

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**



Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
Ciclo XX

Relazione 3° anno

TITOLO:

**CARCINOGENESI E TERAPIA
FARMACOLOGICA DEL MESOTELIOMA MALIGNO
DA ASBESTO**

Dottorando: Pietro Bertino

Tutore: Prof G. Gaudino

□ 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.

Generalmente, l'utilizzo della parola "Asbesto" si riferisce alla crocidolite che è la fibra più largamente studiata, ma è una semplificazione di un argomento molto discusso. Infatti, ci sono 2 principali categorie di fibre di asbesto: "anfibole" e "serpentine". Tra le

anfibole, sono universalmente riconosciute come le più pericolose, la crocidolite e l'amosite. Riguardo le serpentine, il crisotilo è l'unico asbesto conosciuto e ci sono due opposti punti di vista riguardo il suo potere carcinogenico [19]. Alcuni pensano che il crisotilo non causi MM, mentre l'altro punto di vista è che il crisotilo sia la causa principale dell'epidemia di MM nel mondo occidentale, pericoloso quanto gli anfiboli ma molto più diffuso. Il crisotilo è la causa di più del 90% dell'esposizione mondiale all'asbesto ed è l'unico tipo di asbesto estratto nel mondo occidentale. Inoltre, il crisotilo è spesso contaminato dalla tremolite che è un asbesto anfibolo e che causa il MM. Il potenziale carcinogenico del crisotilo merita di essere determinato per contribuire scientificamente alla soluzione di questa delicata controversia.

Sebbene l'asbesto sia la maggior causa riconosciuta del Mesotelioma Maligno [20], l'infezione da SV40 è stata proposta come possibile concausa [21]. Le cellule mesoteliali SV40 positive sono meno sensibili alla citotossicità indotta da asbesto e le cellule sopravvissute sono soggette ad alta instabilità genomica [22] che può portare alla loro trasformazione [23].

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 [24]. Nel corso dei primi 2 anni di dottorato, sulla base di questo assunto, sono stati condotti esperimenti di carcinogenesi utilizzando fibre di asbesto anfibole ed erionite. Questi saggi di trasformazione hanno confermato quanto pubblicato sul potere carcinogenico degli anfiboli ed hanno dimostrato l'efficacia dell'erionite nel trasformare le cellule mesoteliali senza la cooperazione di SV40. La carcinogeneità superiore a qualsiasi altra fibra di asbesto finora studiata, ci ha portato inoltre ad approfondire il meccanismo di trasformazione dell'erionite e alla pubblicazione del relativo articolo scientifico.

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) [25], Platelet Derived Growth Factor (PDGF) [26, 27] 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 [27, 28]. Un farmaco di attuale interesse è Gleevec (Imatinib mesilato, STI571; Novartis Pharma

AG, Basel, Svizzera) [29, 30] 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 [31, 32].

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) [33]. La Gemcitabina (2'2'-difluorodeossicitidina) è un nucleoside analogo della citidina, attivo come singolo agente o in combinazione con il cisplatino ed altri farmaci contro diversi tumori solidi [34]. 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 [35, 36]. 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) [37].

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. Il lavoro del terzo anno ha portato alla conclusione e alla conseguente pubblicazione dell'articolo riguardante la sinergia del STI571 con la Gemcitabina e l'Alimta. L'articolo descrive gli esperimenti sulle linee cellulari di mesotelioma ed il rapporto tra l'efficacia della combinazione dei farmaci ed il livello di espressione dei recettori sensibili al STI571. In questo anno di dottorato è stata inoltre confermata l'efficienza della combinazione STI571-Gemcitabina sul modello murino recentemente sviluppato in collaborazione con l'IST di Genova

Durante il terzo anno di dottorato si è aggiunta la necessità di approfondire la ricerca sui meccanismi d'azione di un nuovo farmaco potenzialmente utile nella terapia del MM. Taurolidina (Tn), prodotta durante gli anni '70 dalla Geistlich Pharma, è una molecola derivata dall'acido taurinico avente attività anti-microbica e sfruttata in chirurgia per la disinfezione del cavo addominale al fine di ridurre fenomeni di adesione batterica. Diversi studi in vitro hanno dimostrato che la molecola di TN è in

grado di inibire la crescita di alcune forme neoplastiche e di indurre apoptosi nelle cellule tumorali.

□ SCOPO DEL LAVORO

Durante il terzo anno di dottorato tre differenti linee di ricerca sono state seguite riguardanti: i meccanismi di carcinogenesi, le terapie combinate con STI571 ed il meccanismo d'azione della Taurolidina.

La carcinogeneicità dell'erionite, superiore a qualsiasi altra fibra di asbesto finora studiata, ci ha portato ad approfondire il meccanismo di trasformazione dell'erionite e alla pubblicazione del relativo articolo scientifico. La controversia mondiale sul ruolo del crisotilo come carcinogeno in grado di causare il MM ci ha suggerito di iniziare a studiare questo particolare tipo di asbesto con lo stesso approccio scientifico utilizzato per gli studi precedentemente effettuati sull'erionite e sugli asbesti amfiboli.

Riguardo le terapie combinate con STI571, il lavoro del terzo anno ha portato alla conclusione e alla conseguente pubblicazione dell'articolo riguardante la sinergia del STI571 con Gemcitabina e Alimta. Inoltre, sempre durante il terzo anno di dottorato, è stato terminato il lavoro sul nostro modello murino di mesotelioma, in cui sono state valutate le due combinazioni dei farmaci.

Lo scopo del lavoro riguardante la ricerca su Taurolidina, è stato quello di aggiungere nuovi dati alle evidenze scientifiche già scoperte in precedenza dal laboratorio di Biologia Molecolare sulla capacità della molecola di Taurolidina di inibire la crescita neoplastica delle cellule di Mesotelioma Maligno (MM).

□ MATERIALI E METODI

DNA-Neosintesi

Le cellule HMC sono state esposte al terreno contenente 2% FBS aggiunto con le fibre in presenza di 10 μM BrdU (Bromo-deoxy-Uridine). L'incorporazione del DNA neosintetizzato è stata valutata dopo 24 ore mediante Cell Proliferation kit (Roche, Basel, Switzerland). I dati sono stati espressi come aumento medio di neosintesi di DNA rispetto ai controlli non trattati.

Citotossicità

Le cellule sono state piastrate in multiwell da 96. 5×10^3 cellule/pozzetto sono state esposte per 24 o 48 ore alle fibre in densità da 2 a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ o ai farmaci descritti, in presenza di 2% FBS. La citotossicità è stata valutata mediante MTT, eseguito in quadruplicato. La citotossicità percentuale normalizzata è stata ottenuta in accordo con la formula: valore medio di A_{570} degli estratti dai campioni esposti / valore medio di A_{570} degli estratti dai campioni di controllo.

Per la costruzione dell'isobologramma, serie di curve dose-risposta sono state generate per ogni chemioterapico in presenza di diverse concentrazioni fisse di STI571. Gli LC50 risultanti sono stati inseriti nell'isobologramma per valutare l'ipotetico effetto superaditivo.

Addotti al DNA

Gli addotti al DNA sono stati valutati mediante HPLC, in presenza o in assenza di 10mM di N-Acetyl-L-cysteine (L-NAC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) sugli estratti delle cellule esposte per 5 ore a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ delle fibre indicate ed i dati erano espressi come quantità di 8-OHdG per 10^5 dG.

Esposizione alle fibre

Esposizione breve: Stimolazione delle cellule sub-confluenti a 24 ore con terreno contenente 20% FBS addizionato con le fibre alle concentrazioni da 0.1 a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Esposizione lunga: Due cicli di trattamento, 72 ore l'uno, con bassa concentrazione di fibre. In dettaglio, 1 giorno dopo la piastratura all'80% di confluenza in fiasche da 25 ml, le cellule sono state esposte a 2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ di ogni fibra per 72 ore. Poi, le cellule sono state lavate due volte con PBS, trasferite in fiasche più grandi (75 e 150 cm^2) e lasciate crescere in terreno contenente 10% FBS per altri quattro giorni. Lo stesso trattamento è stato ripetuto come sopra e le cellule sono state fatte crescere fino a due mesi mediante passaggio periodico 1:4. I trattamenti sono stati eseguiti in triplicato.

