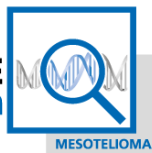

FONDAZIONE
Buzzi Unicem



MESOTELIOMA



Revisione Bibliografica 2022
Elisa Roca (elisaroca@gmail.com)

Microparticelle pleuriche e Mesotelioma Maligno

Introduzione

Il **mesotelioma maligno** (MM) è una neoplasia molto grave a carico delle cellule mesoteliali e nella maggior parte dei casi causato dall'esposizione all'amianto.

Le limitate conoscenze relative all'individuazione dell'esposizione all'amianto ed alla diagnosi precoce del MM, nonché la mancanza di opzioni terapeutiche efficaci per questo tumore potenzialmente letale, sottolineano un'immediata **necessità di comprendere i meccanismi patogenetici** del MM.

Attualmente vi sono molte ricerche volte allo studio delle **nano-vescicole** ed al loro enorme potenziale di contenere molecole rappresentative di diverse malattie, nonché di comunicare con bersagli distanti.

In particolare, in questo panorama di ricerca scientifica molti studiosi si sono interessati all'esplorazione del ruolo degli esosomi nella biologia del MM.

In **questa revisione bibliografica**, verranno riassunti i punti più salienti relativi alla letteratura pubblicata in questo campo.

La speranza è che il continuo studio in questo ambito possa contribuire a far progredire il campo del MM rivelando i meccanismi di sviluppo e sopravvivenza di tale patologia per disegnare nuove strategie terapeutiche future per questa patologia.

Le microparticelle

Le **vescicole extracellulari** derivano per gemmazione dalla membrana cellulare in risposta all'attivazione cellulare o all'apoptosi.

Sono molto eterogenee sia per quanto riguarda la loro composizione, sia per le loro dimensioni. Infatti, hanno un diametro che varia tra 0.1 to 1 μm .

Le microvescicole cellulari sono delle vere e proprie miniature della cellula madre e possono rappresentarla esprimendo gli antigeni parentali.

La "**microvescicolazione**" è un processo biologico e, pertanto, risulta possibile per tutti i tipi di cellule ed in ogni fluido del nostro organismo.

Sono pochi i dati relativi alle microparticelle ed al liquido pleurico, sebbene i primi studi siano già stati pubblicati a partire dai primi anni 2000.

Il **liquido pleurico** teoricamente è un fluido biologico ideale per studiare le microparticelle: il prelievo è mini-invasivo, il materiale a disposizione per l'analisi è abbondante, c'è poco "rumore di fondo" poiché risulta solitamente poco cellulato e poco ricco di detriti cellulari.

Le **microparticelle derivanti dalle cellule** tumorali sono di estremo interesse, poiché, per definizione, rappresentano la cellula neoplastica da cui derivano e, quindi, possono offrire moltissime informazioni a riguardo.

Si tratta di sacche eterogenee legate alla membrana, che vengono rilasciate dalla superficie delle cellule tumorali nell'ambiente extracellulare.

Le cellule tumorali possono produrre costitutivamente le microvescicole extracellulari senza apparente necessità di stimolazione.

Sebbene siano state descritte diverse caratteristiche di queste microparticelle tumorali, tutte riflettono il particolare potenziale delle cellule tumorali per la sopravvivenza e l'espansione del tumore.

Gli esosomi

Gli **esosomi** sono specifiche microparticelle extracellulari, si tratta, infatti, di nanosfere con un diametro inferiore ai 150 nm.

Essi sono stati scoperti per la prima volta negli anni 80, tuttavia, tali ricerche non sembravano essere particolarmente allettanti, in quanto gli esosomi erano considerati allora dei semplici residui cellulari, degli scarti. Ciò era probabilmente legato al fatto che non vi era la possibilità di dimostrare le interazioni esistenti tra gli esosomi e le cellule vicine.

Solo recentemente è emerso l'**enorme potenziale** di queste particelle la cui superficie è composta da una membrana lipidica che può contenere proteine in superficie, DNA, miRNA, RNA, lipidi, etc.

Il corredo di proteine superficiali, la capacità di carico e la loro stabilità rende gli esosomi dei **potenziali messaggeri extracellulari** in grado di raggiungere cellule molto distanti tra di loro all'interno del nostro corpo. Gli esosomi, quindi, sono fondamentali per la comunicazione intercellulare: esiste un vero e proprio trasporto di queste nanovesicole dalle cellule produttrici alle cellule bersaglio, importante per la normale fisiologia e per gli stati patologici come il cancro.

