

Dottorando: Pietro Bertino

Tutore: Prof G. Gaudino

Relazione del secondo anno

CARCINOGENESI E TERAPIA FARMACOLOGICA DEL MESOTELIOMA MALIGNO DA ASBESTO

□ INTRODUZIONE

Il Mesotelioma Maligno (MM) è un tumore primario che colpisce le superfici sierose, la quale incidenza è stimata drammaticamente in aumento nei prossimi dieci anni in Europa [1], mentre in USA negli ultimi anni, la frequenza è già aumentata del 90% [2]. La natura altamente aggressiva del MM e la sua resistenza alle terapie convenzionali, sono responsabili della prognosi di questi pazienti (12-18 mesi dalla diagnosi) [3]. Nonostante l'associazione tra chirurgia, chemio-terapia e radio-terapia possa dare alcuni benefici negli stadi precoci della malattia [4], nuove e più efficaci terapie sistemiche per questo tumore devono essere urgentemente sviluppate.

E' stato osservato che fibre e minerali fibrosi, come l'asbesto e l'erionite sono strettamente correlati con l'insorgenza del MM [5]. L'asbesto è una risorsa naturale ubiquitaria riferibile a diversi tipi di minerali fibrosi formati da processi terrestri e composti da microscopici agglomerati di fibre. Asbesto è conosciuto come carcinogeno umano di classe A [6]. Le fibre di asbesto inducono aberrazioni cromosomiche tramite un'azione meccanica [7] e possono promuovere l'apoptosi nelle cellule mesoteliali attraverso la produzione di radicali dell'ossigeno [8] e danni al DNA [9].

L'alta incidenza di MM nei villaggi presso Karain in Turchia è stato associato con l'esposizione ambientale all'erionite fibrosa, una forma altamente patogena della zeolite, simile in apparenza e proprietà all'asbesto [10]. Erionite è un potente

mutageno [11], considerato più carcinogeno dell'asbesto sia nell'uomo che nei roditori [12] e la sua capacità trasformante è probabilmente dovuta alla peculiare proprietà di accumulare ferro sulla sua superficie [13]. Quindi, similmente come avviene per l'asbesto, l'esposizione alle fibre di erionite porta alla generazione di metaboliti reattivi dell'ossigeno da parte dei macrofagi [14] e all'aumento dei livelli di mRNA dei proto-oncogeni c-fos e c-jun [15, 16]. L'erionite dell'Oregon ha proprietà genotossiche [17] e induce un'alta incidenza di MM dopo inoculazione intraperitoneale o inalazione [18], suggerendo che questo tipo di zeolite sia pericolosa per l'uomo, sebbene non siano ancora disponibili dati epidemiologici.

Sebbene l'asbesto sia la maggior causa riconosciuta del Mesotelioma Maligno [19], l'infezione da SV40 è stata proposta come possibile concausa [20]. Le cellule mesoteliali SV40 positive sono meno sensibili alla citotossicità indotta da asbesto e le cellule sopravvissute sono soggette ad alta instabilità genomica [21] che può portare alla loro trasformazione [22].

La trasformazione delle cellule mesoteliali segue quindi un percorso progressivo che vede la cooperazione di fibre di asbesto, infezione da SV40 e via di trasduzione della PI3chinasi/Akt [23]. Nel corso del primo anno di dottorato, sulla base di questo assunto, sono stati condotti esperimenti di carcinogenesi utilizzando fibre di asbesto ed erionite. Questi saggi di trasformazione hanno dimostrato l'efficacia dell'erionite nel trasformare le cellule mesoteliali senza la cooperazione di SV40. La carcinogenicità superiore a qualsiasi altra fibra di asbesto finora studiata, ci ha suggerito di approfondire, in quest'ultimo anno, il meccanismo di trasformazione dell'erionite.

Numerosi fattori di crescita e relativi recettori sono coinvolti nella trasformazione e mantenimento del MM come Epidermal Growth Factor (EGF), Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), basic-Fibroblast Growth Factor (b-FGF), Hepatocyte Growth Factor (HGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [24], Platelet Derived Growth Factor (PDGF) [25, 26] e Transforming Growth Factor-beta (TGF- β). È stato dimostrato che l'aumento dell'attività di un determinato recettore nelle linee di MM rispetto alle linee mesoteliali normali, rende possibile il trattamento con inibitori specifici per limitarne la proliferazione, come nel caso del PDGFR- β [26, 27]. Un farmaco di attuale interesse è Gleevec (Imatinib mesilato, STI571; Novartis Pharma AG, Basel, Svizzera) [28, 29] che, oltre ad essere un inibitore selettivo per le

tirosina chinasi abl e bcr-abl (proteina di fusione coinvolta nella leucemia mieloide cronica), è risultato attivo anche su PDGFR- β , c-Kit e c-fms [30, 31].

Recentemente, il rinnovato interesse nello studio del trattamento del MM ha portato a trial clinici con risultati promettenti di diversi chemioterapici di nuovo sviluppo come Gemcitabina (Gemzar; Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN) e Alimta (Pemetrexed, MTA, LY231514; Eli Lilly and Company) [32]. La Gemcitabina (2'-difluorodeossicitidina) è un nucleoside analogo della citidina, attivo come singolo agente o in combinazione con il cisplatino ed altri farmaci contro diversi tumori solidi [33]. Inoltre, la Gemcitabina inibisce la ribonucleotide reduttasi, bloccando la sintesi di nuovo DNA con un meccanismo "invisibile" al meccanismo di riparazione del DNA, conducendo la cellula verso il percorso apoptotico [34, 35]. L'Alimta è un analogo dei folati che sopprime la crescita tumorale impedendo sia la sintesi del DNA che il metabolismo dei folati tramite l'inibizione della diidrofolati reduttasi (DHFR) e della glicinamide ribonucleotide formil trasferasi (GARF) [36].

Esperimenti condotti precedentemente nel laboratorio di Biologia Molecolare hanno dimostrato che STI571 utilizzato in combinazione con la Gemcitabina sulle cellule di mesotelioma induce citotossicità ed apoptosi con un effetto sinergico.

Nel corso del primo anno di dottorato, è stata dimostrata la sinergia dell'Alimta in combinazione con STI571. Lo scopo del secondo anno è stato quello di saggiare l'effetto delle 2 combinazioni terapeutiche su altre linee cellulari di mesotelioma e sul modello murino recentemente sviluppato in collaborazione con l'IST di Genova.

I composti che hanno come obiettivo le proteine implicate nel controllo del ciclo cellulare hanno la capacità di interferire con l'abilità delle cellule tumorali di proliferare in modo controllato, portando alla catastrofe genetica e alla conseguente apoptosi. Le chinasi Aurora controllano i punti critici del ciclo cellulare e sono determinanti per la progressione e la mitosi.

Le Aurora, sono una piccola famiglia di 3 serina/treonina chinasi: Aurora-A, B e C. Le funzioni delle chinasi Aurora sono associate con la maturazione dei centrosomi, l'organizzazione del fuso, la separazione dei cromosomi e la condensazione del DNA [37, 38]. Esse sono iperespresse in diverse linee cellulari tumorali. In particolare Aurora-A, il cui gene è localizzato in posizione 20q13, una regione cromosomica frequentemente amplificata nei tumori umani, è iperespressa in diversi tipi di tumore [39].

Un inibitore a basso peso molecolare per le chinasi Aurora, PHA-680632, è stato identificato e testato per la sua attività antiproliferativa in diverse linee cellulari dal laboratorio dell'unità oncologica del Nerviano Medical Sciences (già Centro Ricerche Pharmacia di Nerviano)[40]. Scopo principale dell'ultimo anno di dottorato è stato di sviluppare un modello "in vivo" di mesotelioma, su cui è stata valutata l'inibizione della crescita tumorale a seguito del trattamento con questo nuovo e promettente agente farmacologico.