Apoptosi

Le cellule sub-confluenti sono state esposte al terreno Ham's addizionato con 2% FBS, contenente le fibre (10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), i farmaci testati o 100 μM VP16 (Etoposide, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) per 24 ore. La frammentazione nucleare è stata valutata mediante colorazione con la soluzione Hoechst (Calbiochem, San Diego, CA, USA) al buio per 1 ora. In questo caso, i campioni sono stati fissati in acetone:metanolo freddo a 20° C per 15 minuti, lavati in PBS, montati in 50% glicerolo/PBS e osservati con un microscopio a fluorescenza Leica. In altri casi l'apoptosi è stata valutata mediante TUNEL (DeadEnd™ Colorimetric TUNEL system, Promega, USA) in accordo con le istruzioni del produttore. Le cellule che presentavano la frammentazione nucleare o colorate mediante TUNEL, sono state contate in 10 campi di almeno 50 cellule nello stesso vetrino. I valori sono stati espressi come percentuale di cellule positive sul numero totale di cellule. L'attività

delle caspasi è stata valutata mediante la colorazione con il marcatore CaspACE FITC-VAD-FMK (Promega, Madison, WI, USA), seguito da citofluorimetria..

Trasduzione del segnale

Gli immunoblotting sono stati eseguiti caricando 50 µg di lisato cellulare in condizioni riducenti. Dopo la separazione in SDS-PAGE ed il trasferimento nel filtro di nitrocelulosa (Hybond, Amersham, Buckinghamshire, UK), i filtri sono stati incubati con i diversi anticorpi. Il rivelamento è stato eseguito mediante Enhanced Chemi-Luminescence system (ECL, Amersham).

Saggio di formazione dei foci

Le cellule sopravvissute all'esposizione lunga alle fibre, sono state mantenute in coltura per 8 settimane, poi il saggio di formazione dei foci è stato eseguito in triplicato utilizzando multiwell da 6 pozzetti. Le cellule sono state piastrate alla densità di 3×10^4 /pozzetto e lasciate crescere in terreno al 10% FBS. Il numero di foci per numero di cellule piastrate era espresso come numero medio \pm Deviazione Standard (SD). I foci formati dalle cellule confluenti venivano stabiliti in coltura come singoli cloni.

Proliferazione cellulare

Le cellule sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti alla densità di 3×10^4 /pozzetto in terreno Ham addizionato con 2% FBS contenente le fibre indicate ($1.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Le cellule sono state fissate in 11% glutaraldehyde dopo 0, 24, 48 e 72 ore e colorate con il Crystal Violet diluito in 10% acido acetico e l'assorbanza a 595 nm (A_{595}) è stata misurata con un lettore per piastre ELISA.

.Ciclo cellulare

Le cellule sono state sincronizzate con 0.1 µg/ml Colcemyd (Sigma-Aldrich), trattate per 24 ore e tenute in terreno normale per 4 giorni prima di essere analizzate. Le cellule sono state poi lavate in PBS, fissate in 50% Etanolo e colorate per 30 min a temperatura ambiente con 50 µg/ml Propidium Iodide (PI-Sigma-Aldrich) in 0.1 M PBS pH 7.2 contenente 0.5 mg/ml RNase. 10,000 eventi per campione sono stati analizzati mediante citometria di flusso.

Animali

Topi C.B-17-SCID o atimici *nu/nu* (femmine, 6–8 settimane; Charles River, Milano, Italy) hanno ricevuto l'iniezione intraperitoneale di 1×10^6 cellule di mesotelioma (MMP, REN or REN transdotte) in 0.5 mL di terreno Ham's F-12. Per valutare le dimensioni tumorali e la localizzazione delle cellule luminescenti, dopo anestesia e i.p. iniezione di 0.3 mL a 15 mg/mL di D-luciferin, i segnali bioluminescenti dei topi inoculati con le cellule Ren/luc sono stati misurati con IVIS system 100 series (Xenogen Corp., Alameda, CA, USA). Le zone di interesse sono state identificate intorno ai tumori e quantificate come numero totale di fotoni utilizzando il software Living Image™ (Xenogen Corp.). I valori delle dimensioni tumorali sono stati ottenuti sottraendo i segnali luminescenti da ogni misurazione settimanale con la prima misurazione al giorno 10 dopo l'inoculo e espressi come media di tutti i valori per ogni gruppo di trattamento. Per valutare la tossicità dei trattamenti, i topi sono stati pesati all'inizio ed alla fine dei trattamenti. I topi sono stati uccisi quando lo sviluppo del tumore aveva causato una ascite che limitava la mobilità degli animali. La sopravvivenza è stata valutata mediante il metodo di Kaplan-Meier.

Procedure di necropsia per gli studi istologici

Dopo l'iniezione delle cellule tumorali, al giorno 28, un topo per ogni gruppo di trattamento è stato ucciso. Durante l'autopsia, i tumori nel peritoneo sono stati escissi e una parte di tessuto è stata fissata in formalina e imbevuta in paraffina.

Colorazione immunochimica

Le sezioni di tumore, derivate dai topi trattati, sono state deparaffinate con xylene, reidratate con alcohol e PBS. Le cellule sub-confluenti, piastrate nelle fiaschette con il fondo in vetro (NUNC, Rochester, NY, USA), sono state esposte al terreno Ham's addizionato con 2% FBS contenente le fibre ($10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) o i farmaci per 24 ore e conseguentemente fissate in 10% formalina. Dopo 1 ora di incubazione con l'anticorpo Ki67 (Neomarkers, Fremont, CA, USA) a temperatura ambiente, il legame con la biotina-streptavidina è stato effettuato con l'UltraVision detection system, in accordo con le istruzioni del produttore. Le cellule Ki67 positive sono state contate in 10 campi da almeno 50 cellule nello stesso vetrino. I valori sono stati espressi come percentuale di cellule positive sul numero totale di cellule

□ RISULTATI

CARCINOGENESI *in vitro*

Durante il primo anno di dottorato sono stati condotti studi di carcinogenesi utilizzando diverse tipologie di amianto anfibolo ed erionite. Gli esperimenti condotti nel secondo anno 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 all'erionite proveniente da Karain ed Oregon, all'amosite ed al vetro, è stato determinato che l'erionite Karain e quella proveniente dall'Oregon, portano ad un aumento statisticamente significativo della percentuale di cellule proliferanti rispetto all'amosite e al vetro.

Riguardo all'apoptosi, invece è stato determinato un numero significativamente più alto di cellule, che presentavano la tipica condensazione della cromatina evidenziata dalla colorazione Hoechst, solo per l'amosite.

I dati di proliferazione e di morte cellulare indicano che le fibre di erionite e di asbesto hanno un meccanismo trasformante diverso fra loro. Allo scopo di valutare 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 [38]. 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.

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 conferma la nostra teoria che le mutazioni indotte dai radicali liberi, formati dall'effetto ossidante dell'erionite, vengono "fissate" nelle cellule proliferanti conducendo al fenotipo trasformato.