La comunicazione esosomiale è implicata in una miriade di sistemi biologici, quali: la funzione immunitaria, la riparazione dei tessuti, la segnalazione del sistema nervoso, la salute cardiaca...

L'ondata di studi nel campo degli esosomi ha fatto affluire nella sfera scientifica preziose informazioni sulla **biologia di base e sulle malattie**.

Ora sappiamo che gli esosomi sono più che semplici contenitori di rifiuti usati dalle cellule per liberarsi di materiale indesiderato, ma sono sofisticati sistemi di messaggistica molecolare che possono agire localmente o distalmente dal punto in cui le vescicole sono secrete.

Questa peculiare capacità apre scenari di ricerca rilevanti **dal punto di vista diagnostico**: i ricercatori stanno studiando la correlazione tra la quantità di esosomi nei fluidi biologici e la presenza di cellule tumorali, che mostrano un forte "impulso alla comunicazione", ovvero un'elevata produzione di queste particelle messaggere.

Anche **dal punto di vista terapeutico** gli esosomi hanno un potenziale interessante: le cellule potrebbero essere bersaglio di terapie mirate a base di esosomi specifici, trasformati in trasportatori di principi attivi. Grazie al **ruolo fondamentale** che gli esosomi rivestono **nelle malattie**, potrebbero essere utili nell'identificazione di biomarcatori per la diagnosi e la prognosi e nel disegnare nuove strategie terapeutiche. Il **cancro** è il campo più studiato in cui il ruolo degli esosomi è stato in vari processi come diagnosi, prognosi, metastasi e terapia.

Mesotelioma maligno ed esosomi

La prima ricerca sugli esosomi ed il MM era mirata ad identificare gli esosomi ed il loro carico proteico partendo dal liquido pleurico di pazienti affetti da neoplasia.

Gli esosomi sono stati isolati mediante ultracentrifugazione a gravità di saccarosio dal liquido pleurico di pazienti affetti da MM, cancro del polmone, cancro della mammella o cancro dell'ovaio. La tecnica di spettrometria di massa "matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight" (MALDI-TOF) ha identificato grandi quantità di peptidi provenienti dalle immunoglobuline e da vari fattori del complemento, oltre a proteine esosomiali precedentemente non descritte, come la proteina sorting nexin (SNX25), la proteina B-cell traslocazione delle cellule B 1 (BTG1) e il fattore derivato dall'epitelio pigmentato (PEDF). Sia BTG1 sia PEDF sono in grande abbondanza negli esosomi provenienti da processi maligni e sono

verosimilmente coinvolti nella biogenesi degli esosomi tumorali. Inoltre, l'analisi Western blot ha verificato la presenza della molecola MHC classe II, HSP90 e delle immunoglobuline G e M.

È stata condotta una ricerca anche sulla **composizione proteica degli esosomi** secreti dalle cellule tumorali di MM. La conoscenza degli antigeni tumorali in questa malattia è limitata e le ricerche volte in tal senso sono state utili per delineare il carico proteomico degli esosomi di MM. Sono state create linee di cellule tumorali di MM; gli esosomi sono stati isolati mediante ultra-centrifugazione e sono stati caratterizzati mediante TEM per la loro morfologia e le loro dimensioni. Le proteine esosomiali sono state sottoposte all'analisi MALDI-TOF, tra queste, quelle confermate anche dall'analisi Western blot sono le seguenti: fascina, -tubulina, HSC70 e HSP90. Inoltre, come riportato in sistemi in vivo, questi esosomi tumorali erano arricchiti con molecole MHC di classe I e gli autori hanno indicato anche alti livelli di annexine, che potrebbero essere coinvolte nella dinamica membrana-citoscheletro. Questi studi hanno rivelato diverse proteine che non erano ancora state indicate negli esosomi tumorali o nelle linee cellulari di MM, fornendo così nuove informazioni sul MM e sugli esosomi tumorali, che potrebbero far progredire la nostra comprensione della malattia.

Nel 2005, alcuni autori hanno pubblicato interessanti studi sulle **funzioni immunologiche degli esosomi** secreti da cellule tumorali (cancro al seno e mesotelioma) e hanno dimostrato come questi esosomi tumorali alterassero l'espressione del recettore NKG2D sui leucociti ematici bersaglio. Gli esosomi secreti da queste cellule tumorali di MM si sono rivelati positivi all'espressione di ligandi NKG2D e ciò era direttamente correlato alla capacità degli esosomi di MM di diminuire la capacità delle cellule T effettrici ad uccidere le cellule bersaglio. Con queste ricerche è stato dimostrato che le due linee cellulari di MM utilizzate avevano un'alta espressione dei ligandi NKG2D e sembravano essere correlate con l'attitudine degli esosomi di MM a sopprimere più efficacemente l'espressione di NKG2D sul bersaglio. Complessivamente, questa ricerca indica un ruolo degli esosomi di MM nell'alterare fenotipicamente le cellule immunitarie in modo da aiutare le cellule tumorali nell'evasione immunitaria, grazie alla presenza di legami con gli esosomi attraverso la presenza di ligandi esosomiali per NKG2D.

