che dalla presenza di gain o amplificazioni. Questo aspetto si traduce in un'oncogenesi prevalentemente dipendente dalla perdita di geni oncosoppressori. I cromosomi più frequentemente coinvolti in queste delezioni sono 1p, 3p, 4q, 6q, 9p, 13q, 14q e 22q, mentre i geni più frequentemente coinvolti sono *NF2*, *CDKN2A/B* e *BAP1*.²⁶⁻²⁸

La delezione, spesso in omozigosi, del locus 9p21 è la più frequente alterazione genetica del MPM e comporta la delezione di *CDKN2A* spesso associata a quella di *CDKN2B* e *MTAP*. Questo hallmark molecolare interessa percentuali anche superiori all'80% dei casi di MPM e nel mesotelioma sarcomatoide è praticamente sempre riscontrato.²⁹

CDKN2A/B sono geni oncosoppressori che codificano per proteine inibitrici di chinasi ciclina-dipendenti coinvolte nel pathway Rb e che regolano il ciclo cellulare durante la fase G1/S. In particolare, *CDKN2A* porta alla produzione di p16^{INK4a} e, attraverso una cornice di lettura alternativa, di p14^{ARF}. La perdita di quest'ultima proteina porta alla destabilizzazione di p53 con la sua conseguente perdita funzionale, questa osservazione giustifica il basso tasso di mutazioni di p53 riscontrato nel MPM. Meccanismi alternativi di perdita di *CDKN2A* sono l'ipermetilazione del promotore o attraverso mutazioni puntiformi.³⁰

Le alterazioni di *NF2*, gene localizzato sul cromosoma 22q12.1, sono invece state tra le prime ad essere identificate nel MPM. Nella maggior parte dei casi si tratta di delezioni e/o mutazioni nonsense/missense. Le mutazioni sono nel complesso più rare, rappresentando circa il 20% delle alterazioni.³¹⁻³³ Le alterazioni di *NF2* non sono risultate associate né ad uno specifico sottotipo di mesotelioma né con la prognosi. Dal punto di vista funzionale, la merlina o neurofibromina 2, il prodotto del gene *NF2*, è una proteina di membrana associata al citoscheletro coinvolta in diversi pathway di segnalazione, inclusi mTOR e Hippo. La sua perdita è risultata associata all'attivazione di questi pathway e al comportamento invasivo, alla crescita e alla sopravvivenza delle cellule di MPM.³⁴⁻³⁸

Sebbene, le alterazioni di *CDKN2A/B* e *NF2* siano così frequenti nel MPM, va ricordato che esse sono condivise da un grande numero di neoplasie limitando il loro utilizzo come marker diagnostici.³⁹

Una percentuale elevata di MPM, pari a circa il 50%, presenta la perdita di *BAP1* attraverso meccanismi variabili (delezioni, mutazioni puntiformi o inserzioni); in particolare, mutazioni somatiche sono presenti nel 20%-30% dei casi. Questa alterazione è risultata essere preferenzialmente associata al MPM epitelioide, mentre non sono state osservate associazioni con le alterazioni di *CDKN2A* o *NF2*.^{33, 40, 41} *BAP1* è una deubiquitinasi nucleare che regola l'attività di specifici fattori di trascrizione, la modificazione della cromatina e la riparazione delle rotture del DNA a doppio filamento. Due ulteriori geni che risultano alterati nel MPM sono *LATS1* e *LATS2*; la perdita di questi geni porta ad una attivazione del pathway di segnalazione Hippo attraverso YAP1.^{37, 42,}

⁴³ Non sono state osservate chiare associazioni tra la mutazione di questi geni e i diversi sottotipi istologici di MPM o la prognosi. Un'altra possibile alterazione, la mutazione del promotore di *TERT*, è stata osservata preferenzialmente nel mesotelioma sarcomatoide.⁴⁴

Infine, è stata recentemente effettuata una valutazione integrata del profilo molecolare di una casistica di 74 MPM identificando un nuovo sottotipo caratterizzato dalle mutazioni di *TP53* e *SETDB1* e da una quasi-aploidizzazione genomica.⁴⁵ Inoltre, si conferma il basso mutational burden complessivo e l'alta incidenza di copy number variation come precedentemente descritto. Questo lavoro rappresenta probabilmente la più completa, ad oggi, caratterizzazione molecolare del MPM sebbene abbia preso in considerazione prevalentemente l'istotipo epitelioide (70% della casistica).

Fattori prognostici e predittivi

Seppure rimanga limitata, alcune caratteristiche associate ad una sopravvivenza mediana migliore sono un'età più giovane, l'istotipo epitelioide (*versus* il sarcomatoide e il bifasico) e uno stadio TNM inferiore.⁴⁶⁻⁴⁸

Dal punto di vista istopatologico, sono stati proposti alcuni sistemi di grading che prevedono la valutazione dell'istotipo, del grado di atipia nucleare, della conta mitotica, della necrosi e dell'indice di proliferazione (valutato mediante colorazione immunohistochimica anti-Ki67),^{49, 50} mentre, prendendo in considerazione le caratteristiche molecolari, è stato possibile identificare alcuni cluster prognosticamente rilevanti integrando i dati ottenuti mediante multiple piattaforme di analisi.⁴⁵

Recentemente, è stata anche riscontrata la frequente espressione da parte del MPM di marker rilevanti per il trattamento immunoterapico come VISTA (V-domain Ig suppressor of T cell activation), osservazioni come questa potrebbero consentire lo sviluppo di farmaci immunoterapici specifici come già avvenuto per molte altre neoplasie.⁴⁵ Un altro marker, la delezione di *MTAP* in associazione a quella di *CDKN2A/B* sembrerebbe essere associata ad una compromissione metabolica sensibile agli inibitori dell'arginina metiltransferasi PRMT5.^{51, 52}

Trattamento

Sinteticamente, il trattamento del MPM è principalmente influenzato dall'età, dalle condizioni cliniche del paziente, dall'istotipo e dallo stadio di malattia. In circa il 20% dei pazienti è proponibile una chirurgia con l'obiettivo della resezione macroscopica completa associata a chemioterapia (pemetrexed più cisplatino/carboplatino) e/o radioterapia per migliorare il controllo locale e sistemico.⁵³ Nei casi in cui non vi sia indicazione al trattamento chirurgico, viene solitamente proposta la chemioterapia o la migliore terapia di supporto possibile in base al quadro clinico complessivo e anche ai desideri del paziente.

Classificazione dei tumori basata sul profilo di metilazione del DNA

Negli ultimi anni, è stata esplorata la possibilità di utilizzare la valutazione del profilo genome-wide di metilazione del DNA per la classificazione e la diagnosi delle diverse entità tumorali. Il razionale di tale approccio è basato sul fatto che i cambiamenti epigenetici non sono solo il meccanismo biologico attraverso cui ogni singola cellula si differenzia e acquisisce funzioni specifiche (presentando quindi un profilo specifico per ogni tipo di tessuto), ma sono anche influenzati dagli specifici eventi oncogenetici che portano allo sviluppo di un tumore (Figura 4). L'analisi del profilo epigenetico appare quindi come un approccio ottimale per la classificazione delle diverse neoplasie, essendo in grado di ricapitolare sia gli aspetti di differenziazione del tessuto tumorale

(normalmente valutati morfologicamente ed immunofenotipicamente dal patologo) che i cambiamenti indotti dagli specifici eventi molecolari oncogenetici.

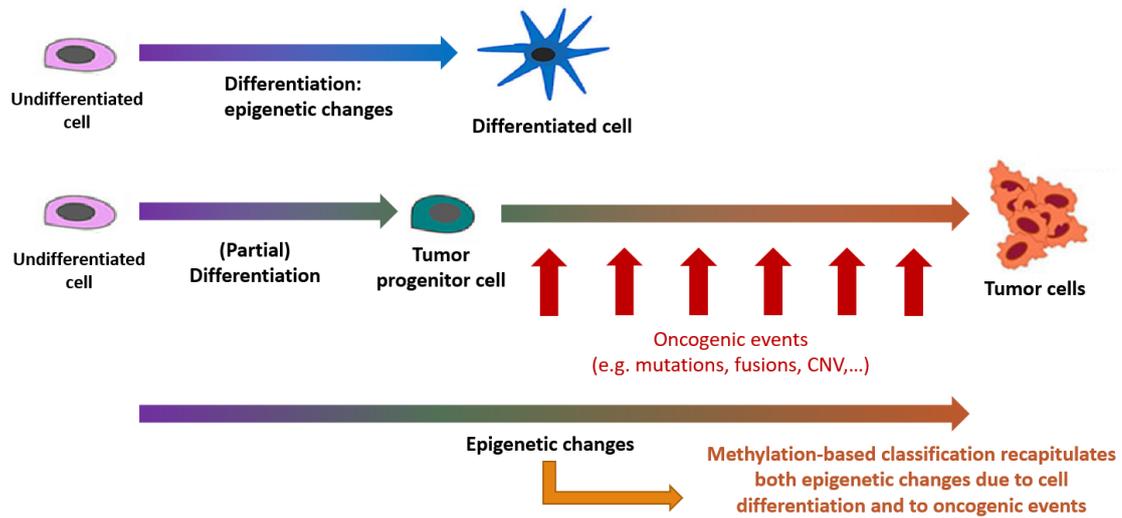


Figura 4. Rappresentazione schematica del razionale alla base dell'utilizzo della classificazione basata sul profilo di metilazione del DNA per la classificazione e la diagnosi oncologica.

Questa strategia è stata quindi applicata con successo alla classificazione dei tumori del sistema nervoso centrale (SNC).⁵⁴ La valutazione del profilo di metilazione ha consentito di definire classi di metilazione corrispondenti alla maggior parte delle entità tumorali previste dalla più recente classificazione WHO dei tumori del SNC (Figura 5).