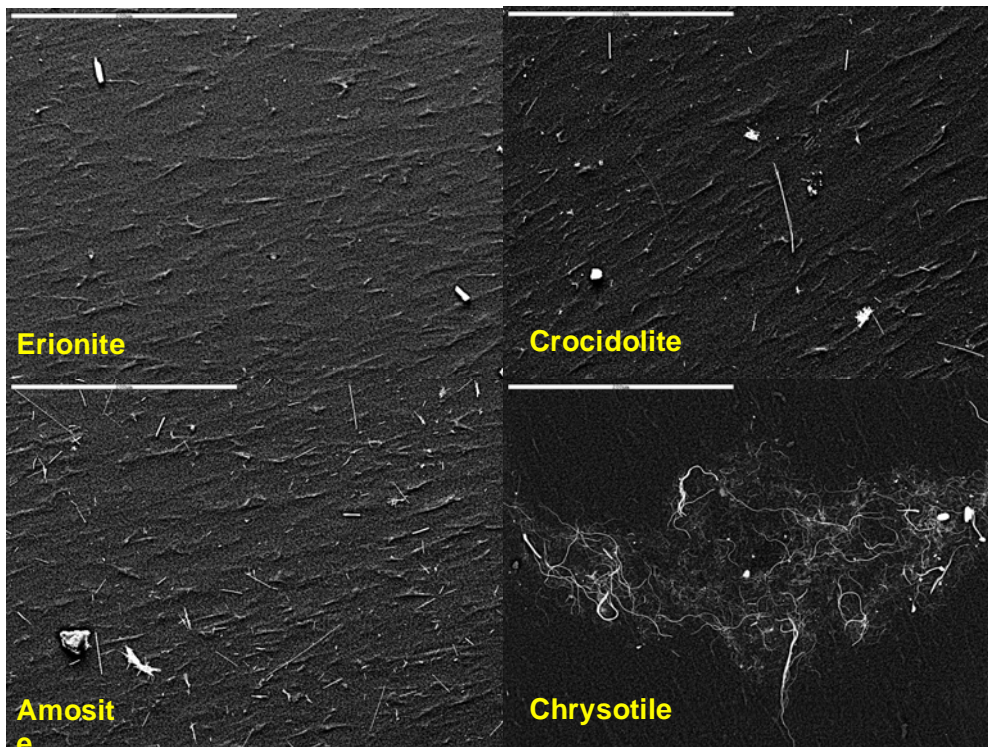
Durante il terzo anno di dottorato, l'insieme di tutti i dati ottenuti nei precedenti due anni hanno portato alla pubblicazione del seguente articolo:

Int. J. Cancer: **121**, 12–20 (2007)
© 2007 Wiley-Liss, Inc.

Erionite and asbestos differently cause transformation of human mesothelial cells

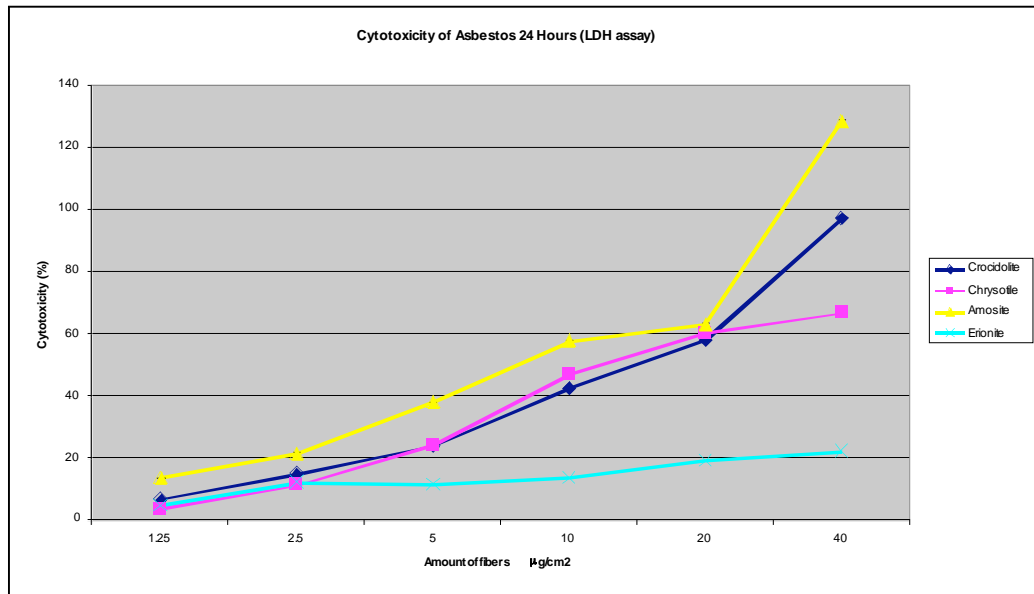
P. Bertino¹, A. Marconi², L. Palumbo², B. M. Bruni², D. Barbone¹, S. Germano¹, A.U. Dogan^{3,4},
G. F. Tassi⁵, C. Porta⁶, L. Mutti⁷ and G. Gaudino^{1,8}

L'inizio della collaborazione con il laboratorio del Prof. Michele Carbone situato al "Cancer Research Center of Hawaii" e la sempre più dibattuta controversia sul ruolo del crisotilo nell'induzione del MM, ci ha portati a studiare gli effetti di questo particolare asbesto.



Analisi al SEM delle fibre di Erionite, Anfiboli (Crocidolite e Amosite) e Crisotilo ad ingrandimento x500. Barra= 50 µm

I dati preliminari ottenuti dal laboratorio del Prof. Carbone rivelano che la citotossicità del crisotilo è paragonabile a quella degli altri asbesti anfiboli.



Citotossicità valutata mediante saggio LDH a differenti dosi delle fibre indicate dopo 24 ore di esposizione.

Sulla base dell'esperienza ottenuta nei precedenti anni di studio riguardante la capacità trasformante delle fibre di asbesto e dell'erionite, possiamo ipotizzare che il contributo del virus SV40 può essere determinante nel meccanismo di trasformazione del crisotilo. A tal scopo, cellule mesoteliali primarie saranno infettate con due diversi ceppi del virus SV40, uno wild-type ed uno con il genoma mutato in grado di codificare solo per l'antigene T grande (Tag) e non per l'antigene t piccolo (tag).

Dopo aver ottenuto le linee cellulari mesoteliali stabili contenenti i geni dei due ceppi virali, le nuove cellule saranno esposte per un lungo periodo a basse concentrazioni di crisotilo per valutarne il potere trasformante. Il protocollo di esposizione e del saggio di formazione dei foci trasformati sarà lo stesso utilizzato in passato per l'amosite e l'erionite.

In parallelo, le stesse linee cellulari saranno esposte ad alte concentrazioni di crisotilo per breve tempo (12h). Al termine dell'esposizione, i lisati cellulari saranno analizzati per valutare l'attivazione delle vie di trasduzione del segnale critiche per la trasformazione come la via delle MAP chinasi e la via PI3K/Akt. L'RNA estratto da

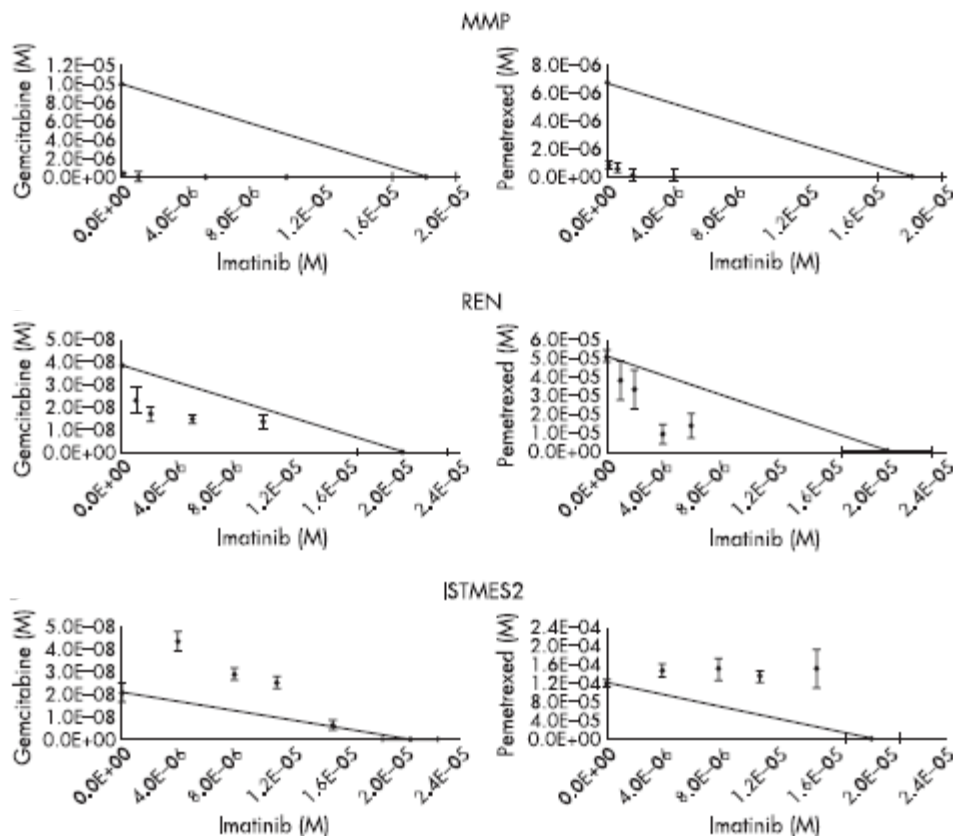
queste stesse cellule, al termine dell'esposizione, verrà utilizzato per valutare le differenze nell'espressione di numerosi geni mediante microarrays.