Un campo promettente della ricerca terapeutica sul cancro si concentra sull'uso di antigeni associati al tumore (TAA) presenti negli esosomi tumorali come modalità di **immunoterapia basata sulle cellule dendritiche**. Il concetto è che gli esosomi tumorali contenenti TAA, secreti per lo più da tumori immunogenici, sono in grado di indurre risposte antitumorali in modelli murini attraverso l'attivazione delle cellule dendritiche. Si tratta di un interessante progresso in questo campo, in quanto il MM è considerato un tumore non immunogenico, di cui si conoscono pochissimi TAA. Tali ricerche erano volte a valutare se gli esosomi di MM fossero potenziali fonti di antigeni per l'immunoterapia basata sulle cellule dendritiche. Inizialmente, una dose letale di cellule tumorali di MM è stata iniettata in topi BALB/c. Dopo sette giorni di formazione del tumore nei topi, è stata iniettata una singola dose in bolo di cellule dendritiche per l'immunoterapia. Queste cellule dendritiche, tuttavia, erano state caricate con esosomi di MM o lisato di cellule di MM per verificare se gli esosomi avessero una capacità di priming immunogenico sulle cellule dendritiche. La sopravvivenza complessiva mediana dei topi portatori di tumore è risultata significativamente aumentata per i topi sottoposti ad immunoterapia con cellule dendritiche caricate con esosomi del tumore rispetto al lisato cellulare, indicando il potenziale terapeutico degli esosomi nel MM come approccio immunoterapico, così come per altri tumori non immunogenici.

Altre ricerche relative agli esosomi nel MM si sono concentrate sulla **formazione di nanotubi a tunnel (TnT)**, le estensioni cellulari basate sull'actina coinvolte nel trasporto intercellulare del carico. La relazione tra la formazione dei TnT e i loro effetti comunicativi con la tumorigenesi del MM è poco nota; da questa premessa nasce il razionale dello studio degli esosomi come possibili mediatori della formazione di TnT nel MM. Gli esosomi di MM sono stati purificati e aggiunti a cellule di MM coltivate in modo indipendente ed è stato riscontrato che in queste condizioni le cellule tumorali di MM hanno prodotto un numero significativamente maggiore di TnT rispetto alle cellule coltivate senza l'aggiunta di esosomi esogeni. I ricercatori hanno indicato

che gli esosomi tumorali aggiunti si arricchivano di TnT, processo che potrebbe essere implicato nella modalità di interazione degli esosomi con le cellule bersaglio. Inoltre, è stato dimostrato che gli esosomi hanno la capacità di localizzarsi e "surfare" sui filipodia (proiezioni cellulari simili ai filamenti di actina) prima dell'internalizzazione. L'assorbimento degli esosomi di MM da parte delle cellule di MM ha apparentemente facilitato un maggior numero di connessioni TnT tra le cellule tumorali e le cellule connesse avevano un numero quasi doppio di lipopodi. Nel complesso, è possibile che gli esosomi di MM possano agire come agenti di induzione della formazione di TnT tra cellule tumorali di MM e forse questa connessione rappresenta un importante canale di informazione cellulare vitale per la progressione del MM.