□ RISULTATI

CARCINOGENESI *in vitro*

Durante il primo anno di dottorato sono stati condotti studi di carcinogenesi utilizzando diverse tipologie di amianto ed erionite. Le cellule mesoteliali umane (HMC) utilizzate, derivavano da essudati pleurici di pazienti affetti da patologie non neoplastiche. Le cellule primarie venivano utilizzate nei primi passaggi in coltura conseguenti all'isolamento o immortalizzate con gli antigeni virali di SV40. L'immortalizzazione delle cellule umane primarie con parte del genoma di SV40, è stato da noi stessi osservato condurre all'attivazione di numerose vie proliferative ed antiapoptotiche. Nonostante questo sistema sia stato finora il più utilizzato per gli studi di carcinogenesi del mesotelioma, non è in alcun modo riconducibile alle condizioni fisiologiche ritrovabili nell'uomo [41, 42]. L'utilizzo di cellule primarie, invece non permette di ottenere risultati riproducibili per tutta la durata degli esperimenti vista la naturale senescenza a cui vanno incontro e la variabilità tra cellule derivanti da pazienti diversi. I limiti dei sistemi cellulari finora utilizzati, ci hanno condotto verso l'uso delle HMC TERT provenienti dal laboratorio del Dr. James Rheinwald di Harvard. La perdita della subunità hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase), è un fenomeno che interessa tutte le cellule umane primarie isolate in coltura [43]. Il conseguente accorciamento dei telomeri, conduce ad un progressiva perdita di materiale genetico, causando alterazioni del genoma, senescenza e anche la morte della cellula. La trasfezione della subunità catalitica della telomerasi hTERT ripristina la funzione di mantenimento dei telomeri, permettendo lo svolgersi del ciclo cellulare in cellule in coltura per un tempo illimitato e conferendo al genoma della cellula stabilità genetica [44].

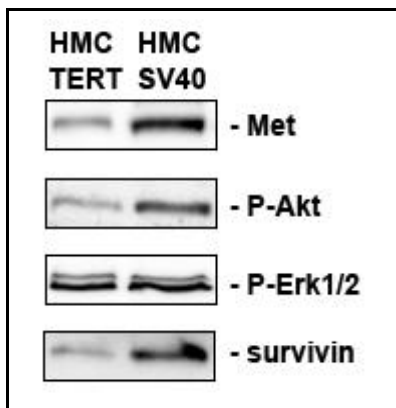


Figura 1 Livello di espressione ed attivazione di vie di trasduzione proliferative e apoptotiche. Western blotting con anticorpi anti Met, Fosfo-Akt, Fosfo-Erk1/2 e survivina condotto su lisati totali di cellule mesoteliali immortalizzate con hTERT (HMC TERT) ed SV40 (HMC SV40) dopo coltura in condizioni di 2% siero per 16 ore.

Esperimenti condotti in precedenza durante questo ciclo di dottorato hanno dimostrato la maggiore capacità trasformante dell'erionite rispetto alle fibre di asbesto.

Allo scopo di determinare il meccanismo con cui l'erionite trasforma le cellule mesoteliali, sono stati valutati gli effetti proliferativi ed apoptotici dell'esposizione a questa tipologia di minerale.

Dopo aver esposto le cellule mesoteliali (HMC hTERT) per 24 ore a $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di erionite proveniente da Karain ed Oregon, all'amosite ed al vetro, è stata valutata la percentuale di cellule in attiva crescita mediante colorazione immunocitochimica con il marcatore di proliferazione cellulare Ki67 e la percentuale di cellule apoptotiche mediante colorazione nucleare con Hoechst.

L'erionite Karain e quella proveniente dall'Oregon, portano ad un aumento statisticamente significativo nella percentuale di cellule proliferanti rispetto all'amosite, al vetro.

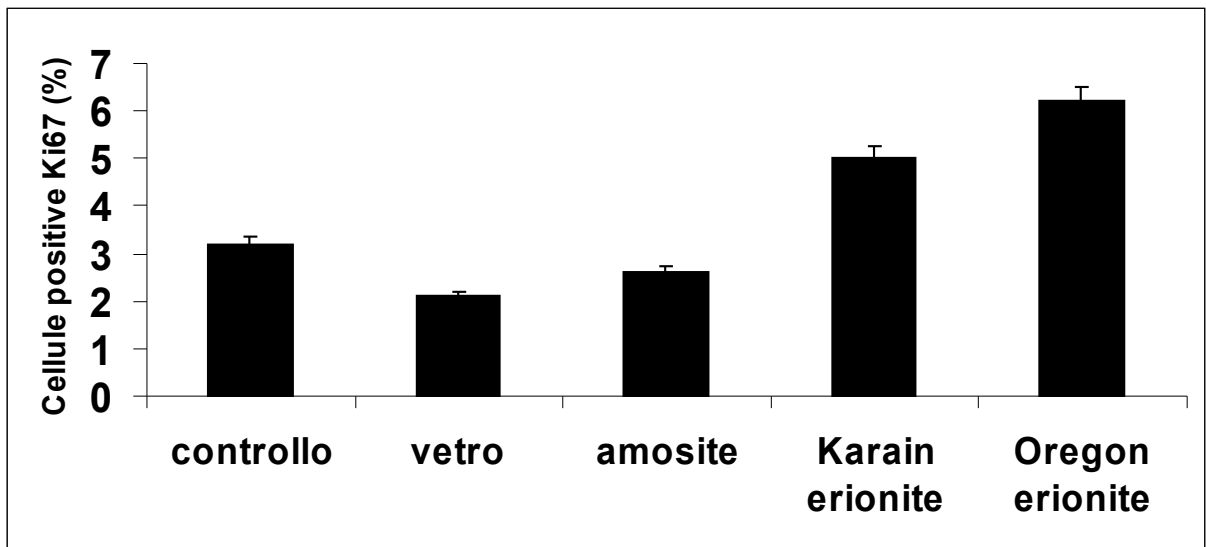


Figura 2 Tasso di proliferazione cellulare dopo esposizione a diverse fibre. Percentuale di cellule positive alla colorazione immunocitochimica con anticorpo anti-Ki67 sul numero totale di cellule contate (n=500) dopo esposizione a $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ per 24 ore delle fibre indicate.

Un numero significativamente più alto di cellule che presentavano la tipica condensazione della cromatina evidenziata dalla colorazione Hoechst, è stato osservato solo per l'amosite e l'agente pro-apoptotico VP16.

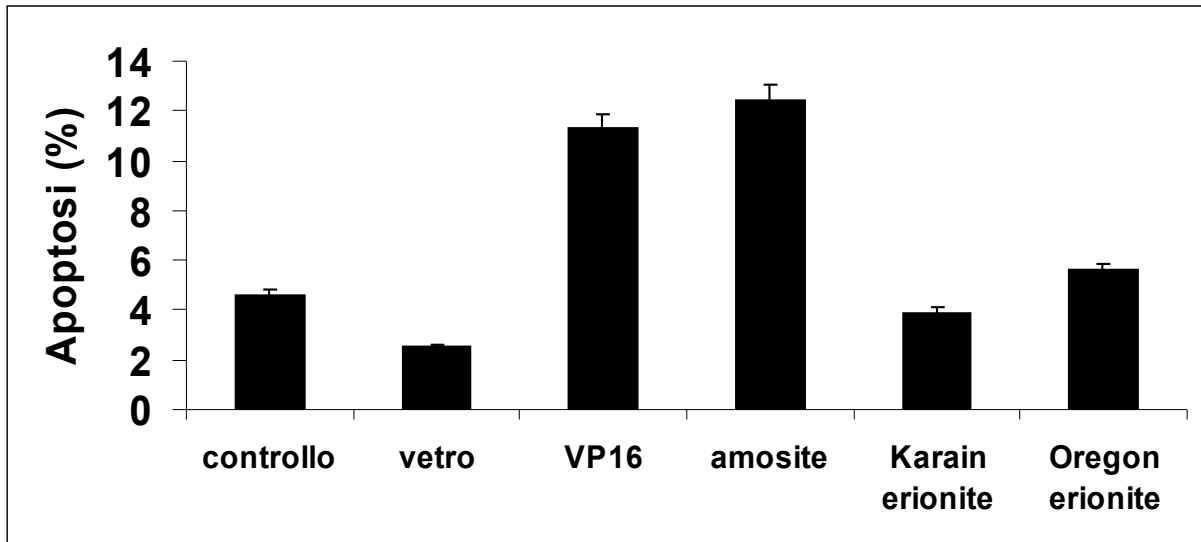


Figura 3 Percentuale di cellule apoptotiche dopo esposizione a diverse fibre. Porzione di cellule apoptotiche dopo esposizione a $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ per 24 ore delle fibre indicate. I dati sono espressi come percentuale di cellule positive alla colorazione Hoechst sul numero totale di cellule contate (n=500).

I dati di proliferazione e morte cellulare indicano che le fibre di erionite e di asbesto hanno un meccanismo trasformante diverso fra loro. Allo scopo di valutare la per le diverse fibre minerali la capacità di indurre stress ossidativo è stata determinata la quantità di 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG) prodotta, mediante un metodo basato sull'analisi cromatografica per HPLC degli addotti contenuti negli estratti provenienti da cellule esposte alle diverse fibre oppure non trattate [45].