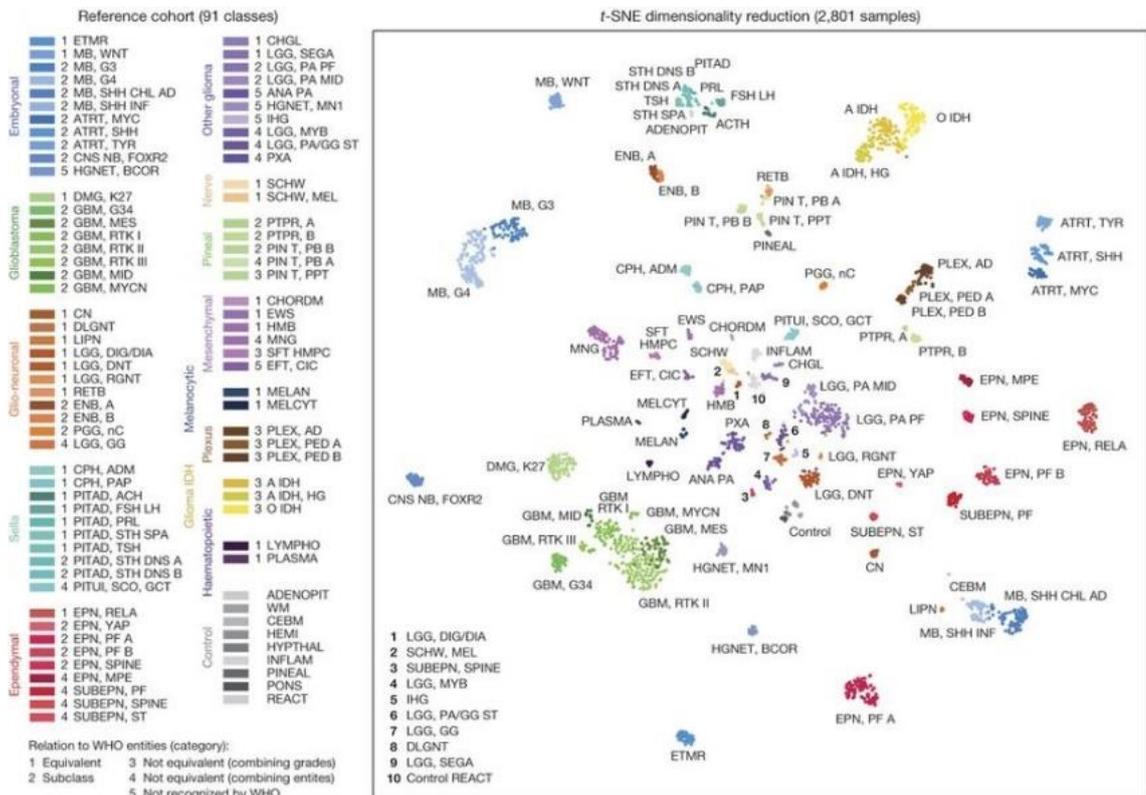


Figura 5. Entità tumorali del SNC valutate per la validazione del classificatore dei tumori del SNC basato sul profilo di metilazione del DNA

In fase di validazione, questo strumento ha consentito di assegnare una specifica classe di metilazione all'88% dei casi analizzati e ha permesso di identificare nuove entità diagnostiche (Figura 6). Esso viene pertanto attualmente considerato uno strumento diagnostico avanzato ed efficace per la diagnosi dei tumori del SNC, in particolare pediatrici.

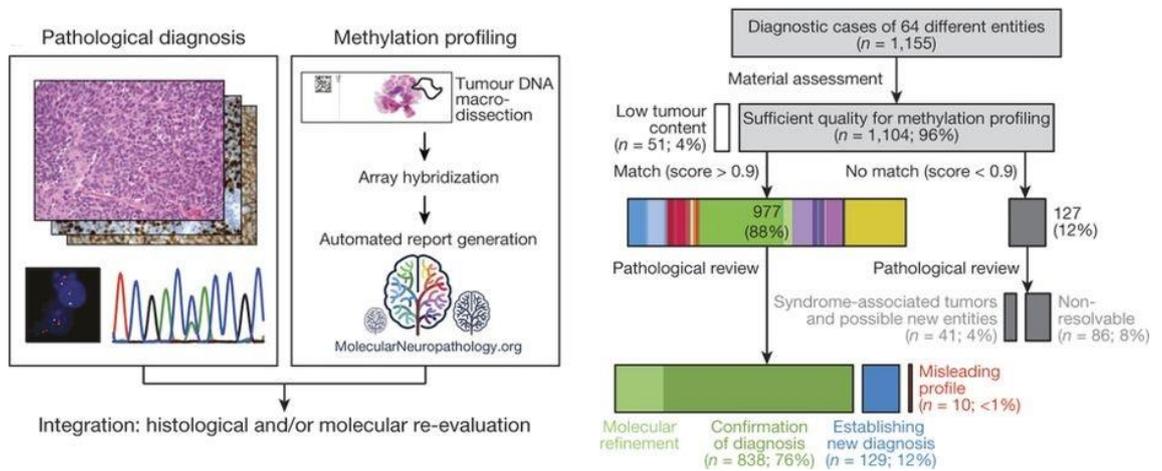


Figura 6. Risultati della validazione della classificazione basata sul profilo di metilazione del DNA applicata ai tumori del SNC.

Considerata l'efficacia di questo approccio, si sta ora valutando la sua applicazione a diversi ambiti della diagnostica oncologica.^{55, 56} In particolare, esso appare uno strumento ideale come supporto alla diagnosi di entità difficili che pongono significativi problemi di diagnosi differenziale, proprio come il MPM.

Studio sperimentale

Obiettivi dello studio

L'obiettivo dello studio è stato quindi quello di valutare l'efficacia della valutazione dei profili di metilazione del DNA per la diagnosi del MPM (Figura 7). Le specifiche domande a cui si è voluto rispondere mediante questo studio sono state: 1) il MPM possiede un profilo di metilazione caratteristico identificabile mediante un'analisi metilazione genome-wide?; 2) questo profilo è specifico e consente quindi di distinguere il MPM dai potenziali mimi istologici?

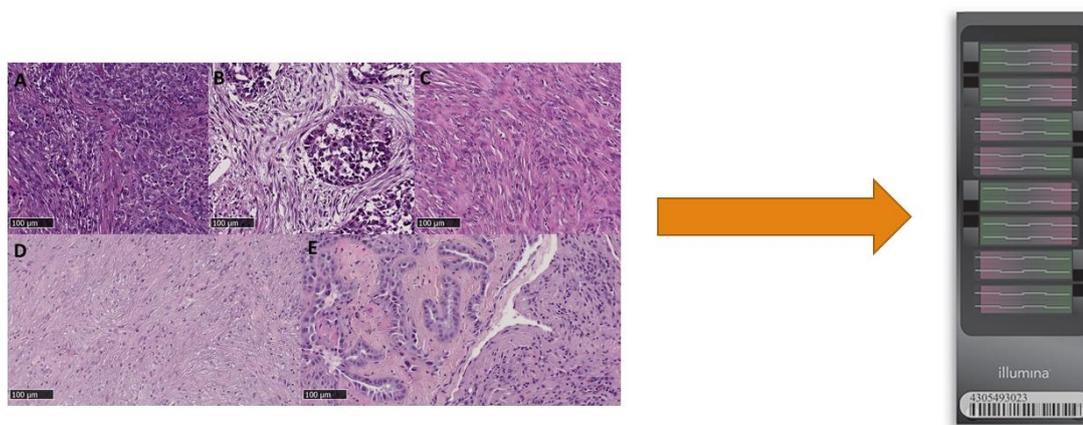


Figura 7. Obiettivo principale dello studio: ricapitolare la diagnostica tradizionale istopatologica del MPM mediante la classificazione basata sulla valutazione del profilo di metilazione genome-wide.

Considerata la possibilità di derivare un profilo CNV dai dati ottenuti mediante gli array di metilazione, un ulteriore obiettivo è stato quello di valutare l'utilità di queste informazioni aggiuntive dal punto di vista diagnostico.

Metodi

Selezione e raccolta della casistica e delle coorti di riferimento

I casi di MPM (n=34) oggetto di analisi nel presente studio sono stati raccolti in modo retrospettivo presso le strutture di Anatomia Patologica dell'AOU Città della Salute e della Scienza di Torino e l'AOU San Luigi Gonzaga di Orbassano. La selezione dei casi è stata bilanciata in modo da avere una serie rappresentativa di tutti i principali istotipi di

MPM: mesotelioma epitelioide (n=10), mesotelioma bifasico (n=12) e mesotelioma sarcomatoide (n=12). I dati relativi all'outcome dei pazienti (sopravvivenza globale) sono stati recuperate dalle cartelle cliniche informatizzate. Presso le stesse istituzioni sono stati raccolti un insieme di casi di alterazioni pleuriche reattive [fibrosi pleurica sclerosante (FP) (n=10) e iperplasia mesoteliale reattiva (RMH) (n=12)], campionate durante il percorso diagnostico di patologie infiammatorie o durante resezioni di malformazioni polmonari bollose. Tali campioni sono stati raccolti per poter comparare il profilo del MPM con quello delle condizioni reattive/benigne il cui reperto istopatologico può mimare il MPM.

Sono state quindi esaminate le sezioni colorate mediante ematossilina-eosina relative ai casi selezionate. Aree rappresentative dei diversi campioni sono quindi state selezionate ai fini dell'estrazione del DNA: aree di 3 mm di diametro sono state prelevate dal blocchetto di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (FFPE) mediante aghi da biopsia punch. In alternativa, sezioni seriate sono state tagliate dal blocchetto e le aree rappresentative precedentemente selezionate sono state macrodisettate.

Per confrontare il MPM con un ampio insieme di potenziali diagnosi differenziali in ambito neoplastico, sono stati selezionati 160 casi rappresentativi delle seguenti entità neoplastiche: tumori fibrosi solitari (SFT) (n=20), sarcomi sinoviali (SYSA) (n=30), leiomiomasarcomi (LMS) (n=20), angiosarcomi (AS) (n=20), casi di fascite nodulare (NFA) (n=10), casi di fibromatosi tipo-desmoide (DTFM) (n=10), sarcomi epitelioidi (ES) (n=20), carcinomi polmonari non di piccole cellule (NSCLC) (n=10) e melanomi (Mela) (n=20). I profili molecolari di questi casi sono stati quindi estratti dalla databank del Dipartimento di Neuropatologia dell'Università così come già riportato per precedenti studi.^{55, 56}

Il presente studio è stato condotto in accordo con il Codice Etico della World Medical Association (Dichiarazione di Helsinki) per gli esperimenti che coinvolgano esseri umani e seguendo le norme stabilite dal comitato etico per la ricerca dell'Università di Torino. Considerata la natura retrospettiva della ricerca e che non avrebbe avuto alcun effetto sul percorso di cura dei pazienti, non è stato richiesto uno specifico consenso informato scritto.

