

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



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
*Ciclo XXII***

Relazione 1° anno

**TITOLO:
Ruolo della proteina Gas6 come inibitrice
della neo-angiogenesi tumorale**

Candidato: Dott. Pier Paolo Sainaghi
Tutor: Prof. Gian Carlo Avanzi

SEZIONE 1

RISULTATI SCIENTIFICI

INTRODUZIONE

La neoangiogenesi tumorale.

Un tumore primitivo riesce a utilizzare ossigeno e nutrienti per diffusione fino a quando ha un diametro di 1-2 mm, ma per accrescersi ulteriormente necessita di un adeguato apporto ematico tramite la formazione di nuovi vasi. Tale processo viene definito neoangiogenesi, ovvero l'espansione della rete vascolare a partire da vasi preesistenti (Risau W, 1997).

Dapprima si verifica un aumento della della sintesi proteica da parte della cellula endoteliale, che attiva la degradazione della membrana basale e della matrice extracellulare, quindi la cellula endoteliale migra e prolifera nella matrice circostante, permettendo la formazione di "sprouts" o prolungamenti del vaso principale che si accresceranno ulteriormente. Infine l'interazione tra i componenti della matrice extracellulare (ECM) e le integrine espresse sulla membrana plasmatica consente alla cellula endoteliale la sopravvivenza e la regolazione della sintesi di recettori per i fattori di crescita. La cellula endoteliale cambia forma, assumendo una struttura tubulare in risposta a segnali della matrice e a fattori angiogenetici attivatori ed inibitori. Infine con la deposizione della membrana basale intorno al vaso neoformato, ed il reclutamento di cellule accessorie quali periciti e cellule muscolari lisce, che stabilizzano la struttura, si completa il processo di maturazione e rimodellamento vasale che porta alla formazione definitiva del nuovo vaso, che tuttavia presenta un andamento irregolare, un aumento della permeabilità, una membrana basale ridotta ed un aumento della proliferazione cellulare (Risau W, 1997; Darland DC e D'Amore PA, 1999; Carmeliet P, 2000). Questa fase del processo tumorigenico è stata definita come "switch" angiogenetico e la riuscita dell'intero processo è possibile grazie al rilascio da parte del tumore di attivatori diffusibili dell'angiogenesi (Hanahan D e Folkman J, 1996).

Molti sono i fattori coinvolti nel fenomeno angiogenetico, si ricorda tuttavia soprattutto in questo contesto la famiglia del Vascular Endotelial Growth Factor (VEGF). La famiglia del VEGF è composta da diverse proteine denominate VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, la più importante delle quali è sicuramente VEGF-A. Esistono diverse isoforme di VEGF-A che differiscono per il numero di residui amminoacidici e per le proprietà chimiche e di localizzazione nei vari tipi cellulari. Sono stati identificati tre recettori per la famiglia dei

VEGF, di tipo tirosin chinasi, denominati VEGFR-1 a cui si legano VEGF-A e VEGF-B; VEGFR-2 a cui si legano VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, e VEGFR-3 i cui ligandi sono VEGF-C e VEGF-D. VEGFR-1 e VEGFR-2 sono ampiamente presenti sull'endotelio vascolare, mentre VEGFR-3 è presente sull'endotelio del sistema linfatico (Carmeliet P, 2000). Gli effetti biologici di VEGF sono diversi in funzione del tipo di recettore con il quale interagisce. Mentre l'interazione del VEGF-A con VEGFR-2 è seguita in vitro da proliferazione, migrazione e "sprouting" delle cellule endoteliali e contribuisce alla formazione di strutture tubulari, nessun effetto mitogeno segue il legame di VEGF con VEGFR-1. Questa seconda interazione attiva invece la via del fosfatidil inositolo (PI3) e pare essere coinvolta in fasi più tardive dell'angiogenesi, ossia nel rimodellamento e nella stabilizzazione dei vasi. Studi condotti su topi knock-out per VEGFR-1, infatti, hanno evidenziato la perdita dell'organizzazione morfologica con cellule endoteliali in eccesso nel lume dei canali vascolari (Fong GH et al, 1995). VEGFR-1 può essere considerato un antagonista di VEGFR-2, perché sequestrando il VEGF blocca il segnale di trasduzione attraverso il VEGFR-2, risultando un regolatore negativo dell'angiogenesi (Ferrara N et al, 2003).

Il VEGF viene iperespresso da diversi tipi cellulari di tumori quali il carcinoma prostatico, le neoplasie della vescica, il neuroblastoma, il carcinoma del colon-retto, il carcinoma della cervice uterina, il carcinoma mammario, le neoplasie della laringe, il carcinoma a cellule renali, il mieloma multiplo, il sarcoma di Kaposi, il carcinoma dell'esofago, l'epatocarcinoma, i tumori polmonari non a piccole cellule, alcuni tumori endocrini, il melanoma e molti altri ancora (Masabumi S, 2003; Turner HE et al, 2003).