Le fibre di Erionite ed Amosite significativamente inducevano danni al DNA rispetto le altre condizioni, ma la quantità di addotti nelle cellule esposte all'erionite era sensibilmente più alta rispetto all'amosite.

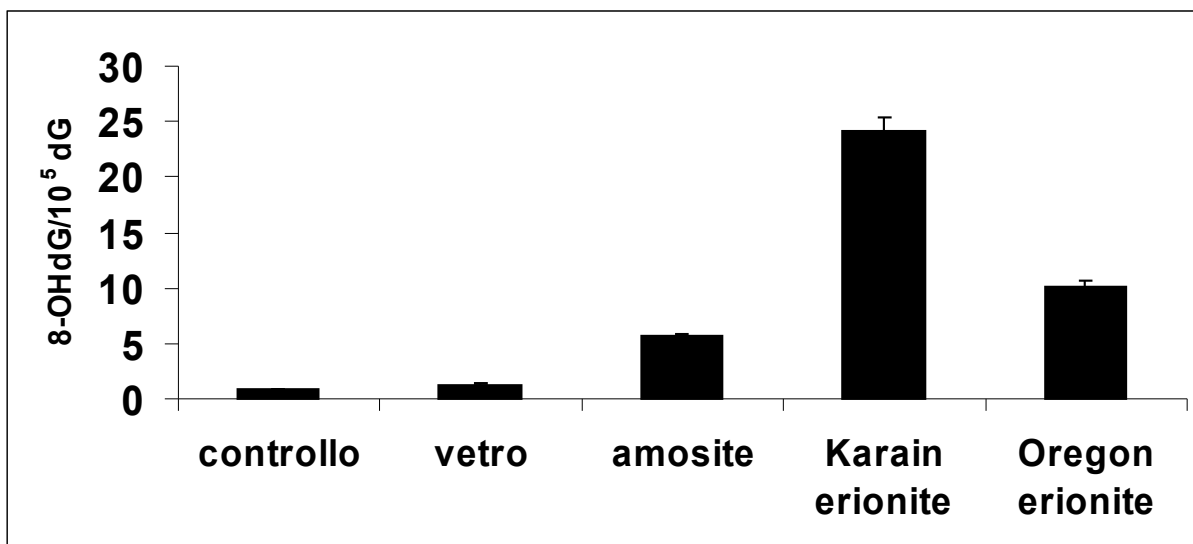


Figura 4 Addotti al DNA in seguito a esposizione alle diverse fibre. Misurazione di 8-OHdG, mediante HPLC e misura dell'assorbanza della radiazione ultravioletta, nelle cellule mesoteliali (HMC TERT) esposte a 10 µg/cm² per 12 ore alle fibre indicate.

I dati in nostro possesso confermano il ruolo dello stress ossidativo nell'indurre mutazioni del DNA, che nel caso dell'erionite, oltre ad essere maggiore rispetto all'asbesto, non è accompagnato da citotossicità. Questa situazione ci porta ad ipotizzare che le mutazioni indotte dai radicali liberi, formati dall'effetto ossidante dell'erionite, vengano "fissate" nelle cellule proliferanti conducendo al fenotipo trasformato.

COMBINAZIONE PEMETREXED-STI571

Esperimenti condotti precedentemente hanno dimostrato che STI571 utilizzato in combinazione con la Gemcitabina sulle cellule di mesotelioma maligno (MMP) induce citotossicità ed apoptosi con un effetto sinergico. Durante il primo anno di dottorato, dopo aver saggiato numerose combinazioni tra chemioterapici e farmaci inibitori di specifiche proteine recettoriali, è stata dimostrata la sinergia tra gli effetti di Pemetrexed e STI571 sulle stesse cellule (MMP). La determinazione di questa ulteriore sinergia, ha avvalorato la nostra ipotesi che, l'utilizzo combinato di un chemioterapico insieme ad un inibitore specifico per un recettore coinvolto nella

sopravvivenza cellulare, possa diminuire la dose efficace del chemioterapico con conseguente diminuzione degli effetti negativi secondari nell'utilizzo clinico.

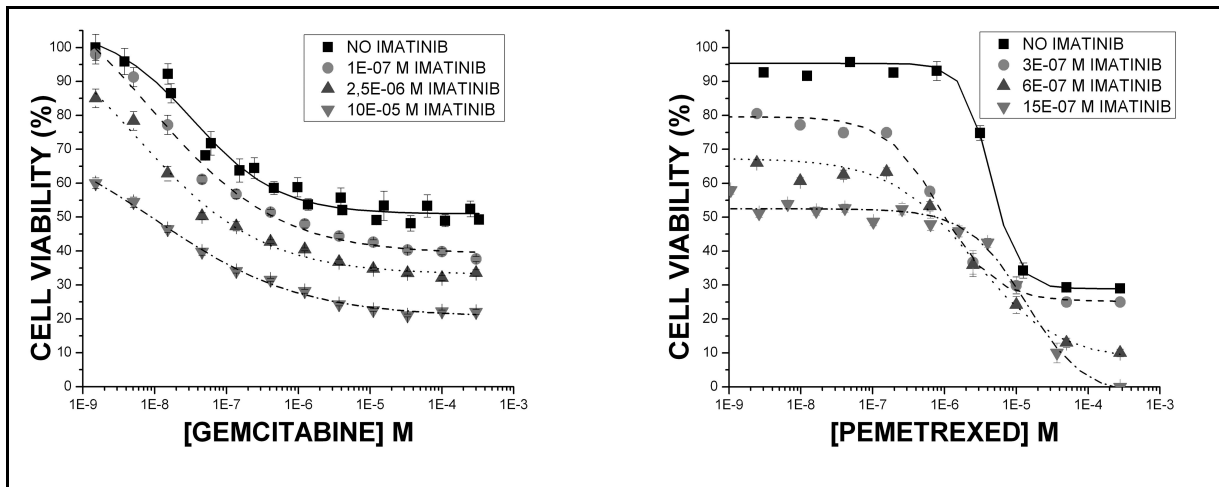


Figura 5 Effetto dose-risposta della sinergia tra PEMETREXED e GEMCITABINA con STI571. Il confronto delle curve di tossicità di Alimta e Gemcitabina alle diverse concentrazioni costanti di Gleevec raffigura oltre che la diminuzione del LC₅₀ anche l'aumento dell'intervallo di efficacia del chemioterapico.

La valutazione dell'interazione tra due farmaci viene condotta mediante la costruzione dell'isobologramma, effettuando prove di citotossicità per determinare la curva dose-risposta di un farmaco in presenza di una concentrazione costante dell'altro. Questo metodo permette di valutare in un solo grafico la variazione della LC₅₀ del chemioterapico considerato, al variare della concentrazione del farmaco usato in associazione. Sui due assi del diagramma cartesiano vengono riportati i valori di LC₅₀ dei farmaci usati singolarmente. La retta che unisce questi punti rappresenta la conservazione dell'isobologramma, ovvero l'andamento che dovrebbero avere i valori di LC₅₀ al variare delle concentrazioni dei due farmaci, nel caso ci fosse tra loro un rapporto di additività. Le deviazioni di questo grafico verso il basso determinano una relazione di sinergia tra i farmaci, mentre l'antagonismo è rappresentato da una deviazione verso l'alto[46, 47].

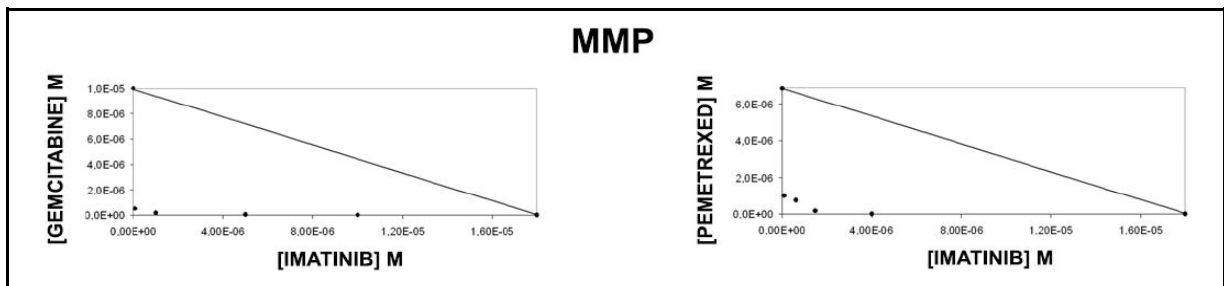


Figura 6 Isobologrammi delle due associazioni terapeutiche utilizzate. Isobologrammi relativi alle combinazioni Gemcitabina/STI571 e Pemetrexed/STI571 su cellule di mesotelioma maligno (MMP) in cui risalta in entrambe la sinergia.