Una volta ottenuto il necessario numero di dati, verrà ipotizzato il meccanismo di trasformazione del crisotilo e verranno programmati gli adeguati esperimenti per confermarlo.

TERAPIA CHEMIOTERAPEUTICA COMBINATA CON STI571

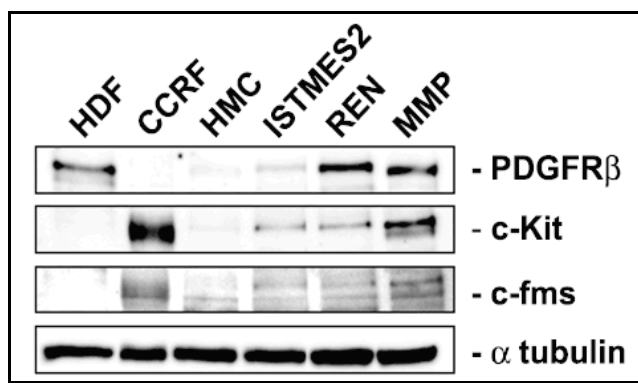
Esperimenti condotti precedentemente hanno dimostrato che STI571 utilizzato in combinazione con la Gemcitabina e con l'Alimta sulle cellule di mesotelioma maligno induce citotossicità ed apoptosi con un effetto sinergico. Questi dati hanno avvalorato la nostra ipotesi che, l'utilizzo combinato di un 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.

La valutazione dell'interazione tra due farmaci è stata 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 LC_{50} del chemioterapico considerato, al variare della concentrazione del farmaco usato in associazione. Sui due assi del diagramma cartesiano vengono riportati i valori di LC_{50} dei farmaci usati singolarmente. La retta che unisce questi punti rappresenta la conservazione dell'isobologramma, ovvero l'andamento che dovrebbero avere i valori di LC_{50} 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 [39, 40].



Isobologrammi relativi alle combinazioni Gemcitabina/STI571 (Imatinib) e Pemetrexed (Alimta)/STI571 (Imatinib) su cellule della linea di mesotelioma maligno MMP, REN e ISTMES2 in cui è evidente la sinergia in entrambe le situazioni per le cellule MMP e REN e l'esempio di antagonismo delle due combinazioni testate sulle cellule della linea di mesotelioma maligno ISTMES2.

I recettori su cui è stato dimostrato l'effetto inibitorio del STI571 sono il PDGFR β , c-Kit e c-fms [31, 32]. L'analisi dell'espressione dei recettori, effettuata sulle cellule delle 3 linee utilizzate, dimostrava che 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.



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

La sinergia determinata per le cellule MMP è maggiore di quella valutata sulle REN ed è proporzionale al numero di recettori presenti. Di conseguenza, mettendo in relazione l'antagonismo tra gli effetti dei farmaci con il basso livello espressione dei tre recettori sensibili a STI571 sulle cellule della linea ISTMES2, è ipotizzabile che l'inibizione delle vie molecolari che proteggono dall'apoptosi aumenti la sensibilità delle cellule ai chemioterapici. Durante il terzo anno di dottorato, associando l'attivazione della via di PI3chinasi/Akt al livello di fosforilazione del PDGFR β e al numero di recettori sensibili al STI571 espressi dalla cellula, siamo stati in grado di pubblicare il relativo articolo scientifico su una rivista di buon livello.

Preliminary data suggestive of a novel translational approach to mesothelioma treatment: imatinib mesylate with gemcitabine or pemetrexed

Pietro Bertino, Camillo Porta, Dario Barbone, Serena Germano, Sara Busacca, Sabrina Pinato, Giancarlo Tassi, Roberto Favoni, Giovanni Gaudino, Luciano Mutti

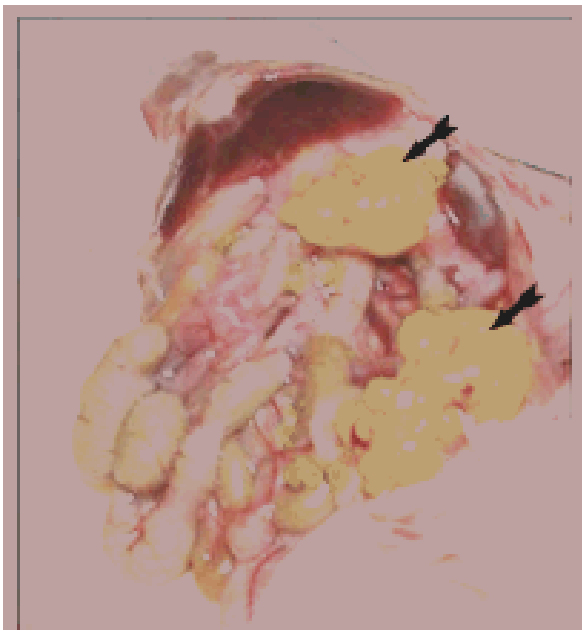
Thorax 2007;62:690-695. doi: 10.1136/thx.2006.069872

La continua scoperta di nuove possibili terapie per il mesotelioma maligno determinate su sistemi *in vitro*, ha portato 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 i primi due anni 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 e REN, precedentemente infettate con un lentivirus contenente il vettore "p156RRLsinPPT_hCMVGFPpre" 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, mentre non è stata osservata alcuna massa neoplastica nei topi inoculati con le MMP-GFP.



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 (REN-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 “p156RRLsinPPTthCMVGFPpre” 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.

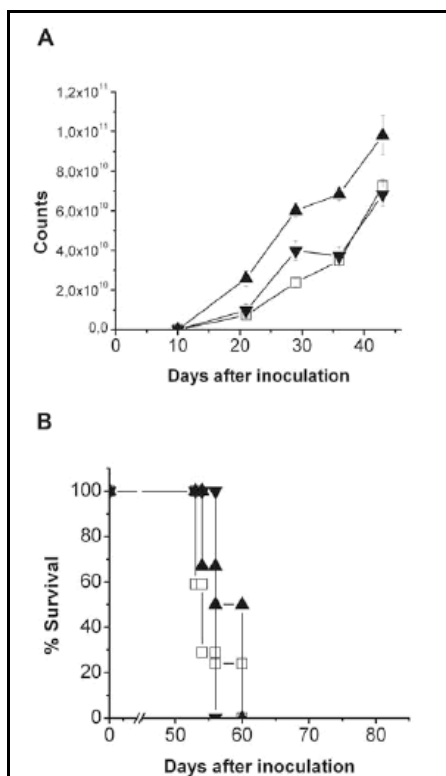
Durante il terzo anno di dottorato, finito lo sviluppo del sistema murino, numerosi esperimenti sono stati effettuati per valutare le associazioni Gemcitabina-STI571 e Alimta-STI571 già valutate sulle colture cellulari.

Il problema più grande da risolvere è stato quello di trovare le adeguate dosi dei farmaci da somministrare agli animali. I primi esperimenti sono stati eseguiti utilizzando le stesse dosi utilizzate per la terapia dell'uomo rapportate al peso degli

animali da trattare. Utilizzando questa strategia non è stato possibile osservare alcun effetto sulla crescita tumorale, in quanto il metabolismo del topo elimina molto più velocemente i farmaci rispetto agli esseri umani. La quantità di farmaco da somministrare per ottenere un effetto terapeutico, di conseguenza, risulta maggiore [41-43].