Per migliorare la **comprensione del secretoma del MM**, alcuni ricercatori hanno pubblicato uno studio sul carico proteomico esosomiale derivato dal MM. Attraverso l'uso della proteomica quantitativa, hanno delineato la composizione proteica degli esosomi provenienti da quattro linee cellulari umane di MM e hanno identificato un totale di 2178 proteine da tutte le cellule, con 631 proteine esosomiali comuni. Tra le proteine degli esosomi di MM gli studiosi hanno delimitato i biomarcatori candidati in base alla rilevanza clinica, tra cui gli isotipi della tubulina TUBB4A, Q8IWP6 e B3KPS3; la galectina-3-binding e LGB3P; alfa enolasi, annexina 1 e G6PD. Inoltre, è stato dimostrato che gli esosomi che contengono mesotelina, calreticulina, vimentina e superossido dismutasi sono altamente espressi nel MM. Inoltre, i risultati di questa ricerca hanno rivelato la presenza di 26 componenti immunoregolatori negli esosomi di MM (come l'oncostatina-M recettore dell'oncostatina (OSMR), la proteina 1 associata alla resistenza ai farmaci (ABCC1) ed il recettore attivante SUMO-1 recettore attivante SUMO-1 (SAE1)), oltre a 16 antigeni di derivazione tumorale, tra cui il glican-1, che è stato identificato in molti esosomi di derivazione tumorale ed è considerato come un biomarcatore potenzialmente prezioso per il cancro del pancreas. È importante notare che questo studio ha anche fornito preziose informazioni che hanno dimostrato che gli esosomi di MM regolano le cellule del microambiente tumorale, aumentando la capacità migratoria di fibroblasti e cellule endoteliali in vitro. Nel complesso, i risultati ottenuti implicano che gli esosomi di MM contengono molte proteine rilevanti per il cancro, l'angiogenesi, le metastasi, la migrazione e la regolazione immunitaria.

La nota complessità del secretoma del MM è stata studiata anche utilizzando l'analisi proteomica iTRAQ. Utilizzando 6 linee cellulari di MM a confronto con tre colture primarie di cellule mesoteliali, si è visto che i secretomi delle cellule di MM contenevano più proteine esosomiali.

Un'ulteriore ricerca ha analizzato un piccolo numero di campioni di pazienti dimostrando l'utilità potenziale delle vescicole extracellulari (tra cui esosomi, microvescicole e corpi apoptotici) nella diagnosi di MM benigno o maligno. I rapporti di mesotelina, galectina-1, osteopontina e VEGF erano più alti nei campioni di MM rispetto alla pleurite benigna, mentre l'angiopoietina-1 esosomiale era più alta nei campioni di MPM. I risultati sono incoraggianti sebbene debbano essere convalidati con popolazioni di campioni più ampie.

Sebbene sia stata posta maggiore enfasi sulla firma proteomica esosomiale, una ricerca suggerisce che una specifica firma di microRNA esosomiali può discriminare il mesotelioma pleurico maligno (MPM) dai soggetti con pregressa esposizione all'amianto (PAE). Questo studio è stato condotto su un numero ridotto di soggetti e deve essere verificato in coorti più ampie.

Successivamente, un gruppo che ha utilizzato il modello stromale del tumore MM ha dimostrato che gli esosomi derivati da cellule endoteliali e arricchiti in miR-126 erano distribuiti in modo differenziato all'interno dello stroma. I risultati dello studio hanno comunicato un ruolo importante per quanto riguarda il trasferimento esosomiale di miR-126 nella risposta antitumorale nel MM. Lo stesso gruppo ha inoltre dimostrato che gli sferoidi derivati da MPM, se trattati con l'esosoma arricchito di miR-126, hanno mostrato un effetto antitumorale iniziale. Tuttavia, in seguito, l'effetto è svanito a causa della perdita di miR-126 dalle cellule, che poteva essere ripristinata con l'inibizione della secrezione dell'esosoma.

Alcuni ricercatori hanno studiato il **carico proteomico e gli effetti di modulazione genica** degli esosomi provenienti da cellule esposte all'amianto. Questa ricerca è iniziata mettendo in coltura cellule epiteliali polmonari (BEAS2B) o macrofagi (THP1) (le prime cellule note a incontrare l'amianto durante l'inalazione) con l'amianto e isolando i loro esosomi. Questi esosomi di amianto sono stati sottoposti a spettrometria tandem di massa per l'identificazione delle proteine. È stato dimostrato che 145 proteine sono state identificate negli esosomi delle cellule epiteliali e 55 erano significativamente diverse in termini di quantità nel gruppo esposto all'amianto, tra queste vi erano l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno 1, la vimentina, la trombospondina e il glicano-1, e il glican-1.