I recettori su cui è stato dimostrato l'effetto inibitorio del STI571 sono il PDGFR β , c-Kit e c-fms [30, 31]. Dopo l'analisi dell'espressione dei recettori, effettuata sulle cellule di numerose linee in nostro possesso (MMP, MMCa, MMB, MPP89, REN, ISTMES1, ISTMES2), è stata valutata l'efficacia delle nostre combinazioni terapeutiche su altre 2 linee, che presentavano caratteristiche diverse dalle MMP. In particolare, le cellule della linea MMP esprimono in modo sensibile tutti e tre i tipi di recettori, mentre le REN esprimono sensibilmente solo il PDGFR β e le ISTMES2 hanno bassi livelli di espressione per tutti e tre i recettori.

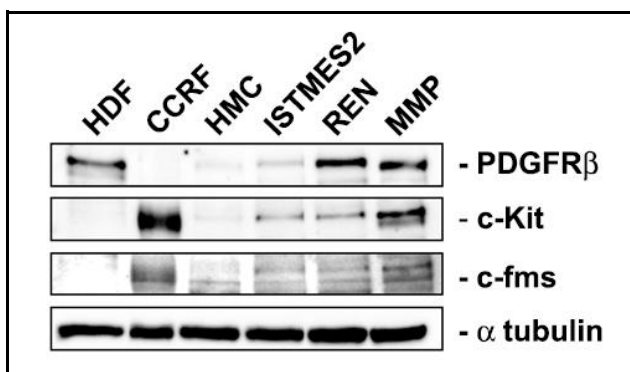


Figura 7 Livello di espressione dei recettori sensibili a STI571. Western blotting con anticorpi anti PDGFR β , c-Kit, c-fms e α tubulina condotto su lisati totali di cellule mesoteliali (HMC) e mesotelioma maligno (ISTMES2, REN, MMP) dopo coltura in condizioni di 2% siero per 16 ore. Il lisato totale di fibroblasti umani (HDF) è stato utilizzato come controllo positivo per l'espressione del PDGFR β . Il lisato totale di cellule leucemiche (CCRF) è stato utilizzato come controllo positivo per l'espressione di c-Kit e c-fms.

Dopo aver valutato l'espressione dei recettori, è stato osservato l'effetto dell'aggiunta del fattore di crescita PDGF da solo e in presenza del STI571. L'attivazione del PDGFR è osservabile sulle cellule di tutte le linee, ma è maggiore nel caso delle MMP. Conseguentemente all'aggiunta di PDGF, viene osservata in tutti i tipi di cellule, l'attivazione a diversi livelli del percorso anti-apoptotico mediato da Akt. Nelle MMP la fosforilazione di Akt era maggiore rispetto a quella delle REN, mentre le ISTMES2 erano caratterizzate dal grado di attivazione più basso. L'inibizione selettiva del STI571 è efficace su tutte le tipologie cellulari esaminate. E' osservabile l'attivazione delle Erk1/2 solo nelle cellule della linea MMP che si protrae anche dopo l'aggiunta dell'inibitore STI571.

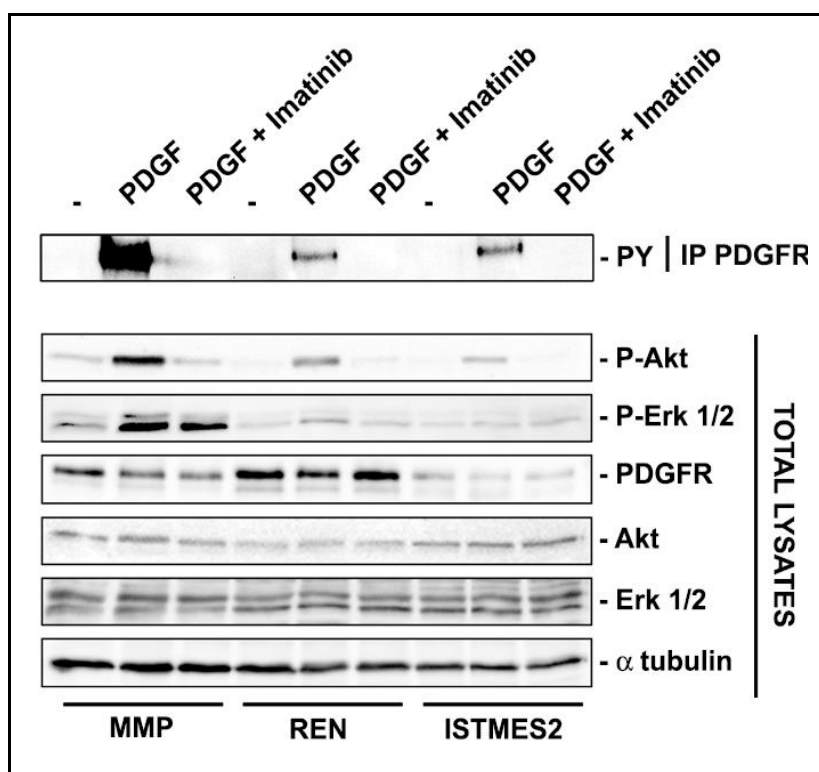


Figura 8 Attivazione ed inattivazione del PDGFR β , Akt e Erk 1/2 con PDGF e STI571 . (Sopra) Immunoprecipitazione con anticorpo anti PDGFR β e immunoblotting con anticorpo anti fosfo-tirosina,

dopo stimolazione con 20ng/ml di PDGF e 10 μ M di STI571 per 90 min., su cellule di mesotelioma maligno (MMP, REN, ISTMES2). (Sotto) Western blotting con anticorpi anti fosfo-Akt, fosfo-Erk1/2, PDGFR β , Akt, Erk1/2 e α tubulina sui lisati totali delle stesse cellule nelle stesse condizioni di coltura.

I test di citotossicit  effettuati con le 2 associazioni terapeutiche, hanno permesso la costruzione dell'isobologramma per le cellule delle linee REN ed ISTMES2. E' stata osservata sinergia tra gli effetti dei 2 chemioterapici in associazione con STI571 per le cellule REN, mentre   stata dimostrato antagonismo per entrambe le combinazioni sulle ISTMES2.

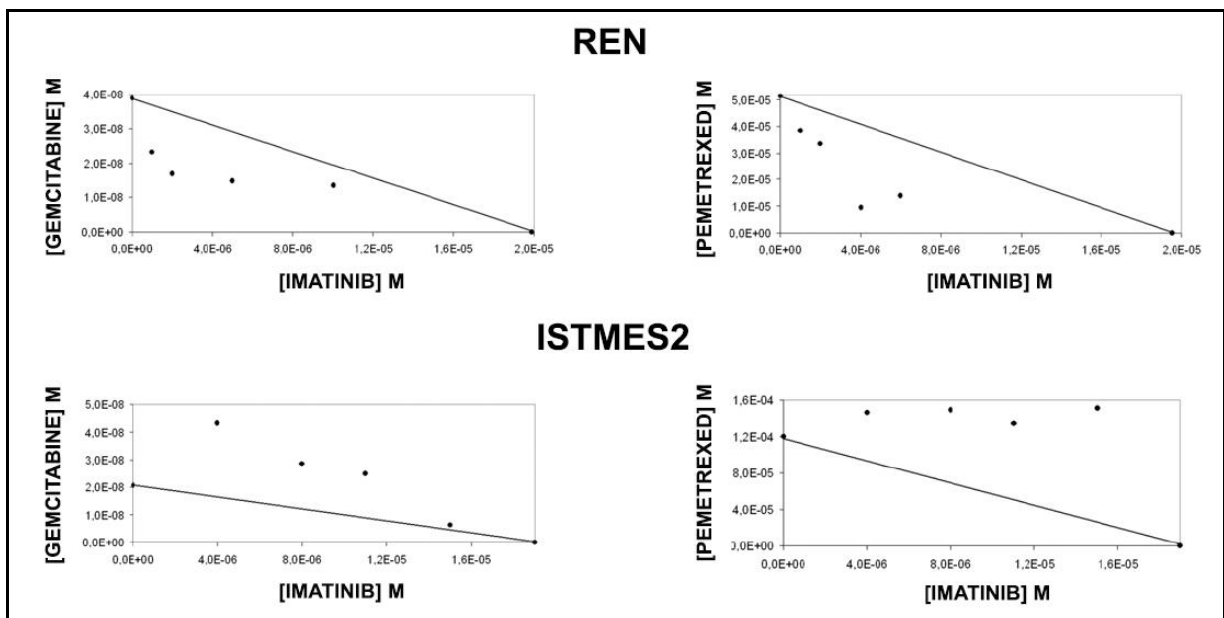


Figura 9 Isobologrammi delle 2 associazioni terapeutiche utilizzate. (Primo e secondo diagramma) Isobologrammi relativi alle combinazioni Gemcitabina/STI571 e Pemetrexed/STI571 su cellule della linea di mesotelioma maligno REN in cui   evidente la sinergia in entrambe le situazioni. (Terzo e quarto diagramma) esempio di antagonismo delle due combinazioni testate sulle cellule della linea di mesotelioma maligno ISTMES2.