La ricerca approfondita della letteratura scientifica, ha permesso di definire le corrette dosi e le modalità di trattamento per ogni farmaco basate su specifici studi di farmacocinetica *in vivo*.

Dopo aver determinato la modalità di somministrazione maggiormente utilizzata per ogni farmaco, i topi inoculati con le cellule tumorali sono stati trattati con due differenti dosi di STI571 a 200mg/Kg e 100 mg/Kg. La massa tumorale di ogni animale è stata analizzata mediante imaging ogni settimana, in modo da determinare lo sviluppo delle neoplasie nel tempo. Il trattamento con la dose più alta, sorprendentemente produceva l'aumento significativo delle dimensioni tumorali, mentre la dose minore non induceva alcun cambiamento rispetto ai controlli trattati solo con il veicolo. La sopravvivenza dei topi non variava in entrambe i casi. La tossicità dei trattamenti è stata valutata misurando la variazione di peso dall'inizio alla fine delle somministrazioni dei farmaci. I topi trattati con la dose di 100 mg/Kg avevano un guadagno in peso comparabile con il controllo, mentre i topi trattati con la dose più alta a 200 mg/Kg risultavano avere un più basso guadagno di peso, indice di tossicità. Questi dati indicavano la dose 100mg/Kg come la migliore da utilizzare nelle terapie combinate.



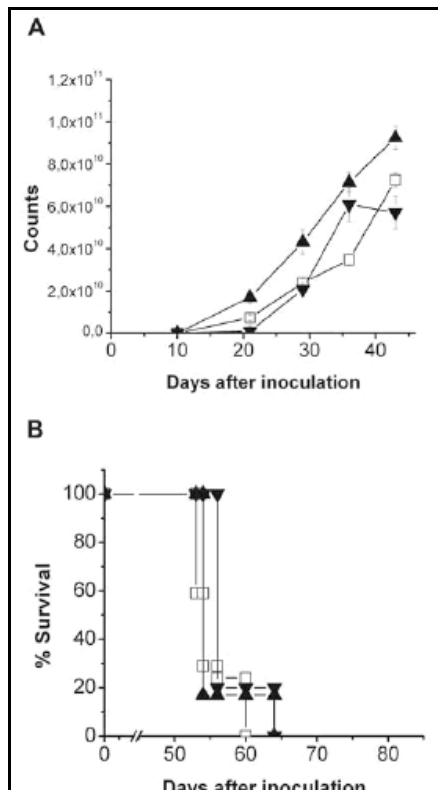
(A) Valutazione della crescita tumorale mediante analisi quantitativa del numero di fotoni emessi dai topi di controllo (□), trattati con STI571 alla dose di 200 mg/Kg (▲) e con STI 571 alla dose di 100 mg/Kg (▼); (B) Curva di sopravvivenza valutata con il metodo Kaplan-Meier dei topi di controllo (□), trattati con STI571 alla dose di 200 mg/Kg (▲) e con STI 571 alla dose di 100 mg/Kg (▼). I topi venivano soppressi nel momento in cui lo sviluppo dell'emipertoneo limitava la mobilità dell'animale.

Allo scopo di investigare l'efficacia dell'Alimta *"in vivo"*, sono stati iniettati, con le cellule REN/luc di mesotelioma esprimenti il gene per la proteina luciferasi, diciotto topi SCID divisi in tre gruppi: controllo trattato solo con il veicolo, Alimta a 250 mg/Kg e Alimta a 150 mg/Kg. Il trattamento alla dose più bassa produceva un leggero effetto di inibizione tumorale solo alla fine degli esperimenti, mentre la dose maggiore, sorprendentemente produceva un inaspettato aumento della massa tumorale già dalla prima somministrazione.

La tossicità dei trattamenti, misurata sulla base dei cambiamenti di peso corporeo, era confrontabile con quella dei topi di controllo e la sopravvivenza non risultava significativamente prolungata per entrambe le dosi testate. Nonostante la discrepanza dei nostri dati dalla ben stabilita efficacia dell'Alimta nel trattamento clinico del mesotelioma, i nostri risultati erano coerenti con quanto precedentemente determinato *"in vitro"*. Infatti, gli esperimenti di citotossicità sulle cellule della linea cellulare REN, dimostravano una resistenza più alta verso l'Alimta rispetto alla Gemcitabina.

Nonostante l'inefficacia dell'Alimta nel nostro modello murino, abbiamo comunque provato a combinare STI571 con la dose a 250 mg/Kg di Alimta dove è stato osservato l'aumento delle dimensioni tumorali. La combinazione con STI571 invertiva

l'effetto dell'Alimta riportando alle stesse dimensioni tumorali, pesi corporei e sopravvivenze dei topi di controllo.



(A) Valutazione della crescita tumorale mediante analisi quantitativa del numero di fotoni emessi dai topi di controllo (□), trattati con Alimta alla dose di 250 mg/Kg (▲) e con Alimta alla dose di 150 mg/Kg (▼); (B) Curva di sopravvivenza valutata con il metodo Kaplan-Meier dei topi di controllo (□), trattati con Alimta alla dose di 250 mg/Kg (▲) e con STI 571 alla dose di 150 mg/Kg (▼). I topi venivano soppressi nel momento in cui lo sviluppo dell'emiperitoneo limitava la mobilità dell'animale.

Per quanto riguarda la valutazione della Gemcitabina per il trattamento dei tumori stabiliti nei topi SCID, abbiamo definito diversi gruppi di trattamento ricevanti il veicolo di controllo e la Gemcitabina da sola alle concentrazioni di 120 mg/Kg, 60 mg/Kg e 30 mg/Kg. L'inibizione, dipendente dalla dose somministrata, è stata osservata per tutti i trattamenti, sebbene il trattamento con la Gemcitabina alla dose di 120 mg/Kg risultasse tossico ed è stato interrotto.

Per testare l'effetto della combinazione con STI571, la dose di 100 mg/Kg è stata somministrata insieme alle dosi di 60 mg/Kg e 30mg/Kg di Gemcitabina.