Analisi del profilo di metilazione e valutazione del profilo copy number

I campioni di tessuto FFPE sono stati deparaffinati e il DNA è stato estratto usando il kit Maxwell 16 FFPE Plus LEV DNA (Promega Corporation, Madison, WI, USA) secondo i protocolli forniti dal produttore. La quantità di DNA è stata valutata mediante Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Circa 250 ng di DNA genomico sono stati processati per le successive analisi di metilazione. La conversione mediante bisolfiti è stata eseguita con il kit Zymo EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research Irvine, USA) seguito da purificazione con Zymo DNA Clean Kit (Zymo Research Irvine, CA, USA). DNA è stato quindi sottoposto a trattamento con il kit Infinium HD FFPE Restore Kit (Illumina, San Diego, CA, USA) prima dell'ibridazione con i BeadChip.

Il profilo di metilazione genomico dei casi di MPM, FP e RMH è stato valutato mediante BeadChip Illumina Infinium MethylationEPIC (Illumina, San Diego). Le coorti di riferimento erano invece state analizzate in parte con BeadChip Illumina Infinium MethylationEPIC e in parte con Illumina Infinium Human Methylation 450K (Illumina, San Diego). Dopo il processo di ibridazione i chip sono stati scannerizzati con lo strumento iScan (Illumina, San Diego).

I dati di metilazione del DNA sono stati processati utilizzando il package Bioconductor minfi per R come descritto in precedenza.⁵⁷ Un clustering gerarchico non-supervisionato è stato eseguito usando i valori-beta delle sonde con la maggiore differenza in termini di metilazione come misurato in termini di deviazione assoluta media. Sono stati valutati set di sonde di diversa numerosità (range: 10.000-25.000) usando il metodo di Ward di minimizzazione della varianza e una distanza euclidea.⁵⁸ Sono state eseguite inoltre analisi delle classi di metilazione mediante un approccio t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) (20,000 sonde CpG, 5-10 perplessità and 3,000 iterazioni).⁵⁹

I profili delle variazioni copy number (CNV) sono stati generati utilizzando i dati ottenuti mediante gli array di metilazione mediante il package R Bioconductor conumee (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/conumee.html>). I livelli euploidi sono stati determinati basandosi sui polimorfismi a singolo nucleotide inclusi nei BeadChip di analisi. I risultati CNV così ottenuti sono quindi stati interpretati anche con l'utilizzo del software Integrated Genomics Viewer (IGV, Broad Institute, Cambridge, MA, USA).

Analisi statistiche

Le analisi statistiche sono state eseguite con il software Stata/MP 15.0 (StataCorp, College Station, TX, USA). La sopravvivenza globale (OS) è stata definita come l'intervallo dalla diagnosi iniziale al decesso con il tempo censurato in corrispondenza dell'ultimo follow-up disponibile.

Risultati

Valutazione e confronto del profilo di metilazione del MPM con i profili delle altre entità neoplastiche

Sono stati raccolti 34 casi di MPM comprendenti 10 (29,4%) mesoteliomi epitelioidi, 12 (35,3%) mesoteliomi bifasici e 12 (35,3%) mesoteliomi sarcomatoidi. Nella Tabella 3 sono riportate le principali caratteristiche clinico-patologiche. La maggior parte dei pazienti erano di sesso maschile (27/34, 79%), mentre l'età mediana era di 70 anni (range: 51-86 anni). Al momento dell'inclusione nello studio, 29/34 (85%) pazienti risultavano deceduti e la sopravvivenza globale è risultata pari a 10 mesi (range: 1-33 mesi).

Riguardo le caratteristiche dei campioni in esame, il contenuto di cellule tumorali è risultato compreso tra il 30% e il 90% (mediana: 90%). Un caso di mesotelioma sarcomatoide è stato escluso dall'analisi a causa di una estrazione insufficiente di DNA.

Tabella 3. Caratteristiche clinico-patologiche della serie di MPM.

ID	ID DNA tumorale	Diagnosi istopatologica	Genere	Età (anni)	Status	Sopravvivenza globale o tempo di follow-up (mesi)	Concentrazione di cellule tumorali (%)	Note
1	129946	MPM bifasico	M	70	V	10	90	
2	129948	MPM bifasico	M	51	D	21	90	
3	129950	MPM bifasico	M	57	D	10	90	
4	129956	MPM epitelioide	F	74	D	4	70	
5	129958	MPM epitelioide	M	73	D	20	80	
6	129960	MPM epitelioide	M	66	V	33	90	
7	129962	MPM bifasico	F	58	D	16	90	
8	129964	MPM bifasico	M	65	D	14	40	
9	129966	MPM epitelioide	M	71	D	5	80	
10	129968	MPM sarcomatoide	F	68	D	5	70	
11	129970	MPM epitelioide	M	71	D	12	90	
12	129972	MPM epitelioide	F	75	V	10	90	
13	129974	MPM bifasico	M	63	D	10	80	
14	129976	MPM epitelioide	M	75	V	12	50	
15	129978	MPM epitelioide	M	83	V	16	60	
16	129980	MPM epitelioide	M	60	D	11	30	
17	129982	MPM bifasico	M	59	D	11	90	
18	129984	MPM epitelioide	M	70	D	13	60	
19	129986	MPM sarcomatoide	M	55	D	3	90	
20	129988	MPM sarcomatoide	F	76	D	9	90	
21	129990	MPM sarcomatoide	M	74	D	1	80	
22	129996	MPM sarcomatoide	M	86	D	1	70	

23	130336	MPM sarcomatoide	M	71	D	4	90	
24	130000	MPM sarcomatoide	M	73	D	3	70	Non analizzabile (insufficiente concentrazione DNA)
25	130002	MPM sarcomatoide	M	75	D	8	90	
26	130016	MPM sarcomatoide	M	60	D	5	50	
27	130018	MPM bifasico	F	63	D	17	90	
28	130020	MPM bifasico	M	66	D	27	80	
29	130022	MPM bifasico	M	54	D	6	90	
30	141072	MPM sarcomatoide	M	69	D	6	80	
31	140980	MPM sarcomatoide	M	67	D	1	90	
32	140982	MPM sarcomatoide	M	79	D	5	90	
33	140984	MPM bifasico	F	73	D	3	90	
34	140986	MPM bifasico	M	71	D	18	90	

F: femmina; M: maschio; A: vivente; D: deceduto.

Il clustering gerarchico non supervisionato ha mostrato che i MPM, indipendentemente dal sottotipo istologico, formano un cluster di metilazione ben definito (Figura 8); un solo caso di mesotelioma bifasico è risultato essere raggruppato con il cluster del sarcoma epitelioide mediante questa analisi. Al contrario, mediante analisi t-SNE tutti i casi di MPM hanno formato un gruppo univoco e differente dalle altre neoplasie (Figura 9) le quali hanno anch'esse formato gruppi specifici per entità.

Questi risultati mostrano che l'analisi di metilazione genome-wide è in grado di distinguere il MPM dalle altre entità tumorali che possono insorgere in questa specifica sede anatomica.

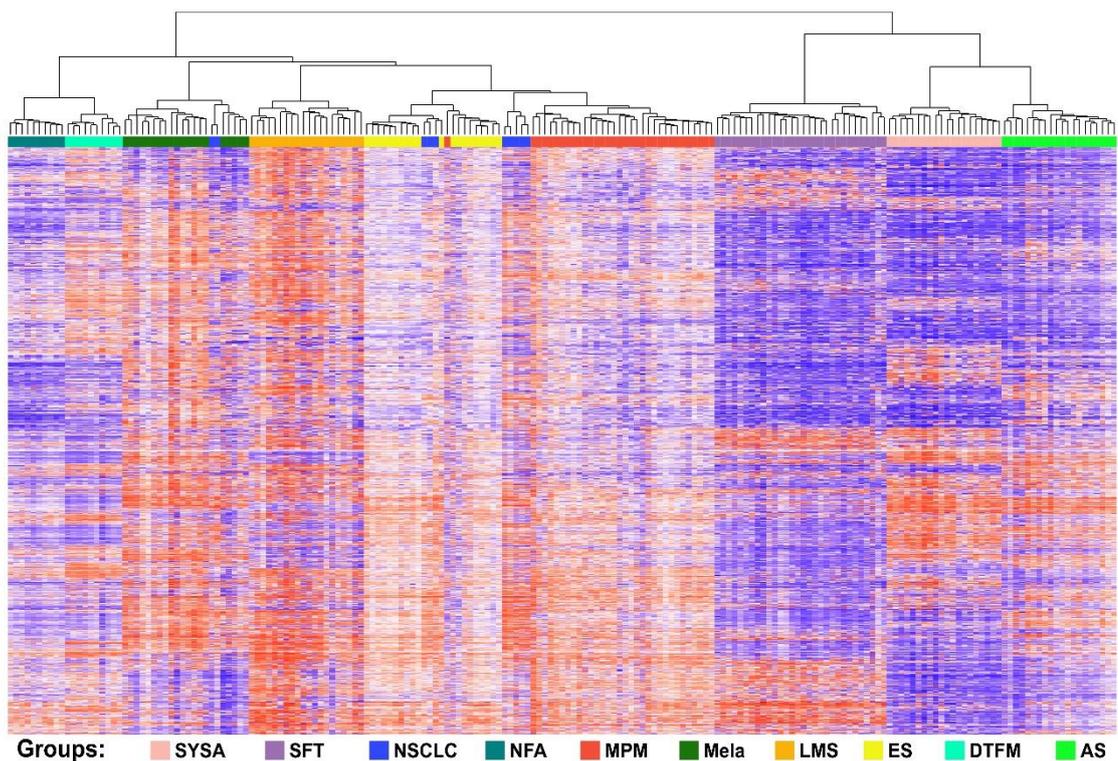


Figura 8. Analisi clustering del MPM e delle possibili diagnosi differenziali in ambito neoplastico.