È stato inoltre scoperto che gli esosomi provenienti da cellule epiteliali esposte all'asbesto hanno portato a cambiamenti genetici nelle cellule mesoteliali umane pleuriche target (HPM3), che ricordavano la transizione da epiteliale a mesenchimale (EMT): down-regulation di E-caderina, desmoplakina e dell'antagonista del recettore IL1. Dopo l'analisi proteomica degli esosomi dei macrofagi, sono state identificate 785 proteine. Di queste proteine, 32 erano presenti in quantità diverse tra esosomi del gruppo esposto all'amianto e del gruppo di controllo. Quindici di queste proteine esosomali erano più abbondanti nel gruppo dell'amianto rispetto al controllo ed è interessante notare che la vimentina e la SOD erano tra quelle che mostravano un incremento negli esosomi dei macrofagi dopo l'esposizione all'amianto. In risposta all'esposizione di esosomi di amianto provenienti dai macrofagi a cellule mesoteliali primarie bersaglio, sono state dimostrate significative alterazioni genetiche nelle cellule mesoteliali: 498 cambiamenti genetici in totale, con 241 up-regulation e 257 down-regulation. Come controllo positivo, il gruppo ha utilizzato fibre di amianto su cellule mesoteliali e ha scoperto che 206 geni erano reciprocamente alterati negli esosomi o nel gruppo di cellule mesoteliali esposte all'amianto. Questa interessante scoperta implica che gli esosomi provenienti da cellule esposte all'amianto siano in grado di modificare la genetica delle cellule mesoteliali in modo simile a come le fibre di amianto cambierebbero da sole.

Come passo iniziale in direzione di uno **studio in vivo**, i ricercatori hanno iniziato a definire la firma proteomica degli esosomi del siero di topo in un modello di esposizione all'amianto. Topi C57/Bl6 sono stati esposti all'amianto tramite aspirazione orofaringea e, 56 giorni dopo, gli esosomi del siero sono stati isolati tramite l'analisi proteomica. Anche in questo caso, utilizzando la spettrometria di massa tandem per l'identificazione delle proteine, è stato dimostrato che negli esosomi del siero di topo erano presenti 376 proteine quantificabili, con la maggior parte delle proteine più abbondanti nel gruppo esposto all'amianto. Di queste proteine più abbondanti nel gruppo esposto all'amianto, tre sono state convalidate dall'analisi Western blot, tutte proteine della fase acuta: l'aptoglobina; ceruloplasmina, la glicoproteina che trasporta il rame, già vista aumentare nel sangue di pazienti con MM e negli individui esposti all'amianto e la fibulina-1 risulterebbe implicata nell'esposizione all'amianto e nel MM. Questi risultati sugli esosomi secreti dalle cellule di mesotelioma rispetto alle cellule mesoteliali sane hanno dimostrato che le cellule tumorali secernono rispetto alle cellule mesoteliali sane, hanno dimostrato che le cellule tumorali secernono modelli di miRNA rispetto alle loro controparti sane. In particolare, è stato evidenziato che il miR-16-5p è significativamente aumentato nell'espressione all'interno degli esosomi rilasciati dalle cellule tumorali. L'ipotesi è che le cellule di mesotelioma abbiano sviluppato un meccanismo di secrezione preferenziale per liberarsi del miR-16-5p, grazie alle sue consolidate funzioni di soppressione tumorale. Molteplici esperimenti hanno indicato la funzionalità di questa secrezione e la possibilità di colpire questo fenotipo pro-tumorale.

Inoltre, un ulteriore studio ha preso in considerazione **diversi tipi di tumore** umano analizzandone, tramite un'analisi proteomica completa, le vescicole e particelle extracellulari (EVP). Tale ricerca ha dimostrato che le proteine EVP possono essere usate per il rilevamento del tipo di cancro. Concentrandosi sui dati relativi al mesotelioma, il documento ha dimostrato che le immunoglobuline erano la principale famiglia di proteine trovate nelle EVP con un'alta frequenza nel mesotelioma. Lo studio ha suggerito che le firme proteiche EVP

derivate dal plasma potrebbero essere per l'individuazione del tipo di cancro nei pazienti. Questi risultati, sebbene incoraggianti, necessitano di ulteriori convalide e test in una coorte più ampia di pazienti per confermare i risultati.

Oltre agli studi pubblicati sopra citati, sono state effettuate numerose ricerche con cellule di mesotelioma umano, plasma di campioni esposti all'**amianto** e campioni di pazienti affetti da mesotelioma. Sono stati eseguiti anche studi con esosomi plasmatici isolati da volontari sani, dal gruppo non-tumorale esposto ad amianto e dai gruppi di mesotelioma esposti all'asbesto. Sebbene il numero di esosomi per ml di plasma non erano differenti nei vari gruppi, la quantità di proteine esosomiali era maggiore nei diversi gruppi patologici rispetto ai controlli. L'analisi proteomica eseguita su questi campioni ha mostrato la presenza di proteine legate alla coagulazione negli esosomi dei gruppi patologici (mesotelioma e esposti all'amianto) rispetto ai controlli. Gli esosomi plasmatici del gruppo di controllo presentavano una firma comprendente immunoglobuline, lipoproteine e proteine legate alle piastrine. Questi dati indicano un'alterata sorveglianza immunitaria nei campioni di MM in concomitanza con l'aumento dei fattori di coagulazione.