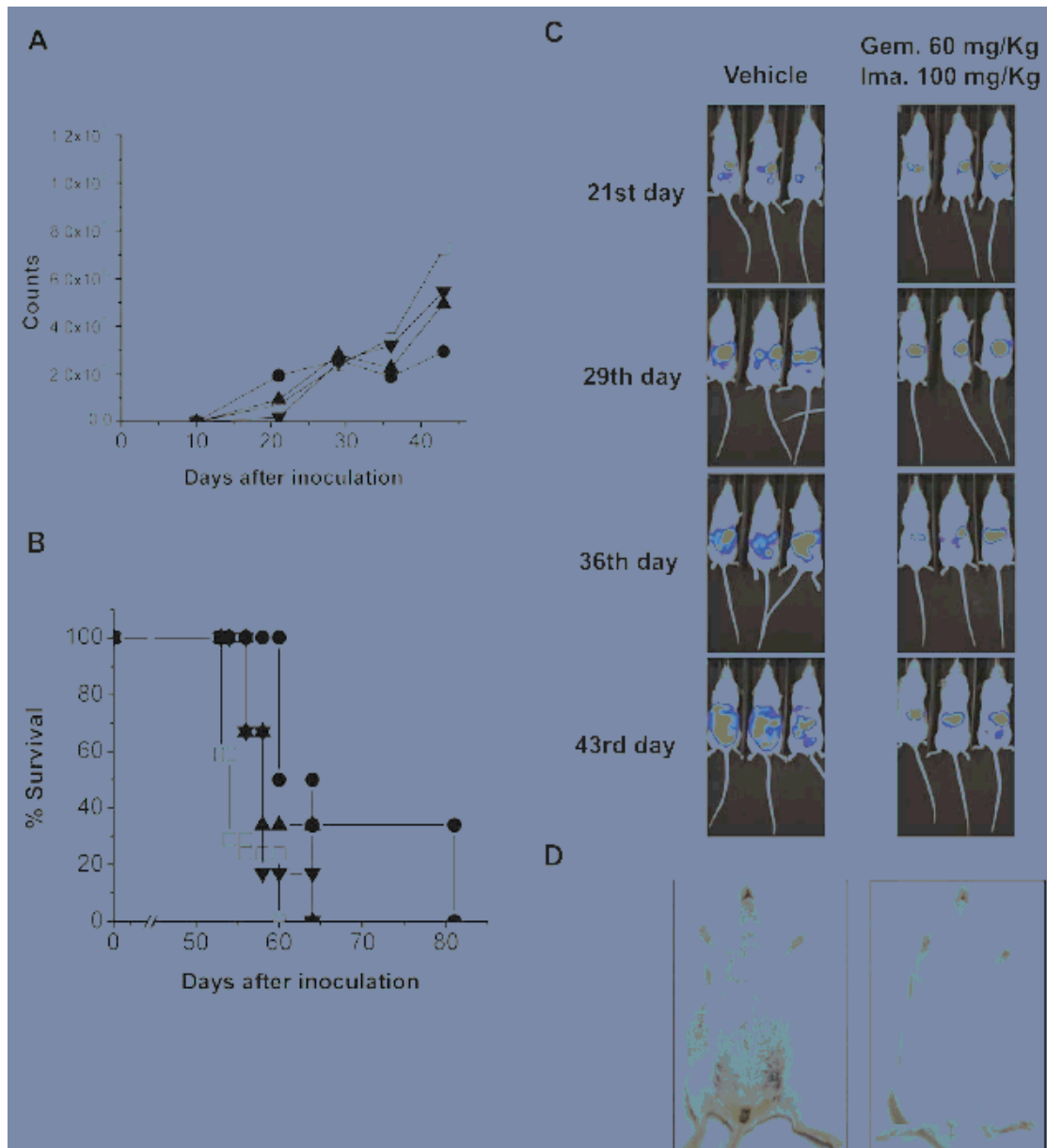
La Gemcitabina somministrata da sola a 60 mg/Kg ritardava significativamente lo sviluppo del tumore già alla fine dei trattamenti, mentre la dose a 30 mg/Kg rivelava un minore ritardo nella crescita neoplastica solo alla fine del periodo di monitoraggio con l'IVIS al giorno 43 dopo l'inoculo delle cellule tumorali.

Rispetto al monotrattamento con il chemioterapico, STI571 a 100 mg/Kg combinato con Gemcitabina a 60 mg/Kg causava l'aumento statisticamente significativo della soppressione della crescita tumorale alla fine del periodo di osservazione. Il trattamento combinato di STI571 con la dose efficace più bassa di Gemcitabina

induceva solo un leggero aumento dell'effetto del chemioterapico non statisticamente significativo. I cambiamenti nel peso corporeo dimostravano che i trattamenti a 60 mg/Kg ed a 30 mg/Kg di Gemcitabina, da sola o combinata con STI571, non causavano alcuna perdita di peso. In contrasto, la Gemcitabina da sola a 120 mg/Kg portava ad un'elevata perdita di peso indice di una forte tossicità.

La sopravvivenza dei topi trattati con la Gemcitabina da sola risultava invariata, mentre la combinazione con STI571 significativamente aumentava la permanenza in vita dei topi trattati con la dose a 60 mg/Kg. Infatti, al giorno 60 di osservazione, i topi trattati con il veicolo presentavano un rigonfiamento addominale marcato indice di ascite, rispetto ai topi trattati con la combinazione farmacologica, che non presentavano ancora alcun segno di sofferenza.

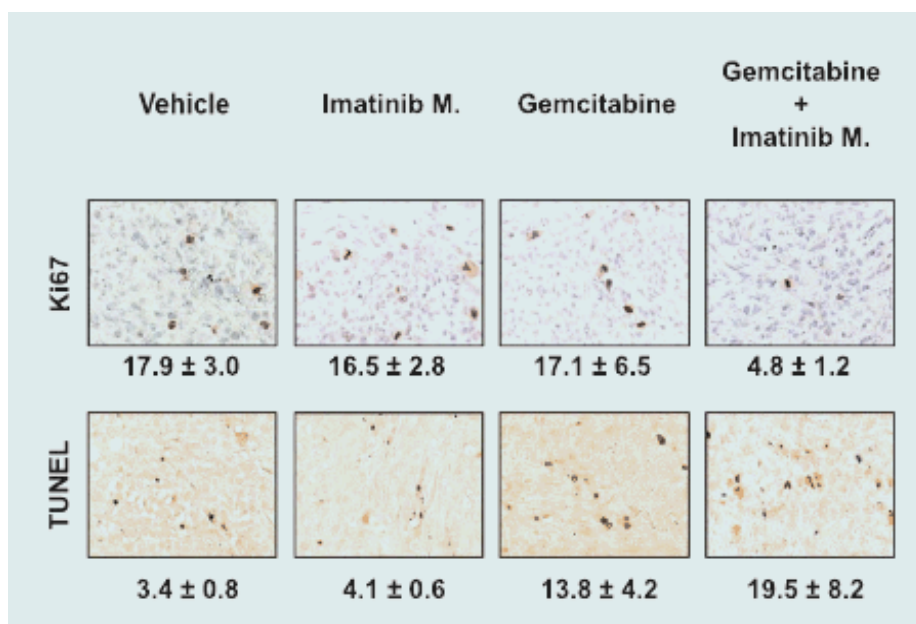
Questo studio è consistente con i nostri dati pubblicati recentemente e indicano chiaramente che la combinazione di STI571 insieme a Gemcitabina porta all'aumento dell'attività tumorale se comparata con l'efficacia del singolo chemioterapico da solo.



(A) Inibizione tumorale della Gemcitabina a 60 mg/KG combinata con STI571(●), confrontata con il veicolo (□) e la gemcitabina somministrata da sola a 60 mg/Kg(▲) ed a 30 mg/Kg(▼); **(B)** Analisi della sopravvivenza dei topi SCID trattati con il veicolo (□), la gemcitabina somministrata da sola a 60 mg/Kg(▲), la gemcitabina a 30 mg/Kg(▼) e la gemcitabina a 60 mg/KG combinata con STI571(●); **(C)** Le cellule REN/luc sono state inoculate nei topi nel giorno 0. I trattamenti sono stati somministrati dal giorno 13 al giorno 27 ed i topi sono stati analizzati settimanalmente al IVIS imaging per valutare la crescita tumorale; **(D)** al giorno 60, i topi trattati con il veicolo (sinistra) presentavano una marcata ascite se confrontati con i topi trattati con la combinazione Gemcitabina 60 mg/Kg-STI571 100 mg/Kg (destra).

Allo scopo di valutare la proliferazione cellulare ed il livello di apoptosi nei tumori dei diversi gruppi di trattamento, campioni delle masse neoplastiche sono stati rescissi, fissati in formalina, imbevuti in paraffina ed analizzati. La proliferazione cellulare è stata valutata mediante l'immunocolorazione con l'anticorpo per il Ki67 (antigene nucleare delle cellule proliferanti). Nei tumori dei topi di controllo, il numero medio di cellule Ki67 positive era di $17,9 \pm 3,0$. I trattamenti con STI571 a 100 mg/Kg da solo o con la gemcitabina 60mg/Kg da sola non variavano il numero delle cellule in divisione, mentre una diminuzione significativa del numero di cellule Ki67 positive, è stata osservata nei tumori trattati con la terapia combinata.

La valutazione dell'apoptosi nei mesoteliomi dei topi trattati è stata effettuata mediante TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling). Nei tumori dei topi di controllo, il numero medio di cellule tumorali apoptotiche era minimo ($3,4 \pm 0,8$). Il numero di cellule apoptotiche nei tumori dei topi trattati con STI571 da solo non era statisticamente differente dai tumori dei topi di controllo. La terapia con la Gemcitabina a 60 mg/Kg somministrata da sola induceva un significativo aumento del numero di cellule apoptotiche e la combinazione con STI571 ulteriormente aumentava questo effetto.