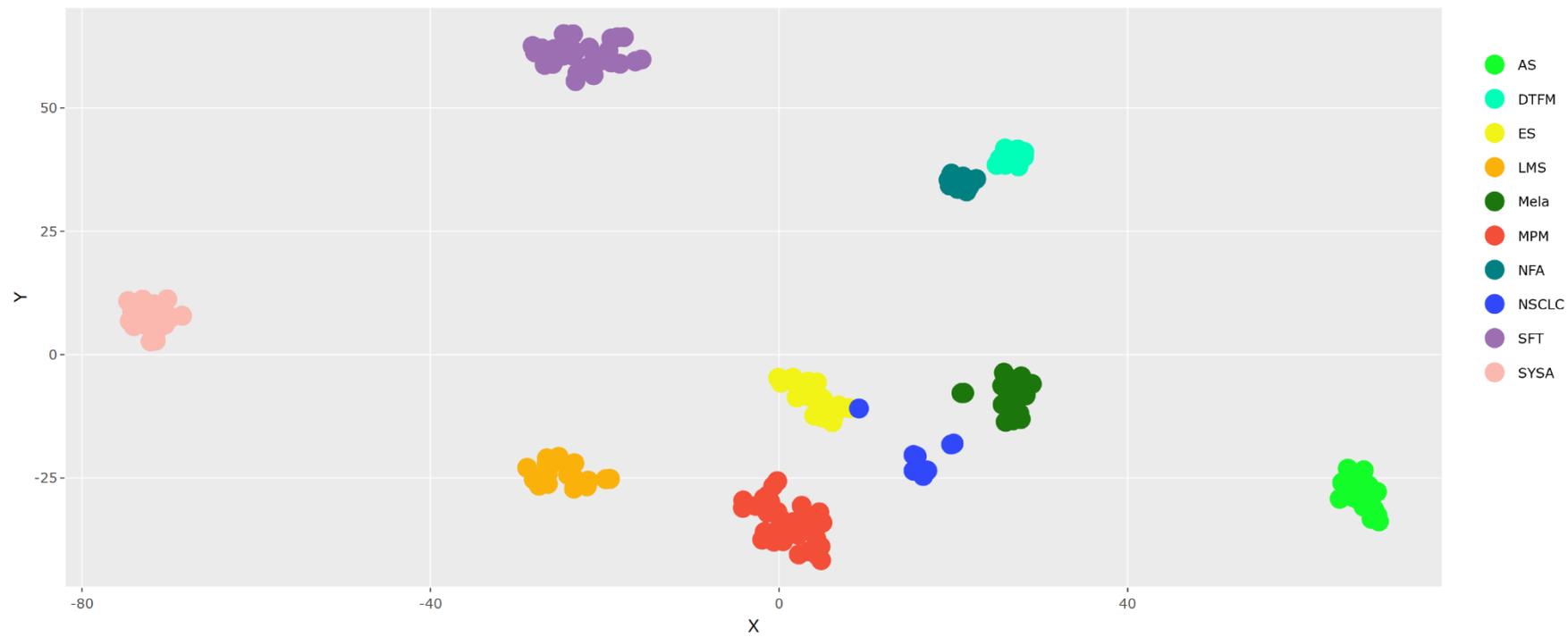


Figura 9. Analisi t-SNE del MPM e delle possibili diagnosi differenziali in ambito neoplastico.

Valutazione e confronto del profilo di metilazione del MPM con i profili delle alterazioni pleuriche reattive

Sono state selezionate due serie di casi di alterazioni pleuriche reattive: 1) dodici campioni di fibrosi pleurica, entità selezionata in considerazione delle potenziali somiglianze, in termini di caratteristiche morfologiche, con il mesotelioma sarcomatoide. In questo gruppo, 9/12 pazienti erano maschi e l'età mediana alla diagnosi è stata pari a 75 anni (range: 44-87 anni); 2) Dodici campioni di iperplasia mesoteliale reattiva, condizione scelta in considerazione del quadro morfologico potenzialmente sovrapponibile al mesotelioma epitelioide o bifasico. Anche in questa serie, 9/3 pazienti erano maschi e l'età mediana alla diagnosi è risultata pari a 34,5 anni (range: 18-81).

L'analisi di clustering gerarchico non supervisionato ha confermato anche in questo confronto che il MPM rappresenta una specifica classe di metilazione (Figura 10). Tuttavia, due casi sono risultati clusterizzare in modo diverso da quanto atteso. Un caso di pleurite sclerosante (ID DNA tumorale: 141030) ha mostrato un profilo simile al MPM, mentre un mesotelioma epitelioide (ID DNA tumorale: 129980) è stato ricompreso nelle alterazioni reattive. Questi risultati sono stati confermati dall'analisi t-SNE (Figura 11).

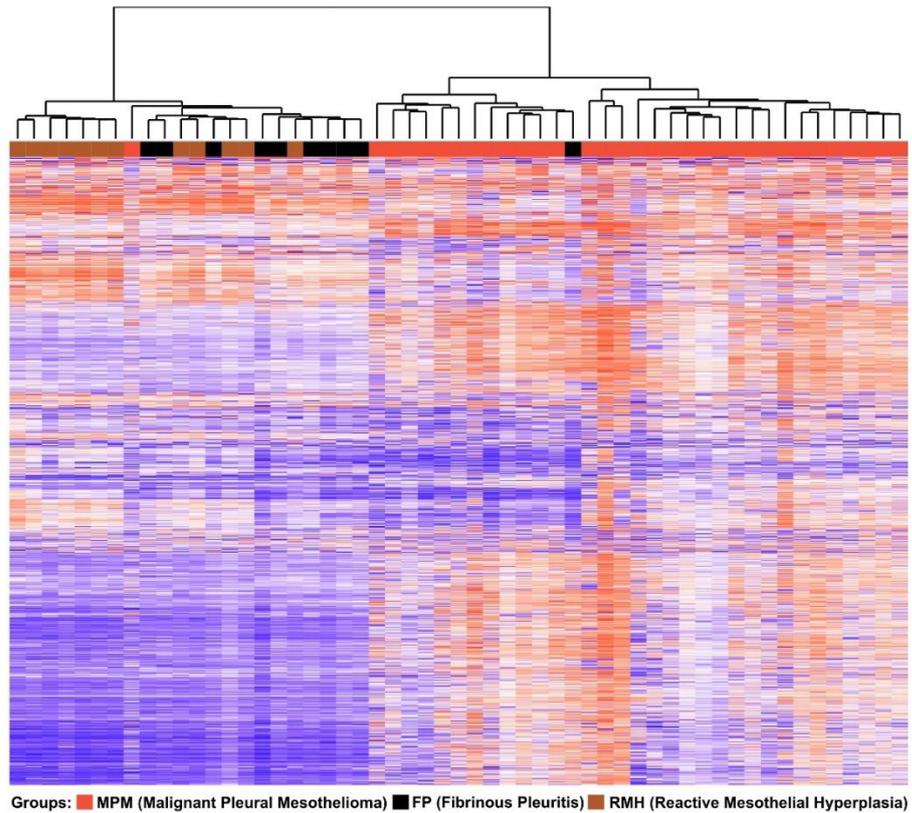


Figura 10. Analisi clustering del MPM e delle possibili diagnosi differenziali di tipo reattivo.

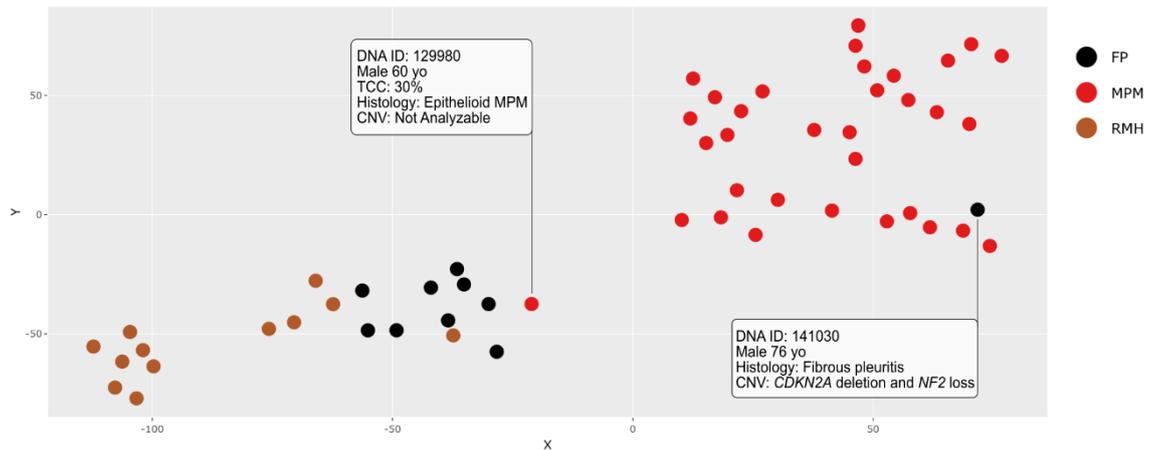


Figura 11. Analisi t-SNE del MPM e delle alterazioni pleuriche reattive.

I due casi sono stati quindi analizzati in modo più approfondito. Il profilo CNV del caso di pleurite sclerosante è stato valutato riscontrando molteplici alterazioni, un reperto incompatibile con una lesione di natura reattiva (Figura 12). Nello specifico, sono state

riscontrate la delezione in omozigosi di *CDKN2A* e la perdita di *NF2*. Entrambe le alterazioni caratteristiche del MPM. Sono state quindi richieste ulteriori informazioni riguardo il decorso di questo paziente ed è stata identificata una seconda biopsia pleurica eseguita 7 mesi più tardi per il persistere della sintomatologia. La diagnosi istopatologica di questa seconda biopsia era stata di mesotelioma sarcomatoide. Nella Figura 12 è possibile osservare il reperto istologico dei due campioni: nella prima biopsia è osservabile un quadro compatibile con una pleurite sclerosante. Ad alto ingrandimento possono essere identificate alcune atipie citologiche, tuttavia caratteristiche diagnostiche in senso neoplastiche non erano osservabili. Al contrario, la biopsia successiva mostra un chiaro quadro neoplastico in linea con la diagnosi posta di mesotelioma sarcomatoide. Sulla base di questi risultati, il caso è stato riclassificato come MPM sarcomatoide ai fini delle successive analisi.