La sinergia determinata per le cellule MMP   maggiore di quella valutata sulle REN ed   proporzionale al livello di attivazione della via di sopravvivenza mediata da

Akt, sia in condizioni basali che a seguito dell'aggiunta del PDGF. Mettendo in relazione l'antagonismo tra i gli effetti dei farmaci con il basso livello di attivazione di Akt sulle cellule della linea ISTMES2, è ipotizzabile che l'inibizione delle vie molecolari che proteggono dall'apoptosi aumenti la sensibilità delle cellule ai chemioterapici. La suscettibilità delle cellule di mesotelioma all'Alimta e alla Gemcitabina viene aumentata maggiormente nelle cellule che presentano livelli più alti di fosforilazione di Akt. L'attivazione della via di PI3chinasi/Akt è a sua volta proporzionale sia al livello di fosforilazione del PDGFR β che al numero di recettori sensibili al STI571 espressi dalla cellula.

Questo studio, una volta confermato dagli esperimenti sul modello murino da noi sviluppato, ha lo scopo di fornire un'alternativa terapeutica per i pazienti affetti dal mesotelioma maligno che presentano l'espressione del PDGFR β e di c-kit.

SVILUPPO DEL MODELLO PRECLINICO

La continua scoperta di nuove possibili terapie per il mesotelioma maligno determinate su sistemi *in vitro*, porta alla necessità di sviluppare un modello animale in cui valutare gli effetti terapeutici e quelli negativi secondari precedentemente alla sperimentazione clinica sull'uomo.

A tale scopo, grazie alla collaborazione con il Dr. Michele Cilli dell'IST di Genova, durante il primo anno di dottorato abbiamo valutato la possibile induzione del MM su topi immunocompromessi atimici nudi utilizzando cellule di mesotelioma MMP senza ottenere alcuna massa tumorale.

Dopo il fallimento della prima prova di inoculo abbiamo deciso di utilizzare topi SCID che, presentando una mutazione nei geni dello sviluppo dei linfociti B, hanno un grado di immunocompromissione maggiore, che facilita la crescita della popolazione di cellule tumorali inoculate.

Successivamente, utilizzando tre topi per ogni condizione, abbiamo inoculato intraperitoneo le cellule di mesotelioma appartenenti alle linee MMP, MPP89 e REN, precedentemente infettate con un lentivirus contenente il vettore "p156RRLsinPPT β CMVGFPpre" esprime la proteina fluorescente GFP. Tali cellule, una volta iniettate nel peritoneo, vengono rilevate tramite un misuratore di fluorescenza "in vivo" (IVIS system, Xenogen Corp.) nel caso della formazione di

masse neoplastiche primarie e metastatiche. Dopo 20 giorni tutti i topi inoculati con le REN-GFP hanno sviluppato rigonfiamento addominale indice della presenza del tumore. Solo un topo inoculato con le MPP89-GFP ha sviluppato tumore, mentre non è stata osservata alcuna massa neoplastica nei topi inoculati con le MMP-GFP.

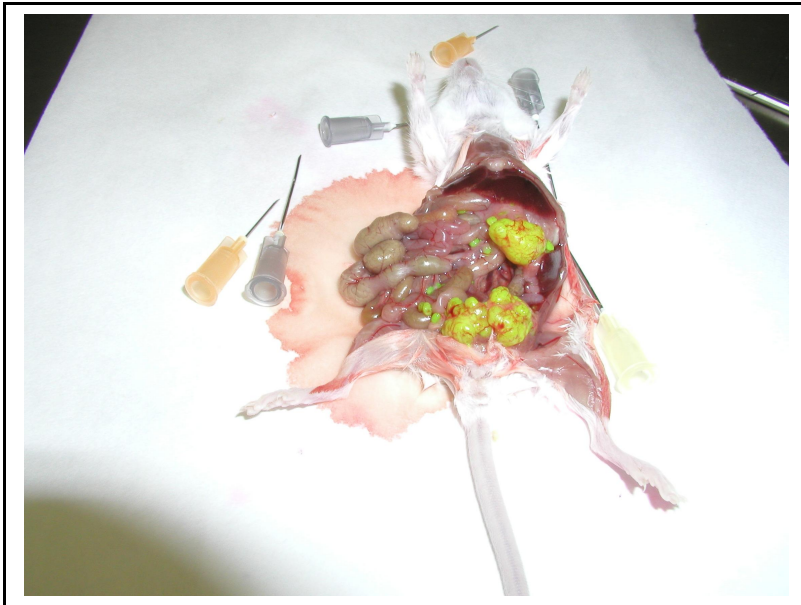
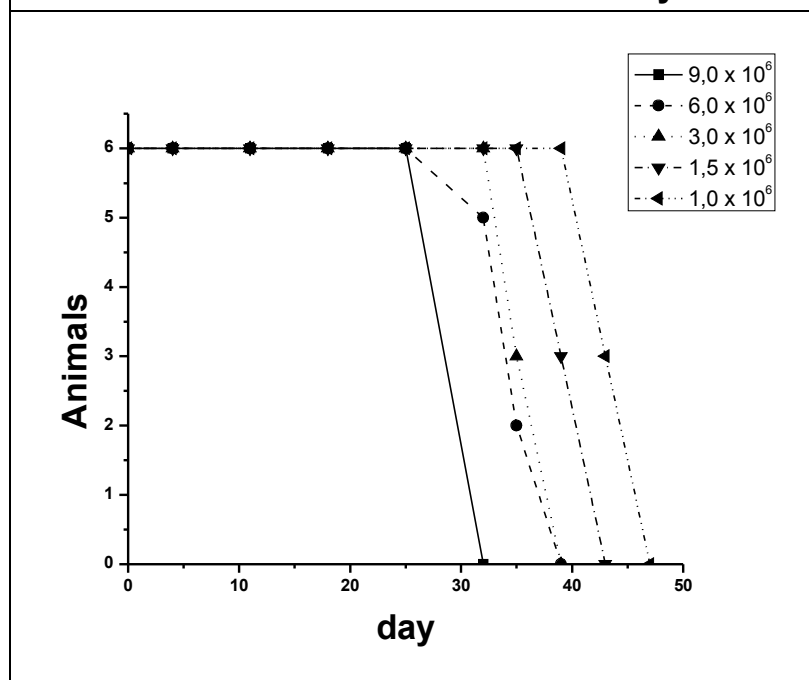
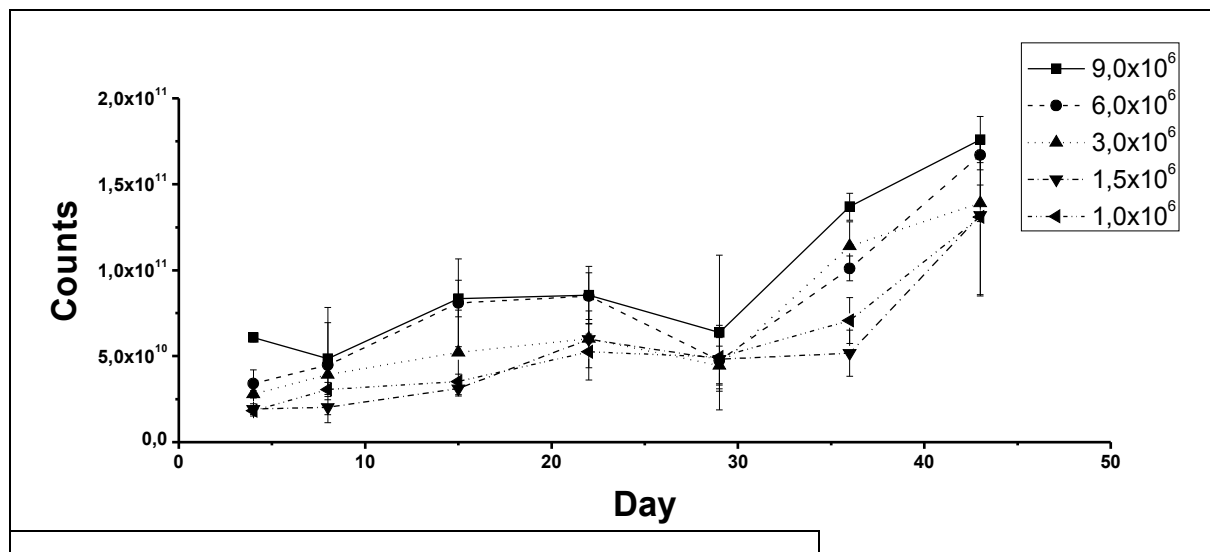