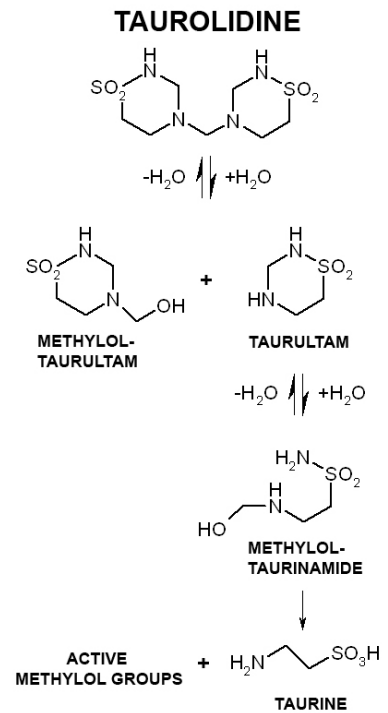
Analisi della proliferazione cellulare (Ki67) e dell'apoptosi (TUNEL) nei topi trattati con il veicolo, con STI571 (Imatinib Mesylate) a 100 mg/Kg da solo, Gemcitabina a 60 mg/Kg da sola o combinata con STI571 (Imatinib Mesylate) a 100 mg/Kg.

TAUROLIDINA

Taurolidina è un composto utilizzato con successo da anni, sia localmente sia sistemicamente, come soluzione di lavaggio peritoneale, al fine di prevenire l'insorgenza di peritoniti. Le sue proprietà sono probabilmente mediate da metaboliti attivi come gruppi idrossimetilici, dalla molecola di Taurultam e dall'amminoacido essenziale taurina [44].

Taurolidina possiede attività anti-adesiva ed è in grado di contrastare l'effetto delle endotossine. Inoltre è stata descritta la sua capacità di aumentare la sopravvivenza di un modello animale per il melanoma e di inibire la proliferazione di una linea cellulare metastatica di ratto, sia *in vitro* che *in vivo* [45]. Recentemente è stato dimostrato che Taurolidina sia in grado di inibire la sintesi proteica in cellule di adenocarcinoma del colon, come anche in cellule procariotiche. Il meccanismo d'azione non è ancora ben chiaro, tuttavia esistono evidenze del fatto che la molecola di Taurolidina eserciti un effetto pro-apoptotico [46].

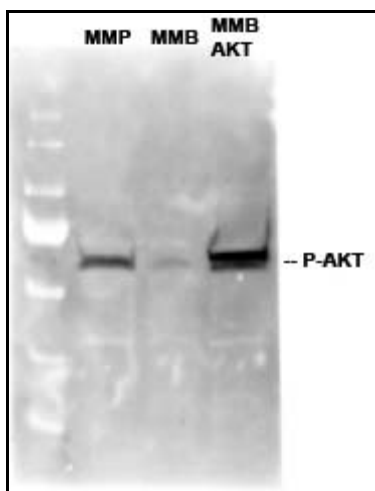
Gli esperimenti condotti in precedenza nel laboratorio di Biologia Molecolare hanno evidenziato l'effetto citotossico di Taurolidina sulle cellule di mesotelioma maligno e l'inefficacia di questo farmaco verso le cellule mesoteliali normali. Le proprietà citotossiche della Taurolidina dipendevano sia dalla dose che dal tempo di esposizione delle cellule tumorali. Inoltre, le cellule di mesotelioma andavano in apoptosi quando trattate con Taurolidina, come confermato dai precedenti esperimenti di legame dell'Annessina V, di frammentazione del DNA, clivaggio delle PARP e TUNEL. Ulteriori esperimenti hanno dimostrato che l'effetto citotossico di questo farmaco era collegato con l'inibizione della fosforilazione della proteina Akt, mentre l'attivazione delle chinasi ERK1/2 non veniva alterata. Il meccanismo di azione della Taurolidina è stato definito misurando la produzione di nitriti dimostrando che lo stress ossidativo aveva un ruolo fondamentale. Tutti i precedenti esperimenti condotti



Schema delle reazioni idrolitiche che portano alla formazione di gruppi idrossimetilici attivi e taurina a partire dalla molecola di Taurolidina.

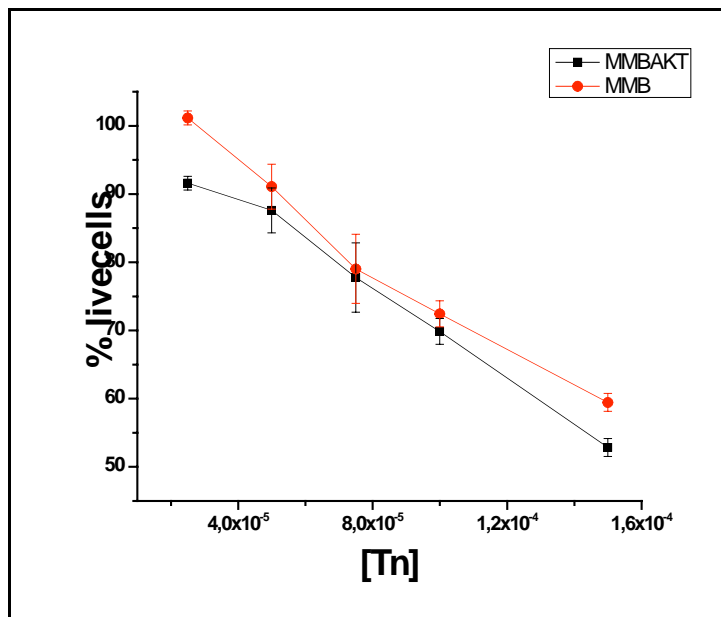
utilizzando donatori di sulfidrilici come il Glutatione-monoetilestere (GSH) o L-N-acetilcisteina (L-NAC), hanno confermato questo dato.

Durante il terzo anno di dottorato si è presentata la necessità di terminare questo progetto di studio sugli effetti della Taurolidina. Allo scopo di completare il lavoro per pubblicare i dati descritti fino ad ora, la dipendenza da Akt del meccanismo d'azione della Taurolidina andava confermato. A tale proposito, sono state transfettate le cellule di mesotelioma MMB con un plasmide codificante la proteina Akt costitutivamente attivata mediante la sua fusione con un peptide miristilabile (Akt-myr).



Western Blotting con anticorpo anti-fosfoAkt su cellule di mesotelioma maligno MMP (controllo positivo) e MMB, prima e dopo la transfezione col plasmide "pcDNA3 Myr HA Akt1".

Confrontando la sensibilità alla Taurolidina delle cellule MMB con le stesse cellule in cui era stata indotta geneticamente l'attivazione di Akt (MMB-Akt), si poteva confermare con certezza l'implicazione di questa proteina anti-apoptotica nel meccanismo d'azione del farmaco. A questo proposito le due linee cellulari sono state analizzate mediante saggio MTT per la loro capacità di resistere all'azione di Taurolidina. Sorprendentemente, diversamente da quanto atteso, le cellule MMB e le MMB-Akt avevano le stesse caratteristiche di resistenza alla Taurolidina.



Saggio MTT effettuato a 48 ore sulle cellule di mesotelioma maligno MMB e sulle stesse cellule geneticamente

In considerazione di questi ultimi esperimenti, Akt non partecipa in modo determinante al meccanismo d'azione di Taurolidina. Lo scopo dei prossimi esperimenti, sarà quello di ricercare altre molecole in modo da definire con precisione la cascata di eventi intracellulari che causano la morte per apoptosi delle cellule tumorali trattate con Taurolidina.

□ DISCUSSIONE

Durante il terzo anno di dottorato tre differenti linee di ricerca sono state seguite riguardanti: i meccanismi di carcinogenesi, le terapie combinate con STI571 e il meccanismo d'azione della Taurolidina.

Riguardo ai meccanismi di carcinogenesi, in questo terzo anno di dottorato, abbiamo concluso gli esperimenti sulla carcinogeneità dell'erionite pubblicando i dati relativi. La controversia mondiale sul ruolo del crisotilo come carcinogeno in grado di causare il MM ci ha suggerito di iniziare a studiare questo particolare tipo di asbesto in collaborazione con il Prof. Michele Carbone. Durante il quarto anno di dottorato, che passerò nel laboratorio situato al "Cancer Research Center of Hawai'i", con lo stesso approccio scientifico utilizzato in passato per gli studi precedentemente effettuati sull'erionite e sugli asbesti anfiboli, inizierò gli esperimenti per definire il meccanismo trasformante di questo discusso asbesto.