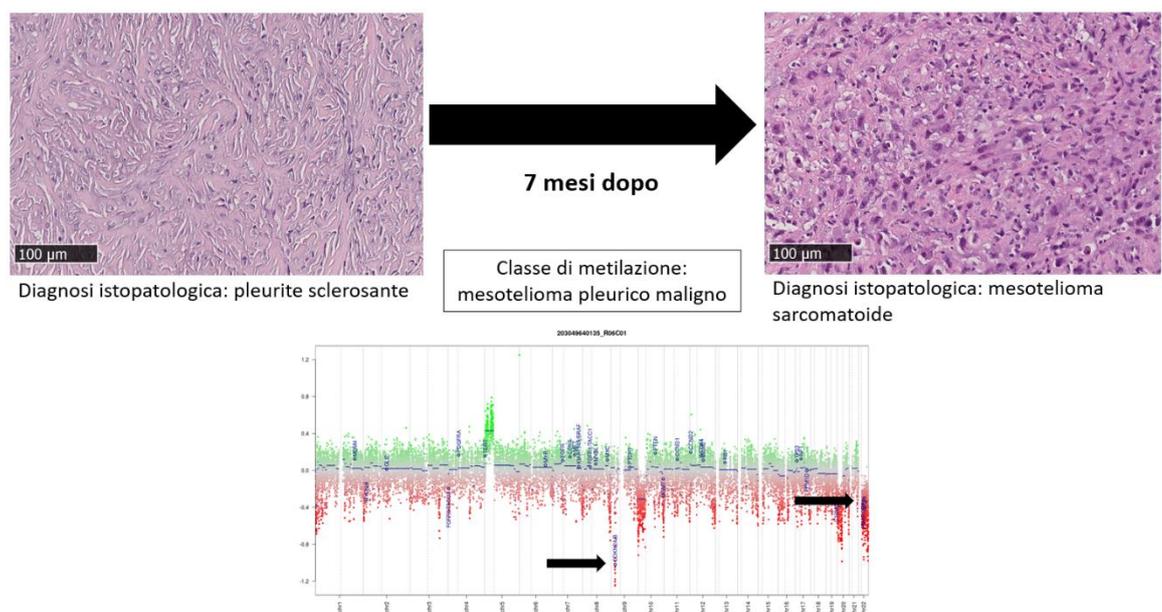


Figura 12. Evoluzione del caso di pleurite sclerosante riclassificato grazie alla valutazione del profilo di metilazione.

Per quanto riguarda, invece, il caso di MPM che ha mostrato un profilo di metilazione sovrapponibile alle patologie pleuriche reattive, il relativo reperto in termini di CNV ha mostrato un risultato suggestivo di una bassa qualità del campione con un'ampia dispersione delle sonde tale da impedire la valutazione delle specifiche variazioni (Figura 13). Sulla base della precedente esperienza, questo pattern è indicativo di artefatti di natura tecnica (dovuti, per esempio, ad una bassa qualità del DNA e/o a un

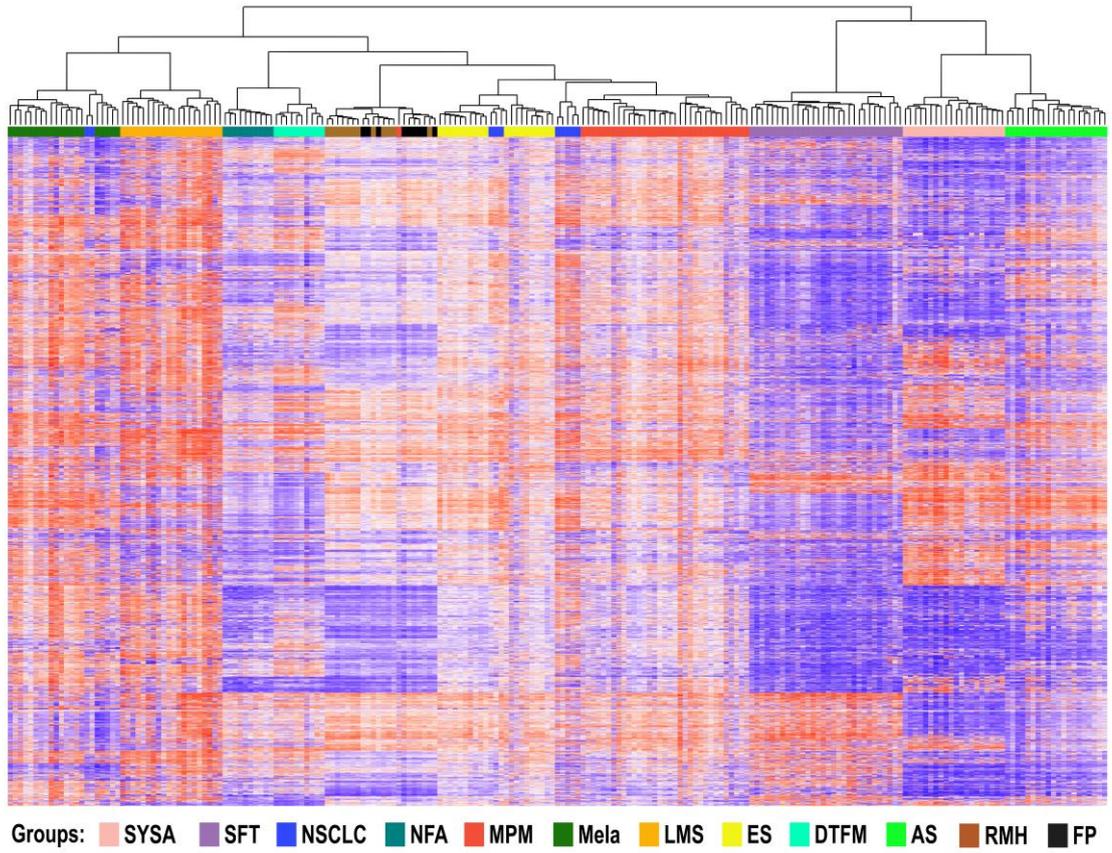


Figura 14. Analisi clustering del MPM e delle possibili diagnosi differenziali sia di tipo neoplastico che reattivo.

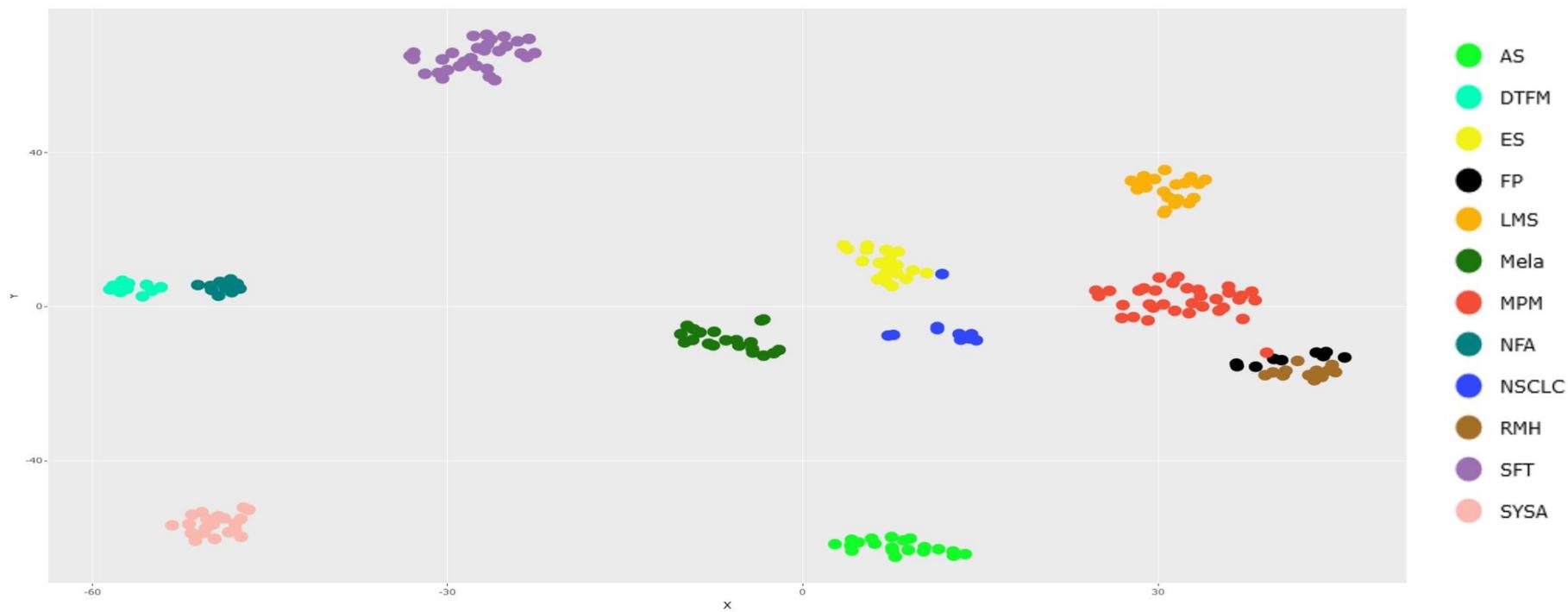


Figura 15. Analisi clustering del MPM e delle possibili diagnosi differenziali sia di tipo neoplastico che reattivo.

Valutazione del potenziale diagnostico dei profili CNV

Complessivamente, nel MPM le delezioni sono risultate più frequenti rispetto ai gain e alle amplificazioni (Figura 16). Tre casi sono stati esclusi da questa analisi a causa della eccessiva dispersione delle sonde [il caso di mesotelioma epitelioide precedentemente descritto (ID DNA tumorale: 129980) e due casi di mesotelioma sarcomatoide (ID DNA tumorale: 129990 e 129998)].

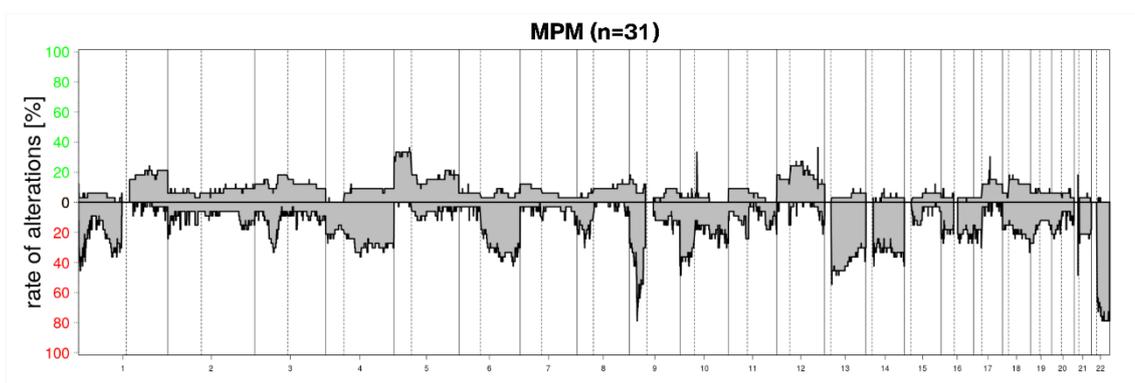


Figura 16. Profilo CNV cumulativo dei casi di MPM.