Conclusioni

Gli studi sopra descritti forniscono un quadro iniziale per la comprensione dei possibili biomarcatori e della biologia sottostante al MM e all'esposizione all'amianto. Sulla base dei loro risultati, la ricerca può tentare di identificare ulteriormente i mezzi per la diagnosi precoce dell'esposizione all'amianto o dello sviluppo di malattie correlate all'amianto, nonché di scoprire i tanto necessari bersagli terapeutici.

Inoltre, la capacità di comprendere le meccaniche dello sviluppo e della progressione del MM è un ambito importante che può essere utilizzato per il trattamento dei pazienti affetti da MM.

In definitiva, ci auguriamo che la ricerca sugli esosomi nel MM continui su questa traiettoria in avanti e che vengano fatte altre scoperte significative per capire come l'amianto causi il cancro e trovare il modo di identificare l'esposizione pericolosa all'amianto e di individuare precocemente il cancro prima di una diagnosi fatale.

Sebbene sia molto prolifico, il campo della ricerca sugli esosomi ha offerto molte opportunità per il progresso in campo medico, ma non è privo di sfide e limitazioni. Alcune aree di miglioramento includono i metodi di isolamento degli esosomi, la comprensione dei meccanismi di biogenesi e la caratterizzazione degli esosomi. I progressi ottenuti in questo ambito sono notevoli e consentono di sperare in potenziali trattamenti e/o tecnologie rivoluzionarie e futuribili.