Figura 10 Masse tumorali esprimenti la proteina fluorescente GFP. Esame autoptico di topo SCID a 50 giorni dall'inoculo di 9 milioni di cellule di mesotelioma maligno esprimenti la proteina GFP (MPP89-GFP).

Dopo aver valutato la linea REN come la più idonea ai nostri scopi, le cellule sono state infettate con particelle lentivirali esprimenti un costrutto ottenuto dal vettore "p156RRLsinPPT_hCMVGFPpre" nel quale il cDNA codificante GFP è stato sostituito con il cDNA codificante l'enzima Luciferasi. L'espressione di Luciferasi permette una rilevazione più sensibile e precisa delle masse tumorali mediante IVIS, rispetto a quella osservabile con l'espressione di GFP. ~~Il plasmide~~ I lentivirus ricombinanti sono stati ottenuti, per la parte riguardante l'impacchettamento dei virioni, presso le strutture abilitate dell'IRCC di Candiolo (TO), grazie a una collaborazione in atto. Il costrutto è stato preparato nel nostro laboratorio.

Allo scopo di valutare il numero minimo di cellule da inoculare, sono state iniettate all'interno del peritoneo dei topi SCID diverse quantità di cellule (da 9 a 1 milione). La massa tumorale di ogni animale è stata analizzata mediante imaging ogni settimana, in modo da determinare lo sviluppo delle neoplasie nel tempo. I risultati degli esperimenti preliminari hanno rivelato che l'inoculo di 1 milione di cellule permetteva l'attecchimento delle cellule, l'aumento più lento della massa neoplastica e la sopravvivenza maggiore dei topi.



ni di inoculo. Valutazione della
 lule di mesotelioma REN-Luc. Le
 escenza rilevata all'IVIS.

Figura 12 Curva di sopravvivenza dei topi inoculati con diverse quantità di cellule. I topi venivano soppressi nel momento in cui lo sviluppo dell'emiperitoneo limitava la mobilità dell'animale.

Dopo aver determinato la condizione migliore per lo sviluppo del modello murino, abbiamo valutato il blocco della crescita neoplastica da parte dell'inibitore delle chinasi Aurora, PHA-680632. A questo scopo, sono stati inoculati 18 topi intraperitoneo con 1 milione di cellule REN-Luc e sulla base delle dimensioni del tumore dopo 7 giorni, sono stati costituiti 3 gruppi di trattamento. I gruppi erano formati da 6 topi ognuno e dopo 15 giorni dall'inoculo sono stati trattati rispettivamente con 60 mg/Kg e 30 mg/Kg di PHA-680632 per 5 giorni consecutivi. Un gruppo è stato trattato con il solo veicolo DMSO in cui era stato disciolto il farmaco.

Tutti gli animali sono stati monitorati all'IVIS settimanalmente fino allo sviluppo dell'emiperitoneo, limite al quale i topi venivano soppressi per motivi compassionevoli. Il trattamento effettuato ha bloccato lo sviluppo della massa neoplastica prolungando la vita dei topi appartenenti al gruppo trattato con 30 mg/Kg fino a 64 giorni e del gruppo a 60 mg/kg fino a 74 giorni. I topi trattati con il solo vettore sono stati soppressi a 50 giorni dall'inoculo.

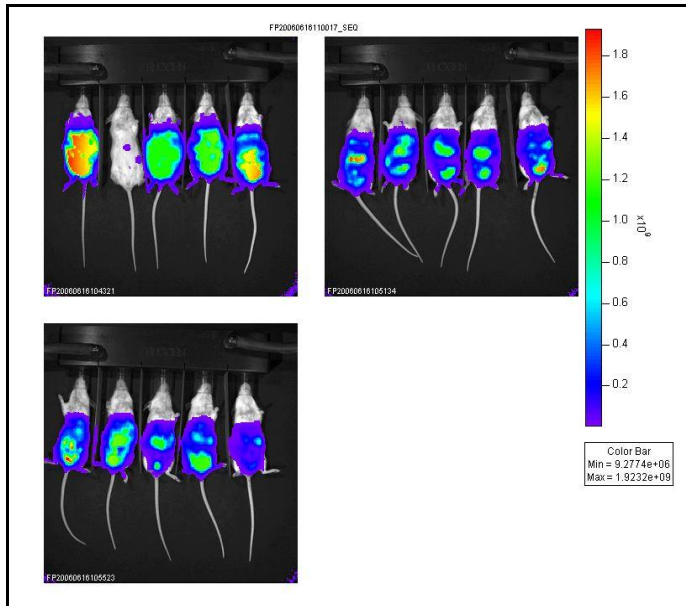


Figura 13 Valutazione all'IVIS dei topi trattati con l'inibitore PHA-680632. Esempio di emissione luminescente rilevata all'IVIS a 43 giorni dall'inoculo. I gruppi di animali erano stati trattati 5 giorni con DMSO (Alto-sinistra), 30 mg/Kg di PHA-680632 (Alto-destra) e 60 mg/Kg di PHA-680632 (Basso).

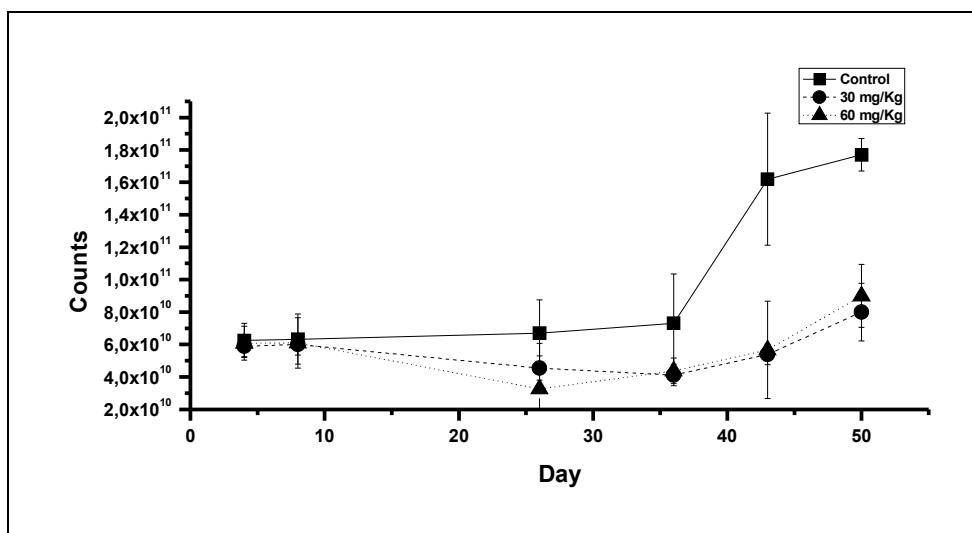


Figura 14 Crescita della massa tumorale a diverse concentrazioni di PHA-680632. Valutazione della crescita tumorale in topi SCID trattati per 5 giorni con iniezioni intraperitoneo di PHA-680632 alla concentrazione di 60 mg/Kg e 30 mg/Kg. I topi di controllo sono stati trattati con solo il veicolo (DMSO) alle stesse modalità.