Riguardo alle terapie combinate con STI571, il lavoro del terzo anno ha portato alla conclusione e alla conseguente pubblicazione dell'articolo riguardante la sinergia di STI571 con Gemcitabina e Alimta. Dopo aver terminato la fase di sviluppo del nuovo modello murino di mesotelioma, in collaborazione con il Dr. Michele Cilli dell'IST di Genova, sono state valutate le due combinazioni dei farmaci già testate sulle colture cellulari. Il modello murino da noi sviluppato, oltre ad aver confermato la combinazione Gemcitabina-STI571 come idonea per il trattamento del mesotelioma, ci sarà utile nei prossimi anni per confermare l'efficacia di tutti i farmaci precedentemente valutati sulle colture cellulari. Tra i farmaci che si potranno sperimentare *in vivo*, la Taurolidina è quella che probabilmente sarà utilizzata per prima nei prossimi esperimenti. Nonostante il fallimento nel definire la proteina antiapoptotica Akt come determinante nel meccanismo d'azione di Taurolidina, gli esperimenti su questo promettente farmaco continueranno per scoprire nuove proteine coinvolte e per valutare l'effettiva efficacia nella cura del mesotelioma maligno.

□ SEMINARI FREQUENTATI

- 6 Novembre 2006 Basi genetiche delle malattie cistiche del rene
Prof. A. Amoroso
- 17 Novembre 2006 Correlazioni clinico molecolari nelle malattie linfoproliferative.
Dr D. Rossi
- 19 Novembre 2006 Diacilglicerolo cinasi alpha nella traduzione del segnale
Dr G. Baldanzi
- 27 Novembre 2006 Creazione di antigen protein microarray a fini di ricerca e diagnostica
Dr.ssa P. Secco
- 29 Novembre 2006 Patogenesi molecolare dei linfomi associati ad immunodeficienza
Dr.ssa D. Capello
- 15 Dicembre 2006 Caratterizzazioni di reazioni autoimmuni nell'epatopatia alcolica
Prof. M. Vidali
- 10 Gennaio 2007 Silenziamento genico mediante espressione di shRNA
Prof.ssa P. Defilippi
- 12 Gennaio 2007 Modulazione funzionale del canale cardiaco Kv4.3 da parte di subunità accessorie
Dr. D. Cotella
- 15 Gennaio 2007 Studio di fattori genetici coinvolti nella suscettibilità alla Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)
Dr.ssa L. Corrado
- 17 Gennaio 2007 Detection of miRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR regions
Prof. M. Caselle
- 18 Gennaio 2007 Patogenesi del Diabete Mellito tipo I: stiamo vinendo o stiamo perdendo?
Prof. G. F. Bottazzo
- 19 Gennaio 2007 Attività non endocrina di grelina
Dr.ssa N. Filigheddu
- 25 Gennaio 2007 Proteine adattatrici p130Cas e p140Cap nella trasformazione cellulare e nel cancro alla mammella
Prof.ssa P. Defilippi

- 1 Febbraio 2007 Gene Therapy strategies for Phenylketonuria
Dr B. Thöny
- 2 Febbraio 2007 A novel autoantigen in systemic sclerosis: the interferon-inducible gene IFI16
Dr M. Mondini
- 22 Febbraio 2007 Sindrome X-fragile
Prof.ssa Bagni
- 9 Marzo 2007 Vita, opere e miracoli dell'epatocita
Prof. Tripodi
- 14 Marzo 2007 Protein Microarrays. Development of new supports for improved sensitivity
Dr.ssa M. Cretich
- 16 Marzo 2007 Microarray su tessuti: strategia per identificare nuovi biomarkers tumorali per applicazioni cliniche
Prof.ssa M. Capra
- 17 Marzo 2007 Drosophila as a model for aging and cancer
Prof. D. Bohmann
- 29 Marzo 2007 Marcatori farmacogenetici nel carcinoma coloretale: quali prospettive per una terapia personalizzata?
Prof. E. Mini
- 12 Aprile 2007 Relazioni tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del Protein Data Base
Dr. M. Milanesio
- 16 Marzo 2007 Difetti genetici del pre-B Cell Receptor
Dr.ssa S. Ferrari
- 23 Marzo 2007 Predisposizione genetica al cancro polmonare
Dr T. A. Dragani
- 25 Marzo 2007 The regulation of hematopoietic stem cells by SMAD signaling
Prof. S. Karlsson
- 28 Marzo 2007 Translating basic science into therapeutic strategies for Shwachman Diamond syndrome
Prof. S. Ellis
- 4 Giugno 2007 Sindromi autoinfiammatorie
Prof. Martini

❑ CORSI FREQUENTATI

- Statistica (2° anno)
- Inglese (2° anno)

❑ 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"
- Mesothelioma, Early Detection, Diagnosi and Therapeutic Implication. Honolulu, HI, 17 Agosto 2007

❑ 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. Int J Cancer. 2007 Jul 1;121(1):12-20.
- Preliminary data suggestive of a novel translational approach to mesothelioma treatment: imatinib mesylate with gemcitabine or pemetrexed. Pietro Bertino, Camillo Porta, Dario Barbone, Serena Germano, Sara Busacca, Sabrina Pinato, Gianfranco Tassi, Roberto Favoni, Giovanni Gaudino, and Luciano Mutti. Thorax. 2007 Aug;62(8):690-5
- Imatinib Mesylate enhances therapeutical effects of gemcitabine in human malignant mesothelioma xenografts. Pietro Bertino, Federica Piccardi, Camillo Porta, Roberto Favoni, Michele Cilli, Luciano Mutti and Giovanni Gaudino. Clin Can Res. (accepted in September 2007)

❑ 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., *Intrapleural 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. Smith, A.H. and C.C. Wright, *Chrysotile asbestos is the main cause of pleural mesothelioma*. Am J Ind Med, 1996. **30**(3): p. 252-66.
20. 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.
21. Klein, G., A. Powers, and C. Croce, *Association of SV40 with human tumors*. Oncogene, 2002. **21**(8): p. 1141-9.
22. 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.
23. 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.
24. Stein, R.C., *Prospects for phosphoinositide 3-kinase inhibition as a cancer treatment*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(3): p. 237-48.
25. 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.

26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Manley, P.W., et al., *Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor.* Eur J Cancer, 2002. **38 Suppl 5**: p. S19-27.
30. Buchdunger, E., T. O'Reilly, and J. Wood, *Pharmacology of imatinib (STI571).* Eur J Cancer, 2002. **38 Suppl 5**: p. S28-36.
31. 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.
32. 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.
33. Manegold, C. and J. Aisner, *Pemetrexed for diffuse malignant pleural mesothelioma.* Semin Oncol, 2002. **29**(2 Suppl 5): p. 30-5.
34. 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.
35. Manegold, C., *Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer.* Semin Oncol, 2001. **28**(2 Suppl 7): p. 1-6.
36. Orlando, M. and M. Mandachain, *Gemcitabine in ovarian cancer.* Semin Oncol, 2001. **28**(3 Suppl 10): p. 62-9.
37. 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.
38. 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.

39. 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.
40. Tallarida, R.J., *Drug synergism: its detection and applications*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(3): p. 865-72.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. Opitz, I., et al., *Taurolidine and povidone-iodine induce different types of cell death in malignant pleural mesothelioma*. Lung Cancer, 2007. **56**(3): p. 327-36.
45. Opitz, I., et al., *Local recurrence model of malignant pleural mesothelioma for investigation of intrapleural treatment*. Eur J Cardiothorac Surg, 2007. **31**(5): p. 773-8.
46. Nici, L., B. Monfils, and P. Calabresi, *The effects of taurolidine, a novel antineoplastic agent, on human malignant mesothelioma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(22): p. 7655-61.