Reference

- Raposo, G.; Stoorvogel, W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 2013, 200, 373–383.
- Munson, P.; Shukla, A. Exosomes: Potential in cancer diagnosis and therapy. *Medicines* 2015, 2, 310–327.
- Xu, K.; Jin, Y.; Li, Y.; Huang, Y.; Zhao, R. Recent progress of exosome isolation and peptide recognition-guided strategies for exosome research. *Front. Chem.* 2022, 10, 844124.
- Teixeira, J.H.; Silva, A.M.; Almeida, M.I.; Barbosa, M.A.; Santos, S.G. Circulating extracellular vesicles: Their role in tissue repair and regeneration. *Transfus. Apher. Sci.* 2016, 55, 53–61.
- Smalheiser, N.R. Exosomal transfer of proteins and RNAs at synapses in the nervous system. *Biol. Direct* 2007, 2, 35.
- Ibrahim, A.G.-E.; Cheng, K.; Marbán, E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Rep.* 2014, 2, 606–619.
- Vicencio, J.M.; Yellon, D.M.; Sivaraman, V.; Das, D.; Boi-Doku, C.; Arjun, S.; Zheng, Y.; Riquelme, J.A.; Kearney, J.; Sharma, V.; et al. Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015, 65, 1525–1536.
- Madison, M.N.; Okeoma, C.M. Exosomes: Implications in HIV-1 Pathogenesis. *Viruses* 2015, 7, 4093–4118.
- Properzi, F.; Logozzi, M.; Fais, S. Exosomes: The future of biomarkers in medicine. *Biomark Med.* 2013, 7, 769–778.
- Moore, C.; Kosgodage, U.; Lange, S.; Inal, J.M. The emerging role of exosome and microvesicle- (EMV-) based cancer therapeutics and immunotherapy. *Int. J. Cancer* 2017, 141, 428–436.
- Syn, N.L.; Wang, L.; Chow, E.K.-H.; Lim, C.T.; Goh, B.-C. Exosomes in cancer nanomedicine and immunotherapy: Prospects and challenges. *Trends Biotechnol.* 2017, 35, 665–676.
- Li, B.; Cao, Y.; Sun, M.; Feng, H. Expression, regulation, and function of exosome-derived miRNAs in cancer progression and therapy. *FASEB J.* 2021, 35, e21916.
- Zhou, Y.; Zhang, Y.; Gong, H.; Luo, S.; Cui, Y. The role of exosomes and their applications in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 12204.
- Li, C.; Teixeira, A.F.; Zhu, H.-J.; Dijke, P.T. Cancer associated-fibroblast-derived exosomes in cancer progression. *Mol. Cancer* 2021, 20, 154.
- Nafar, S.; Nouri, N.; Alipour, M.; Fallahi, J.; Zare, F.; Tabei, S.M.B. Exosome as a target for cancer treatment. *J. Investig. Med.* 2022, 70, 1212–1218.
- World Health Organization/International Agency for Research on Cancer. Asbestos (chrysotile, amosite, crocidolite, tremolite, actinolite, and anthophyllite). In *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans A Review of Human Carcinogens*; International Agency for Research on Cancer: Lyon, France, 2012; Volume 100C, pp. 219–309.
- Pira, E.; Donato, F.; Maida, L.; Discalzi, G. Exposure to asbestos: Past, present and future. *J. Thorac. Dis.* 2018, 10 (Suppl. 2), S237–S245.
- Frank, A.L.; Joshi, T. The global spread of asbestos. *Ann. Glob. Health* 2014, 80, 257–262.
- Berman, D.W.; Crump, K.S. Update of potency factors for asbestos-related lung cancer and mesothelioma. *Crit. Rev. Toxicol.* 2008, 38 (Suppl. 1), 1–47.
- Markowitz, S.B.; Levin, S.M.; Miller, A.; Morabia, A. Asbestos, asbestosis, smoking, and lung cancer. New findings from the North American insulator cohort. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2013, 188, 90–96.
- Mossman, B.T.; Churg, A. Mechanisms in the pathogenesis of asbestosis and silicosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998, 157 Pt 1, 1666–1680.
- Sen, D. Working with asbestos and the possible health risks. *Occup. Med.* 2015, 65, 6–14.
- Yap, T.A.; Aerts, J.G.; Popat, S.; Fennell, D.A. Novel insights into mesothelioma biology and implications for therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2017, 17, 475–488.
- Bard, M.P.; Hegmans, J.P.; Hemmes, A.; Luider, T.M.; Willemsen, R.; Severijnen, L.-A.A.; van Meerbeeck, J.P.; Burgers, S.A.; Hoogsteden, H.C.; Lambrecht, B.N. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2004, 31, 114–121.
- Hegmans, J.P.; Bard, M.P.; Hemmes, A.; Luider, T.M.; Kleijmeer, M.J.; Prins, J.-B.; Zitvogel, L.; Burgers, S.A.; Hoogsteden, H.C.; Lambrecht, B.N. Proteomic analysis of exosomes secreted by human mesothelioma cells. *Am. J. Pathol.* 2004, 164, 1807–1815.
- Wolfers, J.; Lozier, A.; Raposo, G.; Regnault, A.; Théry, C.; Masurier, C.; Flament, C.; Pouzieux, S.; Faure, F.; Tursz, T.; et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat. Med.* 2001, 7, 297–303.
- Clayton, A.; Tabi, Z. Exosomes and the MICA-NGK2D system in cancer. *Blood Cells Mol. Dis.* 2005, 34, 206–213.
- Mahaweni, N.M.; Kaijen-Lambers, M.E.; Dekkers, J.; Aerts, J.G.; Hegmans, J.P. Tumour-derived exosomes as antigen delivery carriers in dendritic cell-based immunotherapy for malignant mesothelioma. *J. Extracell Vesicles* 2013, 2, 22492.
- Thayanithy, V.; Babatunde, V.; Dickson, E.L.; Wong, P.; Oh, S.; Ke, X.; Barlas, A.; Fujisawa, S.; Romin, Y.; Moreira, A.L.; et al. Tumor exosomes induce tunneling nanotubes in lipid raft-enriched regions of human mesothelioma cells. *Exp. Cell Res.* 2014, 323, 178–188.
- Heusermann, W.; Hean, J.; Trojer, D.; Steib, E.; von Bueren, S.; Graff-Meyer, A.; Genoud, C.; Martin, K.; Pizzato, N.; Voshol, J.; et al. Exosomes surf on filopodia to enter cells at endocytic hot spots, traffic within endosomes, and are targeted to the ER. *J. Cell Biol.* 2016, 213, 173–184.
- Delage, E.; Cervantes, D.C.; Pénard, E.; Schmitt, C.; Syan, S.; Disanza, A.; Scita, G.; Zurzolo, C. Differential identity of Filopodia and Tunneling Nanotubes revealed by the opposite functions of actin regulatory complexes. *Sci. Rep.* 2016, 6, 39632.
- Greening, D.W.; Ji, H.; Chen, M.; Robinson, B.W.; Dick, I.M.; Creaney, J.; Simpson, R.J. Secreted primary human malignant mesothelioma exosome signature reflects oncogenic cargo. *Sci. Rep.* 2016, 6, 32643. Melo, S.A.; Luecke, L.B.; Kahlert, C.; Fernandez, A.F.; Gammon, S.T.; Kaye, J.; LeBleu, V.S.; Mittendorf, E.A.; Weitz, J.; Rahbari, N.; et al. Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* 2015, 523, 177–182.
- Creaney, J.; Dick, I.M.; Leon, J.S.; Robinson, B.W. A proteomic analysis of the malignant mesothelioma secretome using iTRAQ. *Cancer Genom. Proteom.* 2017, 14, 103–117.
- Javadi, J.; Görgens, A.; Vanky, H.; Gupta, D.; Hjerpe, A.; El-Andaloussi, S.; Hagey, D.; Dobra, K. Diagnostic and prognostic utility of the extracellular vesicles subpopulations present in pleural effusion. *Biomolecules* 2021, 11, 1606.
- Cavalleri, T.; Angelici, L.; Favero, C.; Dioni, L.; Mensi, C.; Bareggi, C.; Palleschi, A.; Rimessi, A.; Consonni, D.; Bordini, L.; et al. Plasmatic extracellular vesicle microRNAs in malignant pleural mesothelioma and asbestos-exposed subjects suggest a 2-miRNA signature as potential biomarker of disease. *PLoS ONE* 2017, 12, e0176680.
- Monaco, F.; Gaetani, S.; Alessandrini, F.; Tagliabracchi, A.; Bracci, M.; Valentino, M.; Neuzil, J.; Amati, M.; Bovenzi, M.; Tomasetti, M.; et al. Exosomal transfer of miR-126 promotes the anti-tumour response in malignant mesothelioma: Role of miR-126 in cancer-stroma communication. *Cancer Lett.* 2019, 463, 27–36.
- Monaco, F.; De Conti, L.; Vodret, S.; Zanotta, N.; Comar, M.; Manzotti, S.; Rubini, C.; Graciotti, L.; Fulgenzi, G.; Bovenzi, M.; et al. Force-feeding malignant mesothelioma stem-cell like with exosome-delivered miR-126 induces tumour cell killing. *Transl. Oncol.* 2022, 20, 101400.
- Munson, P.; Lam, Y.; Dragon, J.; MacPherson, M.; Shukla, A. Exosomes from asbestos-exposed cells modulate gene expression in mesothelial cells. *FASEB J.* 2018, 32, 4328–4342.
- Bruno, R.; Poma, A.M.; Ali, G.; Giannini, R.; Puppo, G.; Melfi, F.; Lucchi, M.; Mussi, A.; Falcone, A.; Chella, A.; et al. Novel prognostic markers for epithelioid malignant pleural mesothelioma. *J. Clin. Oncol.* 2017, 35 (Suppl. 15), e20028.
- Røe, O.D.; Anderssen, E.; Sandeck, H.; Christensen, T.; Larsson, E.; Lundgren, S. Malignant pleural mesothelioma: Genome-wide expression patterns reflecting general resistance mechanisms and a proposal of novel targets. *Lung Cancer* 2010, 67, 57–68.