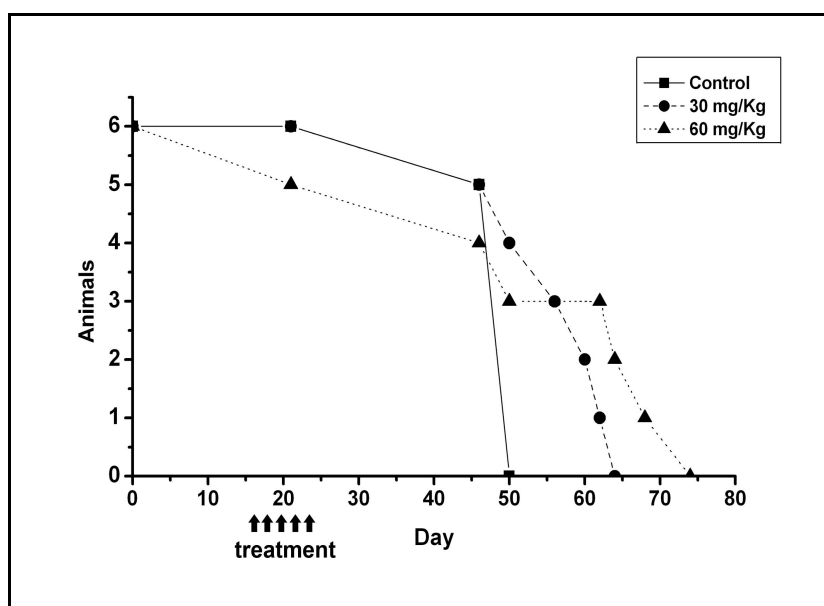


Figura 15 Curva di sopravvivenza dei topi trattati con diverse concentrazioni di PHA-680632. I topi venivano soppressi nel momento in cui lo sviluppo dell'emiperitoneo limitava la mobilità dell'animale.

La messa a punto del modello murino di mesotelioma maligno, ci permetterà ora di valutare le combinazioni dei farmaci precedentemente esaminate *in vitro*.

Uno degli obiettivi di questo progetto è saggiare l'azione terapeutica delle due associazioni Gemcitabina/STI571 e Pemetrexed/STI571.

Dopo un esperimento preliminare, condotto con 6 gruppi da 6 topi comprendente, oltre al controllo trattato con il solo vettore (DMSO), i trattamenti con STI571, Gemcitabina, Pemetrexed e le due combinazioni di farmaci, abbiamo dedotto che l'utilizzo dei protocolli di trattamento per Gemcitabina e Pemetrexed effettuati sull'uomo, rapportati al topo mediante semplice proporzione del peso non può dare risultati a causa della diversa farmacocinetica dei farmaci da noi utilizzati nelle due specie. Infatti il topo, a causa del diverso metabolismo e della più elevata quantità di folati nel sangue, necessita di concentrazioni terapeutiche proporzionalmente maggiori dell'uomo [48-50]. Pertanto i prossimi esperimenti faranno riferimento ai parametri suggeriti da questi lavori.

□ SEMINARI FREQUENTATI

- Ottobre 2005 “Lipidomica cerebrale” Dr. A. Minassi (DISCAFF)
- 2 Novembre 2005 “Vascular myogenesis in zebrafish” Prof. M. M. Santoro (DISCAFF)
- 8 Novembre 2005 “Segnali di Ca²⁺ e migrazione di neuroni e cellule gliali” Prof. C. Distasi (DISCAFF)
- 15 Novembre 2005 “Glutamate receptors in non-neuronal cells” Dr. G. Miglio (DISCAFF)
- 18 Novembre 2005. “Cardiac potassium channel regulation by accessory subunits”. Dr. Diego Cotella.
- 23 Novembre 2005. “HCV-related steatosis: pathogenic mechanism and clinical implications.” Prof. Luigi Elio Adinolfi.
- 25 Novembre 2005. “Mechanism of transcriptional regulation and disease.” Prof. Robert Tjian.
- 6 Dicembre 2005 “La neurogenesi in età adulta” Prof. M.G. Grilli (DISCAFF)
- 12 Dicembre 2005 “Malignant Mesothelioma multicellular spheroids: mechanism of multicellular resistance” Dr D. Barbone (DISCAFF)
- 18 Gennaio 2006 “Proteine EGR: Ruolo nelle funzioni cognitive e nella risposta allo stress cronico” Prof. M. Orsetti-Dr. A. Dellarole (DISCAFF)
- Gennaio 2006. “Mechanisms of osteolytic lesions in multiple myeloma: uncoupling between bone resorption and formation.” Prof.ssa Maria Grano.

- 25 Gennaio 2005 “Kinurenine in Anopheles gambiae”. Dr. F. Rossi (DISCAFF)
- 1 Febbraio 2006 “La calcineurina come switch molecolare durante lo sviluppo neuronale” Prof. A.A.Genazzani-Dr. R.Zaninetti (DISCAFF)
- 13 Febbraio 2006 “New perspectives in metabotropic glutamate receptors” Prof. Ferdinando Nicoletti.
- 15 Febbraio 2006 “Anticorpi ricombinanti: un potente tool biotecnologico. Prof. Daniele Sblattero.
- Febbraio 2006 “The neuronal cell cycle: a unique target for the treatment of the Alzheimer’s disease”: Prof. A. Copani (DISCAFF)
- 23 Febbraio 2006 “Novel therapeutic approaches for liver cancer” Prof. L. Tessitore (DISCAFF)
- 1 Marzo 2006 “Sumoilazione del fattore di trascrizione Egr-1” Dr. E. Brunelli (DISCAFF)
- 13 Marzo 2006 “Il trapianto di cellule endoteliali (LSEC) nel fegato di topo ha implicazioni per la terapia cellulare e genica dell’emofilia. Dr.ssa Atonia Follenzi.
- Marzo 2006. “The natural course of preclinical type 1 diabetes”. Prof. Mikael Knip.
- 6 Aprile 2006 “Il Signore degli anelli”: l’ossidosqualene ciclasi come enzima e come potenziale bersaglio di farmaci. Prof. F. Viola (DISCAFF)
- 20 Aprile 2006. “Terapie molecolari nelle malattie mieloproliferative”. Dott.ssa Daniela Cilloni
- 3 Maggio 2006 “Impatto delle biotecnologie sulle strategie di impresa nel settore della tutela della salute” Dr. C. Jommi (DISCAFF)
- 4 Maggio 2006 “Il mesotelioma: un modello di terapia traslazionale”. Dott. Luciano Mutti.
- 15 Maggio 2006. “Strategies to maintain oral food intake in patients with advanced malignant disease: success and failures”. Prof. Vickie E. Baracos.
- 15 Giugno 2006 “Melusin: a stretch sensor molecule controllino adaptive cardiac remodeling to pressure overload”. Prof. Guido Tarone.
- 5 Luglio 2006 “DNA and protein arrays in infection diseases: from basic research to vaccine design”. Dott.ssa Renata Grifantini.

- 11 Settembre 2006 “The role of cathepsin K in arthritis and atherosclerosis”.
Prof.Dieter Bromme

□ CORSI FREQUENTATI

- Statistica
- Inglese

□ PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

- 8° IMIG International Conference 2006. Chicago, IL, 19-22 Ottobre 2006
Poster: Bertino P., Piccardi F., Cilli M., Mutti L., Gaudino G. “Monitoring tumor growth by imaging of a human mesothelioma murine model”

□ PUBBLICAZIONI

- Erionite and Asbestos differently cause transformation of Human Mesothelial Cells. P. Bertino, A. Marconi, L. Palumbo, D. Barbone, B. Bruni, S. Germano, Dogan U., G. F. Tassi, C. Porta, L. Mutti, G. Gaudino. (sottoposto alla pubblicazione)
- Combination of Imatinib Mesaylate with Gemcitabine provides a novel therapeutic approach to Malignant Mesothelioma. , Pietro Bertino, Dario Barbone, Camillo Porta, Serena Germano, Sara Busacca, Sabrina Pinato, Gianfranco Tassi, Roberto Favoni, Giovanni Gaudino, and Luciano Mutti. (in corso di revisione)

□ BIBLIOGRAFIA

1. Peto, J., et al., *The European mesothelioma epidemic*. Br J Cancer, 1999. **79**(3-4): p. 666-72.
2. Fisher, S.G., L. Weber, and M. Carbone, *Cancer risk associated with simian virus 40 contaminated polio vaccine*. Anticancer Res, 1999. **19**(3B): p. 2173-80.
3. Pass, H.I., et al., *Malignant pleural mesothelioma*. Curr Probl Cancer, 2004. **28**(3): p. 93-174.
4. Lee, T.T., et al., *Radical pleurectomy/decortication and intraoperative radiotherapy followed by conformal radiation with or without chemotherapy for malignant pleural mesothelioma*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002. **124**(6): p. 1183-9.
5. Dogan, A.U., et al., *Genetic predisposition to fiber carcinogenesis causes a mesothelioma epidemic in Turkey*. Cancer Res, 2006. **66**(10): p. 5063-8.