Nei campioni rimanenti (n=31), sono state frequentemente riscontrate alterazioni di *CDKN2A/B* comprendenti un reperto riferibile ad una delezione in omozigosi in 23/31 e in eterozigosi in 4/31; questo marker molecolare è stato osservato trasversalmente in tutti gli istotipi di MPM. Le delezioni di *NF2* rappresentano un secondo evento CNV frequentemente osservato indipendentemente dal tipo di mesotelioma (delezione in omozigosi in 6/31 e in eterozigosi in 16/31). Al contrario, delezioni di *BAP1* sono risultate associate agli istotipi epitelioide e bifasico di mesotelioma (rispettivamente 65% e 75% *versus* 30% nel sarcomatoide). Un profilo suggestivo per una cromotripsia focale è stato rilevato in 6/31 (19%). Una rappresentazione riassuntiva delle CNV rilevate è presentata nella Figura 17, mentre nella Figura 18 sono riportati i profili CNV cumulativi delle altre entità neoplastiche.

Dal punto di vista dell'utilità diagnostica, appare utile sottolineare come le alterazioni CNV siano completamente indipendenti dai profili di metilazione e pertanto i marker ricorrenti, come le delezioni di *CDKN2A/B* e *NF2*, possono essere utilizzati in modo sinergico con la valutazione del profilo di metilazione per giungere ad una diagnosi

conclusiva di mesotelioma (per esempio, delezioni di *CDKN2A/B* sono frequenti nel MPM come in molte altre neoplasie, incluso il melanoma, mentre delezioni di *NF2* sono in linea di massima assenti in questo ultimo, consentendo quindi di distinguere queste due entità).

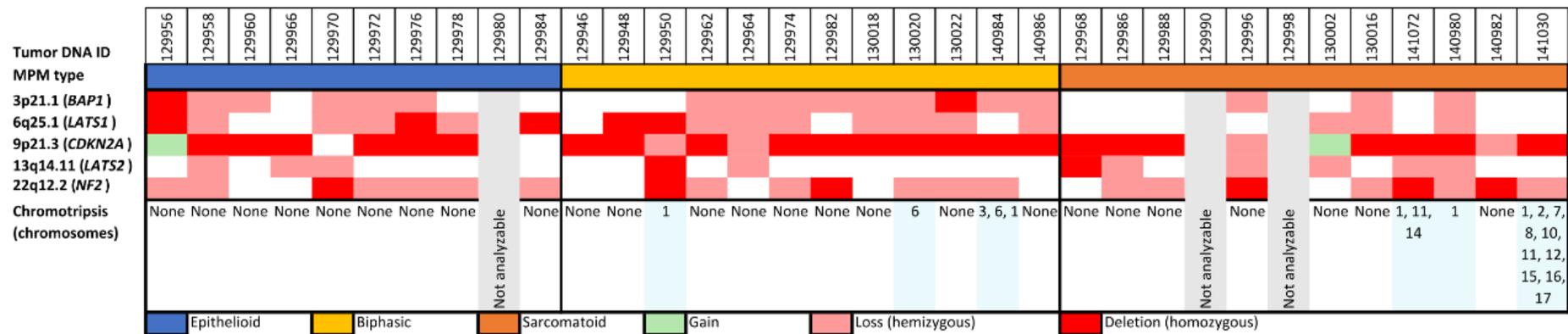


Figura 17. Alterazioni CNV principali rilevate nella casistica di MPM.

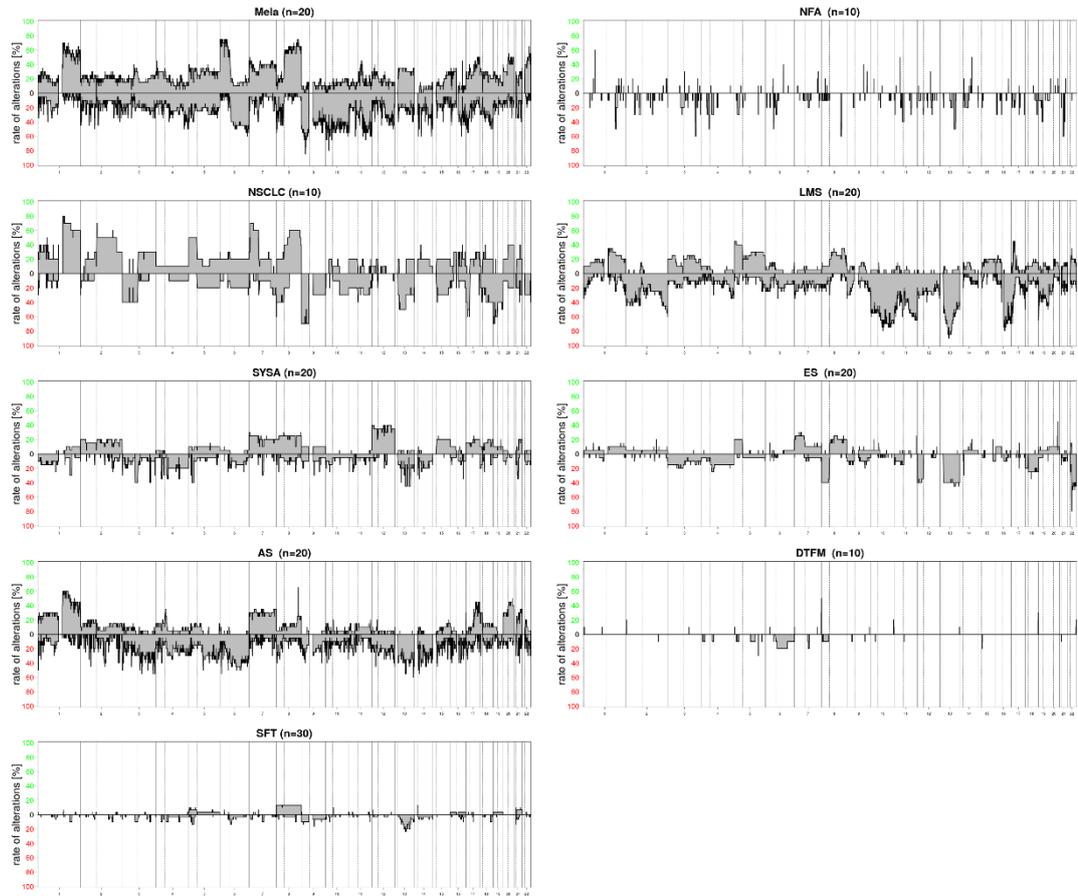


Figura 18. Profili CNV delle possibili diagnosi differenziali di tipo neoplastico.

Discussione

Ottenere una corretta diagnosi di MPM è di estrema importanza: prima di tutto per impostare un corretto percorso di cura del paziente, ma anche per alcune peculiari implicazioni di questa entità neoplastica. A causa infatti dell'associazione tra lo sviluppo di mesotelioma e l'esposizione all'asbesto, nella maggior parte dei paesi la diagnosi di mesotelioma comporta numerose conseguenze epidemiologiche, assicurative e legali sia in termini di risarcimento che di responsabilità penali.^{61, 62}

Tuttavia, nonostante la sua rilevanza e le numerose linee guida e raccomandazioni elaborate nel corso degli anni, la diagnosi di MPM rimane impegnativa.¹⁶ Le caratteristiche morfologiche non sono specifiche e possono sovrapporsi con numerose altre entità rendendo sempre indispensabili approfondimenti immunoistochimici,⁶³ senza però che sia stato identificato alcun marker diagnostico di MPM. Discorso analogo vale per i marker molecolari ad oggi valutati essendo condivisi tra numerose entità

neoplastiche: per esempio, la valutazione di CDKN2A/B è risultata essere efficace nel distinguere il MPM dalle proliferazioni mesoteliali reattive,⁶⁴ ma non è specifica del MPM.⁶⁵⁻⁶⁷ Al contrario, altre alterazioni, come le delezioni di *BAP1*, possiedono una specificità più elevata, ma non sono sufficientemente sensibili per tutti i tipi di MPM come il mesotelioma sarcomatoide.^{68, 69}

Quindi, ad oggi, la diagnosi conclusiva di MPM è demandata a patologi esperti ed è basata sull'integrazione di molteplici aspetti (caratteristiche morfologiche istopatologiche, approfondimenti immunoistochimici e caratteristiche molecolari) consentendo di raggiungere una buona accuratezza. Un errore diagnostico, tuttavia, rimane possibile e interpretazioni conflittuali possono comunque insorgere nonostante questa ampia caratterizzazione.⁷⁰

Considerata l'efficacia ottenuta nella classificazione delle neoplasie del sistema nervoso centrale attraverso la valutazione dei profili di metilazione del DNA,^{54, 56, 71, 72} si è voluto testare questo approccio nel MPM. L'ipotesi di lavoro è stata quella che il mesotelioma possedesse uno specifico profilo di metilazione genome-wide potenzialmente sfruttabile per distinguerlo dalle potenziali diagnosi differenziali sia di tipo neoplastico che reattivo. Per verificare questa ipotesi, si è confrontata una serie di MPM, rappresentativa dei diversi istotipi, con delle coorti di riferimento che comprendessero tutti i principali mimi istologici. Riguardo la scelta di queste coorti, si è cercato di procedere nel modo più ampio possibile; nella pratica diagnostica, il numero di entità che di solito entrano nel processo di diagnosi differenziale di un singolo caso è ovviamente più limitato, ma ognuna di esse può potenzialmente rappresentare un pitfall diagnostico in situazioni specifiche e quindi un efficace strumento diagnostico deve essere in grado di distinguerle. Per esempio, il sarcoma sinoviale e il MPM di solito si sviluppano in fasce di età differenti, ma il sarcoma sinoviale bifasico e il mesotelioma bifasico condividono numerosi aspetti istopatologici ed immunoistochimici (inclusa l'espressione della calretinina e delle citocheratine), rappresentando quindi una diagnosi differenziale difficile.²²

L'approccio si dimostrato efficace: complessivamente, 32/33 (97%) casi di MPM sono stati correttamente classificati e inoltre anche tutte le altre entità neoplastiche hanno mostrato profili specifici. Questi risultati dimostrano che: i) il MPM possiede uno

specifico profilo di metilazione del DNA; ii) questo profilo è differente da quello dei potenziali mimi istologici, sia di tipo neoplastico che reattivo; iii) la valutazione del profilo di metilazione del DNA fornisce quindi informazioni utili per la diagnosi del MPM.