42. Munson, P.; Lam, Y.; MacPherson, M.; Beuschel, S.; Shukla, A. Mouse serum exosomal proteomic signature in response to asbestos exposure. *J. Cell Biochem.* 2018, 119, 6266–6273.
43. Ghio, A.J.; Stonehuerner, J.; Richards, J.; Devlin, R.B. Iron homeostasis in the lung following asbestos exposure. *Antioxid Redox Signal.* 2008, 10, 371–377.
44. Pass, H.I.; Levin, S.M.; Harbut, M.R.; Melamed, J.; Chiriboga, L.; Donington, J.; Huflejt, M.; Carbone, M.; Chia, D.; Goodglick, L.; et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *N. Engl. J. Med.* 2012, 367, 1417–1427.
45. Munson, P.B.; Hall, E.M.; Farina, N.H.; Pass, H.; Shukla, A. Exosomal miR-16-5p as a target for malignant mesothelioma. *Sci. Rep.* 2019, 9, 11688.
46. Hoshino, A.; Kim, H.S.; Bojmar, L.; Gyan, K.E.; Cioffi, M.; Hernandez, J.; Zambirinis, C.P.; Rodrigues, G.; Molina, H.; Heissel, S.; et al. Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancers. *Cell* 2020, 182, 1044–1061.e18.
47. Rajagopal, C.; Harikumar, K.B. The origin and functions of exosomes in cancer. *Front. Oncol.* 2018, 8, 66.
48. Whiteside, T.L. The emerging role of plasma exosomes in diagnosis, prognosis and therapies of patients with cancer. *Contemp. Oncol.* 2018, 22, 38–40.