6. Perera, F.P., *Molecular cancer epidemiology: a new tool in cancer prevention*. J Natl Cancer Inst, 1987. **78**(5): p. 887-98.
7. Wang, N.S., et al., *The interactions between asbestos fibers and metaphase chromosomes of rat pleural mesothelial cells in culture. A scanning and transmission electron microscopic study*. Am J Pathol, 1987. **126**(2): p. 343-9.
8. Broaddus, V.C., et al., *Asbestos induces apoptosis of human and rabbit pleural mesothelial cells via reactive oxygen species*. J Clin Invest, 1996. **98**(9): p. 2050-9.
9. Liu, W., J.D. Ernst, and V.C. Broaddus, *Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000. **23**(3): p. 371-8.
10. Mumpton, F.A., *La roca magica: uses of natural zeolites in agriculture and industry*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(7): p. 3463-70.
11. Okayasu, R., L. Wu, and T.K. Hei, *Biological effects of naturally occurring and man-made fibres: in vitro cytotoxicity and mutagenesis in mammalian cells*. Br J Cancer, 1999. **79**(9-10): p. 1319-24.
12. Carthew, P., et al., *Intraleural administration of fibres induces mesothelioma in rats in the same relative order of hazard as occurs in man after exposure*. Hum Exp Toxicol, 1992. **11**(6): p. 530-4.
13. Eborn, S.K. and A.E. Aust, *Effect of iron acquisition on induction of DNA single-strand breaks by erionite, a carcinogenic mineral fiber*. Arch Biochem Biophys, 1995. **316**(1): p. 507-14.
14. Long, J.F., P.K. Dutta, and B.D. Hogg, *Fluorescence imaging of reactive oxygen metabolites generated in single macrophage cells (NR8383) upon phagocytosis of natural zeolite (erionite) fibers*. Environ Health Perspect, 1997. **105**(7): p. 706-11.
15. Janssen, Y.M., et al., *Induction of c-fos and c-jun proto-oncogenes in target cells of the lung and pleura by carcinogenic fibers*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994. **11**(5): p. 522-30.
16. Timblin, C.R., et al., *Patterns of c-fos and c-jun proto-oncogene expression, apoptosis, and proliferation in rat pleural mesothelial cells exposed to erionite or asbestos fibers*. Toxicol Appl Pharmacol, 1998. **151**(1): p. 88-97.
17. Poole, A., et al., *In vitro genotoxic activities of fibrous erionite*. Br J Cancer, 1983. **47**(5): p. 697-705.
18. Wagner, J.C., et al., *Erionite exposure and mesotheliomas in rats*. Br J Cancer, 1985. **51**(5): p. 727-30.
19. Mossman, B.T., D.W. Kamp, and S.A. Weitzman, *Mechanisms of carcinogenesis and clinical features of asbestos-associated cancers*. Cancer Invest, 1996. **14**(5): p. 466-80.
20. Klein, G., A. Powers, and C. Croce, *Association of SV40 with human tumors*. Oncogene, 2002. **21**(8): p. 1141-9.
21. Levresse, V., et al., *Effect of simian virus large T antigen expression on cell cycle control and apoptosis in rat pleural mesothelial cells exposed to DNA damaging agents*. Oncogene, 1998. **16**(8): p. 1041-53.
22. Xu, L., et al., *Asbestos induction of extended lifespan in normal human mesothelial cells: interindividual susceptibility and SV40 T antigen*. Carcinogenesis, 1999. **20**(5): p. 773-83.
23. Stein, R.C., *Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(3): p. 237-48.

24. Ohta, Y., et al., *VEGF and VEGF type C play an important role in angiogenesis and lymphangiogenesis in human malignant mesothelioma tumours*. Br J Cancer, 1999. **81**(1): p. 54-61.
25. Pogrebniak, H.W., I.A. Lubensky, and H.I. Pass, *Differential expression of platelet derived growth factor-beta in malignant mesothelioma: a clue to future therapies?* Surg Oncol, 1993. **2**(4): p. 235-40.
26. Langerak, A.W., et al., *Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) and PDGF receptors in human malignant mesothelioma in vitro and in vivo*. J Pathol, 1996. **178**(2): p. 151-60.
27. Gerwin, B.I., et al., *Comparison of production of transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor by normal human mesothelial cells and mesothelioma cell lines*. Cancer Res, 1987. **47**(23): p. 6180-4.
28. Manley, P.W., et al., *Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor*. Eur J Cancer, 2002. **38 Suppl 5**: p. S19-27.
29. Buchdunger, E., T. O'Reilly, and J. Wood, *Pharmacology of imatinib (STI571)*. Eur J Cancer, 2002. **38 Suppl 5**: p. S28-36.
30. Buchdunger, E., et al., *Abl protein-tyrosine kinase inhibitor STI571 inhibits in vitro signal transduction mediated by c-kit and platelet-derived growth factor receptors*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **295**(1): p. 139-45.
31. Dewar, A.L., et al., *Macrophage colony-stimulating factor receptor c-fms is a novel target of imatinib*. Blood, 2005. **105**(8): p. 3127-32.
32. Manegold, C. and J. Aisner, *Pemetrexed for diffuse malignant pleural mesothelioma*. Semin Oncol, 2002. **29**(2 Suppl 5): p. 30-5.
33. Oettle, H., et al., *The role of gemcitabine alone and in combination in the treatment of pancreatic cancer*. Anticancer Drugs, 2000. **11**(10): p. 771-86.
34. Manegold, C., *Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer*. Semin Oncol, 2001. **28**(2 Suppl 7): p. 1-6.
35. Orlando, M. and M. Mandachain, *Gemcitabine in ovarian cancer*. Semin Oncol, 2001. **28**(3 Suppl 10): p. 62-9.
36. Shih, C., et al., *LY231514, a pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes*. Cancer Res, 1997. **57**(6): p. 1116-23.
37. Meraldi, P., R. Honda, and E.A. Nigg, *Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(1): p. 29-36.
38. Warner, S.L., et al., *Targeting Aurora-2 kinase in cancer*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(6): p. 589-95.
39. Bischoff, J.R., et al., *A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers*. Embo J, 1998. **17**(11): p. 3052-65.
40. Soncini, C., et al., *PHA-680632, a novel Aurora kinase inhibitor with potent antitumoral activity*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(13): p. 4080-9.
41. Nygren, J., et al., *DNA damage in bronchial epithelial and mesothelial cells with and without associated crocidolite asbestos fibers*. Environ Mol Mutagen, 2004. **44**(5): p. 477-82.
42. Cavallo, D., et al., *Cytotoxic and oxidative effects induced by man-made vitreous fibers (MMVFs) in a human mesothelial cell line*. Toxicology, 2004. **201**(1-3): p. 219-29.
43. Moriarty, T.J., et al., *An anchor site-type defect in human telomerase that disrupts telomere length maintenance and cellular immortalization*. Mol Biol Cell, 2005. **16**(7): p. 3152-61.

44. Middleman, E.J., et al., *Regulation of cellular immortalization and steady-state levels of the telomerase reverse transcriptase through its carboxy-terminal domain*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(6): p. 2146-59.
45. Toyokuni, S. and J.L. Sagripanti, *Association between 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA strand breaks mediated by copper and iron*. Free Radic Biol Med, 1996. **20**(6): p. 859-64.
46. Gessner, P.K. and B.E. Cabana, *A study of the interaction of the hypnotic effects and of the toxic effects of chloral hydrate and ethanol*. J Pharmacol Exp Ther, 1970. **174**(2): p. 247-59.
47. Tallarida, R.J., *Drug synergism: its detection and applications*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(3): p. 865-72.
48. Braakhuis, B.J., et al., *Schedule-dependent antitumor effect of gemcitabine in in vivo model system*. Semin Oncol, 1995. **22**(4 Suppl 11): p. 42-6.
49. Gao, L., et al., *STI571 combined with vincristine greatly suppressed the tumor formation of multidrug-resistant K562 cells in a human-nude mice xenograft model*. Chin Med J (Engl), 2006. **119**(11): p. 911-8.
50. Teicher, B.A., et al., *Treatment regimens including the multitargeted antifolate LY231514 in human tumor xenografts*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(3): p. 1016-23.