Un singolo caso non è risultato classificabile in modo conclusivo come mesotelioma o come patologia reattiva; questo campione mostra le limitazioni del presente approccio sottolineando l'importanza della scelta materiale in esame (sia in termini di concentrazione del DNA tumorale che della sua qualità). Questo caso presentava caratteristiche qualitative particolarmente basse, ma la precedente esperienza nell'ambito dei tumori del sistema nervoso centrale ha mostrato che nel complesso la classificazione basata sui profili di metilazione è relativamente resiliente nonostante una limitata concentrazione e qualità del DNA tumorale.⁶⁰ In linea con questa osservazione, anche nella presente casistica 5 ulteriori casi di MPM hanno mostrato una quantità di cellule tumorali <70% (range: 40-60%) venendo tuttavia correttamente classificati. A differenza, però, del caso non classificato correttamente, i profili CNV di questi casi hanno mostrato una dispersione limitata dei segnali, un risultato suggestivo di una buona qualità del DNA e del processo analitico (Figura 19). Esaminando gli stessi profili, è inoltre riscontrabile la bassa concentrazione di DNA tumorale come atteso: le alterazioni CNV sono infatti difficilmente apprezzabili.

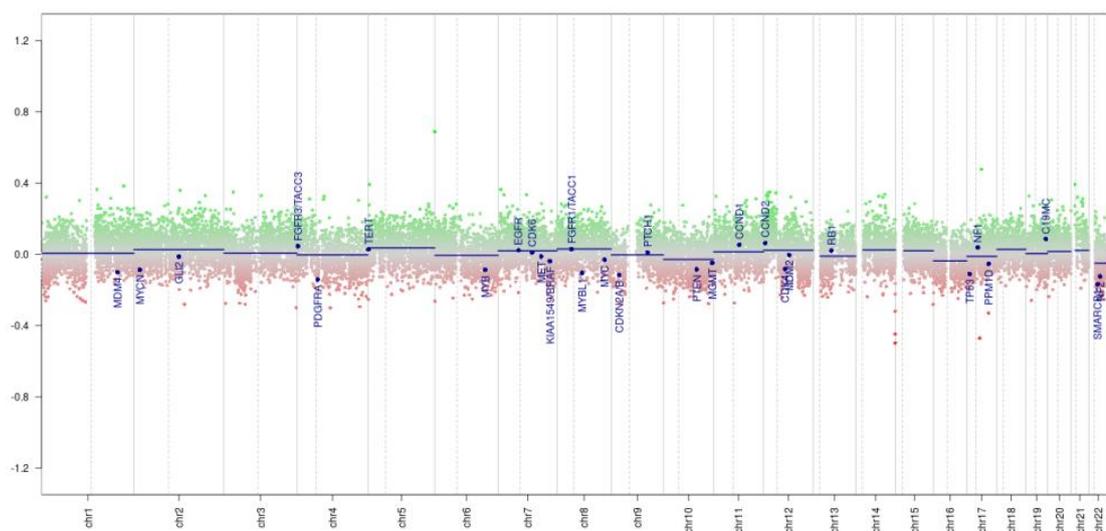


Figura 19. Profilo CNV del caso 129964 (mesotelioma bifasico, concentrazione di cellule neoplastiche: 40%).

Considerato che il contenuto di DNA neoplastico è critico per il successo della classificazione basata sul profilo di metilazione del DNA, la scelta del campione dovrebbe essere finalizzata a raggiungere una concentrazione pari almeno al 70% di cellule neoplastiche. Inoltre, i risultati dovrebbero essere interpretati con cautela se il profilo CNV mostra aspetti suggestivi di problemi tecnici o qualitativi come, ad esempio, un'ampia dispersione delle sonde.⁶⁰ Futuri studi, finalizzati ad analizzare la relazione tra quantità/caratteristiche/qualità del campione e risultati in termini di classificazione sono quindi desiderabili; questo aspetto è particolarmente rilevante nello specifico caso del MPM in quanto la valutazione diagnostica è spesso richiesta su materiale biotico limitato.

Il caso, invece, riclassificato come MPM grazie al suo profilo di metilazione mostra come questo strumento possa essere efficacemente impiegato nei casi più difficili, per esempio con aspetti clinico-patologici conflittuali. Una considerazione importante è che, nonostante la valutazione di specifici marker come lo status di *CDKN2A/B* avrebbe consentito una corretta classificazione in senso neoplastico di questo caso, non avrebbe comunque fornito una classificazione diagnostica; al contrario, la classificazione basata sul profilo di metilazione del DNA ha mostrato un chiaro clustering all'interno del gruppo del MPM. La valutazione di casistiche più ampie consentirà di valutare l'efficacia diagnostica complessiva di questo strumento e di confrontarla con le metodiche di diagnostica convenzionale.

Le CNV rappresentano un'ulteriore importante fonte di informazioni per la caratterizzazione delle entità neoplastiche e gli array di metilazione genome-wide consentono di inferire in modo efficace questi dati. Considerato che le CNV sono completamente indipendenti dal processo di classificazione basato sul profilo di metilazione, esse possono anche essere utilizzate per ottimizzare l'interpretazione di quest'ultimo. Nel complesso, i risultati ottenuti sono in accordo con i recenti dati relativi al profilo molecolare del MPM.^{45, 73} In generale, sono state osservate principalmente delezioni in omozigosi o eterozigosi, un'osservazione in linea con le conoscenze attuali riguardo il processo di sviluppo neoplastico del MPM che è preferenzialmente basato sulla perdita di geni oncosoppressori. Un altro riscontro interessante del presente studio è la frequenza relativamente alta di reperti CNV suggestivi di una focale cromotripsia, una

caratteristica molecolare che sembra essere frequentemente presente nel MPM e che potrebbe condurre allo sviluppo di neoantigeni.⁷⁴

Riguardo le potenziali limitazioni del presente studio, la più importante è sicuramente riferibile al rischio di un errore di campionamento. Campioni tumorali con un'elevata proporzione di tessuto reattivo sono a rischio di un risultato falsamente negativo. Ciononostante, questo rischio non è diverso dall'invio, ai fini dell'esame istopatologico, di un campione di tessuto non rappresentativo, ma merita comunque di essere ricordato. Un altro aspetto importante meritevole di considerazione è rappresentato dai costi di analisi e dalla disponibilità delle strumentazioni necessarie, ma, considerata la crescente importanza della classificazione diagnostica basata sul profilo di metilazione,⁷⁵ si può prevedere che quanto richiesto divenga progressivamente disponibile almeno presso i centri di riferimento.

In conclusione, il presente studio dimostra che la classificazione basata sul profilo di metilazione del DNA consente di distinguere il MPM da un ampio insieme di potenziali diagnosi differenziali sia di tipo neoplastico che reattivo. I profili CNV, derivati dagli array di metilazione, forniscono ulteriori informazioni utili dal punto di vista diagnostico. Questo strumento potrà essere utile per ottimizzare il processo diagnostico del MPM.

Bibliografia

1. Merlo DF, Bruzzone M, Bruzzi P et al. Mortality among workers exposed to asbestos at the shipyard of Genoa, Italy: a 55 years follow-up. *Environ Health* 2018; 17: 94.
2. Hodgson JT, McElvenny DM, Darnton AJ, Price MJ, Peto J. The expected burden of mesothelioma mortality in Great Britain from 2002 to 2050. *Br J Cancer* 2005; 92: 587-593.
3. Price B, Ware A. Time trend of mesothelioma incidence in the United States and projection of future cases: an update based on SEER data for 1973 through 2005. *Crit Rev Toxicol* 2009; 39: 576-588.
4. Berman DW, Crump KS. Update of potency factors for asbestos-related lung cancer and mesothelioma. *Crit Rev Toxicol* 2008; 38 Suppl 1: 1-47.
5. Hodgson JT, Darnton A. The quantitative risks of mesothelioma and lung cancer in relation to asbestos exposure. *Ann Occup Hyg* 2000; 44: 565-601.
6. Dikensoy O. Mesothelioma due to environmental exposure to erionite in Turkey. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14: 322-325.
7. Chirieac LR, Barletta JA, Yeap BY et al. Clinicopathologic characteristics of malignant mesotheliomas arising in patients with a history of radiation for Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Oncol* 2013; 31: 4544-4549.
8. Deutsch M, Land SR, Begovic M, Cecchini R, Wolmark N. An association between postoperative radiotherapy for primary breast cancer in 11 National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) studies and the subsequent appearance of pleural mesothelioma. *Am J Clin Oncol* 2007; 30: 294-296.
9. Pilarski R, Cebulla CM, Massengill JB et al. Expanding the clinical phenotype of hereditary BAP1 cancer predisposition syndrome, reporting three new cases. *Genes Chromosomes Cancer* 2014; 53: 177-182.
10. Testa JR, Cheung M, Pei J et al. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet* 2011; 43: 1022-1025.
11. Wiesner T, Fried I, Ulz P et al. Toward an improved definition of the tumor spectrum associated with BAP1 germline mutations. *J Clin Oncol* 2012; 30: e337-340.
12. Yates DH, Corrin B, Stidolph PN, Browne K. Malignant mesothelioma in south east England: clinicopathological experience of 272 cases. *Thorax* 1997; 52: 507-512.
13. Travis WD, Brambilla E, Burke A, Marx A, Nicholson AG, International Agency for Research on Cancer. *WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2015;412 pages.
14. Galateau-Salle F, Attanoos R, Gibbs AR et al. Lymphohistiocytoid variant of malignant mesothelioma of the pleura: a series of 22 cases. *Am J Surg Pathol* 2007; 31: 711-716.
15. Klebe S, Brownlee NA, Mahar A et al. Sarcomatoid mesothelioma: a clinical-pathologic correlation of 326 cases. *Mod Pathol* 2010; 23: 470-479.
16. Tsao MS, Carbone M, Galateau-Salle F et al. Pathologic considerations and standardization in mesothelioma clinical trials. *J Thorac Oncol* 2019.
17. Husain AN, Colby TV, Ordonez NG 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.

18. Weinbreck N, Vignaud JM, Begueret H et al. SYT-SSX fusion is absent in sarcomatoid mesothelioma allowing its distinction from synovial sarcoma of the pleura. *Mod Pathol* 2007; 20: 617-621.
19. Hasegawa T, Matsuno Y, Shimoda T, Umeda T, Yokoyama R, Hirohashi S. Proximal-type epithelioid sarcoma: a clinicopathologic study of 20 cases. *Mod Pathol* 2001; 14: 655-663.
20. Sakurai T, Kusumoto H, Wakasa T, Ohta Y, Konishi E, Shiono H. Epithelioid sarcoma in the chest wall: a case report and literature review. *Surg Case Rep* 2018; 4: 77.
21. Aizawa K, Endo S, Yamamoto S et al. [Chest wall epithelioid sarcoma]. *Kyobu Geka* 2004; 57: 957-960.
22. Miettinen M, Limon J, Niezabitowski A, Lasota J. Calretinin and other mesothelioma markers in synovial sarcoma: analysis of antigenic similarities and differences with malignant mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 610-617.
23. Illei PB, Ladanyi M, Rusch VW, Zakowski MF. The use of CDKN2A deletion as a diagnostic marker for malignant mesothelioma in body cavity effusions. *Cancer* 2003; 99: 51-56.
24. Hwang H, Tse C, Rodriguez S, Gown A, Churg A. p16 FISH deletion in surface epithelial mesothelial proliferations is predictive of underlying invasive mesothelioma. *Am J Surg Pathol* 2014; 38: 681-688.
25. Monaco SE, Shuai Y, Bansal M, Krasinskas AM, Dacic S. The diagnostic utility of p16 FISH and GLUT-1 immunohistochemical analysis in mesothelial proliferations. *Am J Clin Pathol* 2011; 135: 619-627.
26. Krismann M, Muller KM, Jaworska M, Johnen G. Molecular cytogenetic differences between histological subtypes of malignant mesotheliomas: DNA cytometry and comparative genomic hybridization of 90 cases. *J Pathol* 2002; 197: 363-371.
27. Lindholm PM, Salmenkivi K, Vauhkonen H et al. Gene copy number analysis in malignant pleural mesothelioma using oligonucleotide array CGH. *Cytogenet Genome Res* 2007; 119: 46-52.
28. Musti M, Kettunen E, Dragonieri S et al. Cytogenetic and molecular genetic changes in malignant mesothelioma. *Cancer Genet Cytogenet* 2006; 170: 9-15.
29. Chiosea S, Krasinskas A, Cagle PT, Mitchell KA, Zander DS, Dacic S. Diagnostic importance of 9p21 homozygous deletion in malignant mesotheliomas. *Mod Pathol* 2008; 21: 742-747.
30. Sekido Y. Genomic abnormalities and signal transduction dysregulation in malignant mesothelioma cells. *Cancer Sci* 2010; 101: 1-6.
31. Bianchi AB, Mitsunaga SI, Cheng JQ et al. High frequency of inactivating mutations in the neurofibromatosis type 2 gene (NF2) in primary malignant mesotheliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 10854-10858.
32. Sekido Y, Pass HI, Bader S et al. Neurofibromatosis type 2 (NF2) gene is somatically mutated in mesothelioma but not in lung cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 1227-1231.
33. Bott M, Brevet M, Taylor BS et al. The nuclear deubiquitinase BAP1 is commonly inactivated by somatic mutations and 3p21.1 losses in malignant pleural mesothelioma. *Nat Genet* 2011; 43: 668-672.

34. Hamaratoglu F, Willecke M, Kango-Singh M et al. The tumour-suppressor genes NF2/Merlin and Expanded act through Hippo signalling to regulate cell proliferation and apoptosis. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 27-36.
35. Ladanyi M, Zauderer MG, Krug LM et al. New strategies in pleural mesothelioma: BAP1 and NF2 as novel targets for therapeutic development and risk assessment. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 4485-4490.
36. Thurneysen C, Opitz I, Kurtz S, Weder W, Stahel RA, Felley-Bosco E. Functional inactivation of NF2/merlin in human mesothelioma. *Lung Cancer* 2009; 64: 140-147.
37. Yokoyama T, Osada H, Murakami H et al. YAP1 is involved in mesothelioma development and negatively regulated by Merlin through phosphorylation. *Carcinogenesis* 2008; 29: 2139-2146.
38. Lopez-Lago MA, Okada T, Murillo MM, Socci N, Giancotti FG. Loss of the tumor suppressor gene NF2, encoding merlin, constitutively activates integrin-dependent mTORC1 signaling. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 4235-4249.
39. Zhao R, Choi BY, Lee MH, Bode AM, Dong Z. Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16(INK4a)) in Cancer. *EBioMedicine* 2016; 8: 30-39.
40. Yoshikawa Y, Sato A, Tsujimura T et al. Frequent inactivation of the BAP1 gene in epithelioid-type malignant mesothelioma. *Cancer Sci* 2012; 103: 868-874.
41. Zauderer MG, Bott M, McMillan R et al. Clinical characteristics of patients with malignant pleural mesothelioma harboring somatic BAP1 mutations. *J Thorac Oncol* 2013; 8: 1430-1433.
42. Murakami H, Mizuno T, Taniguchi T et al. LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. *Cancer Res* 2011; 71: 873-883.
43. Mizuno T, Murakami H, Fujii M et al. YAP induces malignant mesothelioma cell proliferation by upregulating transcription of cell cycle-promoting genes. *Oncogene* 2012; 31: 5117-5122.
44. Tallet A, Nault JC, Renier A et al. Overexpression and promoter mutation of the TERT gene in malignant pleural mesothelioma. *Oncogene* 2014; 33: 3748-3752.
45. Hmeljak J, Sanchez-Vega F, Hoadley KA et al. Integrative Molecular Characterization of Malignant Pleural Mesothelioma. *Cancer Discov* 2018; 8: 1548-1565.
46. van der Bij S, Koffijberg H, Burgers JA et al. Prognosis and prognostic factors of patients with mesothelioma: a population-based study. *Br J Cancer* 2012; 107: 161-164.
47. Rusch VW, Giroux D, Kennedy C et al. Initial analysis of the international association for the study of lung cancer mesothelioma database. *J Thorac Oncol* 2012; 7: 1631-1639.
48. Pass HI, Giroux D, Kennedy C et al. Supplementary prognostic variables for pleural mesothelioma: a report from the IASLC staging committee. *J Thorac Oncol* 2014; 9: 856-864.
49. Kadota K, Suzuki K, Colovos C et al. A nuclear grading system is a strong predictor of survival in epithelioid diffuse malignant pleural mesothelioma. *Mod Pathol* 2012; 25: 260-271.
50. Pelosi G, Papotti M, Righi L et al. Pathologic Grading of Malignant Pleural Mesothelioma: An Evidence-Based Proposal. *J Thorac Oncol* 2018; 13: 1750-1761.
51. Kryukov GV, Wilson FH, Ruth JR et al. MTAP deletion confers enhanced dependency on the PRMT5 arginine methyltransferase in cancer cells. *Science* 2016; 351: 1214-1218.

52. Mavrakis KJ, McDonald ER, 3rd, Schlabach MR et al. Disordered methionine metabolism in MTAP/CDKN2A-deleted cancers leads to dependence on PRMT5. *Science* 2016; 351: 1208-1213.
53. Kindler HL, Ismaila N, Armato SG, 3rd et al. Treatment of Malignant Pleural Mesothelioma: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline. *J Clin Oncol* 2018; 36: 1343-1373.
54. Capper D, Jones DTW, Sill M et al. DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* 2018; 555: 469-474.
55. Koelsche C, Mynarek M, Schimpf D et al. Primary intracranial spindle cell sarcoma with rhabdomyosarcoma-like features share a highly distinct methylation profile and DICER1 mutations. *Acta Neuropathol* 2018; 136: 327-337.
56. Koelsche C, Stichel D, Griewank KG et al. Genome-wide methylation profiling and copy number analysis in atypical fibroxanthomas and pleomorphic dermal sarcomas indicate a similar molecular phenotype. *Clin Sarcoma Res* 2019; 9: 2.
57. Hovestadt V, Remke M, Kool M et al. Robust molecular subgrouping and copy-number profiling of medulloblastoma from small amounts of archival tumour material using high-density DNA methylation arrays. *Acta Neuropathol* 2013; 125: 913-916.
58. Ward JH. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association* 1963; 58: 236-244.
59. van der Maaten L, Hinton G. Visualizing Data using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research* 2008; 9: 2579--2605.
60. Capper D, Stichel D, Sahm F et al. Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathol* 2018; 136: 181-210.
61. Partemi S, De Giorgio F. Medico-legal aspects of mesothelioma. *Ann Ital Chir* 2007; 78: 401-403.
62. Lemen RA. Mesothelioma from asbestos exposures: Epidemiologic patterns and impact in the United States. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2016; 19: 250-265.
63. Monaco S, Mehrad M, Dacic S. Recent Advances in the Diagnosis of Malignant Mesothelioma: Focus on Approach in Challenging Cases and in Limited Tissue and Cytologic Samples. *Adv Anat Pathol* 2018; 25: 24-30.
64. Hwang HC, Sheffield BS, Rodriguez S et al. Utility of BAP1 Immunohistochemistry and p16 (CDKN2A) FISH in the Diagnosis of Malignant Mesothelioma in Effusion Cytology Specimens. *Am J Surg Pathol* 2016; 40: 120-126.
65. Shain AH, Yeh I, Kovalyshyn I et al. The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. *N Engl J Med* 2015; 373: 1926-1936.
66. Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF, Ladanyi M. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2108-2113.
67. Subramaniam MM, Noguera R, Piqueras M, Navarro S, Lopez-Guerrero JA, Llombart-Bosch A. p16INK4A (CDKN2A) gene deletion is a frequent genetic event in synovial sarcomas. *Am J Clin Pathol* 2006; 126: 866-874.
68. Cigognetti M, Lonardi S, Fisogni S et al. BAP1 (BRCA1-associated protein 1) is a highly specific marker for differentiating mesothelioma from reactive mesothelial proliferations. *Mod Pathol* 2015; 28: 1043-1057.
69. Nasu M, Emi M, Pastorino S et al. High Incidence of Somatic BAP1 alterations in sporadic malignant mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 565-576.

70. John T, Russell PA, Thapa B. Is Mesothelioma in China Rare or Misdiagnosed? *J Thorac Oncol* 2017; 12: 607-609.
71. Lee JC, Villanueva-Meyer JE, Ferris SP et al. Primary intracranial sarcomas with DICER1 mutation often contain prominent eosinophilic cytoplasmic globules and can occur in the setting of neurofibromatosis type 1. *Acta Neuropathol* 2019; 137: 521-525.
72. Hou Y, Pinheiro J, Sahm F et al. Papillary glioneuronal tumor (PGNT) exhibits a characteristic methylation profile and fusions involving PRKCA. *Acta Neuropathol* 2019; 137: 837-846.
73. Bueno R, Stawiski EW, Goldstein LD et al. Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nat Genet* 2016; 48: 407-416.
74. Mansfield AS, Peikert T, Smadbeck JB et al. Neoantigenic Potential of Complex Chromosomal Rearrangements in Mesothelioma. *J Thorac Oncol* 2019; 14: 276-287.
75. Kumar R, Liu APY, Orr BA, Northcott PA, Robinson GW. Advances in the classification of pediatric brain tumors through DNA methylation profiling: From research tool to frontline diagnostic. *Cancer* 2018; 124: 4168-4180.