Gas6

Il gene Gas6 è stato identificato e clonato nel 1988 insieme ad altri 5 geni caratterizzati dall'essere espressi durante la fase G0 del ciclo cellulare in fibroblasti murini e denominato Growth Arrest Specific Gene 6 (Schneider C et al, 1988). Nel 1993 è stato clonato il gene umano del Gas6. Si compone di 2556 nucleotidi e codifica per una proteina secreta (Manfioletti G et al, 1993). Gas6 è espresso in vari tessuti murini (SNC, cellule del Sertoli e del Leydig, cellule endoteliale, precursori emopoietici mieloidi, cellule stromali midollari, monociti, VSMCs) (Lu Q et al, 1999; Prieto AL et al, 1999; Avanzi GC et al, 1998; O'Donnell H et al 1999, Nakano T et al, 1995) e umani (epitelio intestinale, midollo osseo, cellule endoteliali, VSMCs, tessuto ematopoietico, fibroblasti) (Manfioletti G et al, 1993; Avanzi GC et al, 1997 e Melaragno MG et al, 1998).

Gas6 è una proteina composta di motivi strutturali caratteristici: un dominio amino-terminale γ -carbossilato, seguito da quattro sequenze ripetute EGF-like e da un doppio dominio globulare carbossi-terminale. Gas6 è un membro della famiglia delle proteine vitamina K dipendenti, infatti, per la sua attività è necessaria la γ -carbossilazione dei residui di acido glutammico dei domini globulari carbossi-terminali. Presenta analogie (identità al 44%) di sequenza con la proteina S, una proteina plasmatica che regola negativamente la coagulazione, e in minor percentuale con una proteina coinvolta nel trasporto di ormoni steroidei, la SHBG (Sex Hormones Binding Globulin) (Manfioletti G et al, 1993 e Joseph DR, 1997).

Gas6 lega con differente affinità, i membri di una famiglia di recettori tirosin-chinasici (RTKs) i cui membri sono Axl, Tyro-3 e Mer (Varnum BC et al, 1995; Stitt TN et al, 1995; Godowsky PJ et al, 1995; Chen J et al, 1997). Il recettore Axl è quello dotato di maggiore affinità per Gas6. E' presente nel tessuto emopoietico normale e neoplastico, in cellule endoteliali, fibroblasti, condrociti, VSMCs e nei monociti del sangue periferico (O'Bryan Jp et al, 1991; Neubauer A et al, 1994). Il recettore Tyro-3 è espresso in particolare nel sistema nervoso centrale, mentre Mer è presente sui monociti circolanti, in precursori ematopoietici midollari.

Gas6 e angiogenesi

I vasi possono essere un bersaglio dell'asse Gas6/Axl, essendo entrambe molecole espresse dalle cellule endoteliali (EC) (Manfioletti G et al, 1993; Manzow S et al, 1996), dai periciti (Collett G et al, 2003) e dalle cellule muscolari lisce (Melaragno MG et al, 1998). Inoltre la sopravvivenza dei vasi risulta alterata nei topi knock-out per i geni Ark, Rse, Mer (Prieto AL et al, 1999).

In un recente studio, è stato indagato il ruolo dell'asse Gas6/Axl nell'angiogenesi, dimostrando in vitro che Gas6 può inibire l'attivazione delle cellule endoteliali dipendente da VEGFR-2 (Gallicchio M et al, 2005). In vitro infatti Gas6 è risultato inibire la chemiotassi delle EC dipendente da VEGF-A e la morfogenesi delle cellule endoteliali su Matrigel impedendo la differenziazione in reti tubulari geometriche con massimo effetto inibitorio alla concentrazione 80-100 ng/ml. Inoltre Gas6 è risultato inibire la vascolarizzazione dipendente dal VEGF-A in vivo nel modello di membrana corion-allantoidea di embrione di pollo (CAM) alla concentrazione di 20 ng/spugna.

Modelli di studio della neoangiogenesi.

Esiste una grande varietà di metodi descritti, sia in vivo che in vitro.

I modelli dell'angiogenesi in vitro si focalizzano sulla misurazione della migrazione, proliferazione e tubulizzazione delle cellule endoteliali in risposta agli agenti esogeni stimolatori o inibitori. I saggi in vitro sono rapidi, quantificabili e riproducibili. Tuttavia non esiste attualmente in vitro un modello che simuli completamente il processo angiogenetico ovvero che oltre alle cellule endoteliali valuti anche le cellule di supporto (i periciti, le cellule muscolari lisce, i fibroblasti e, nel caso dei tumori, le cellule neoplastiche), la matrice extracellulare, le vicine cellule mesenchimali e la circolazione sanguigna (Staton CA et al, 2004).

In vivo, invece, sono presenti tutti i componenti del processo, ma vi sono limitazioni legate allo specifico microambiente, ai siti di inoculo, alle specie usate e al modo di somministrazione della sostanza da testare. Il modello "Plug di Matrigel" fornisce in vivo un microambiente naturale per l'angiogenesi; Matrigel è una matrice extracellulare prodotta dal sarcoma murino di Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), costituita in modo predominante da laminina (60%), collagene IV (30%), nidogeno (5%) eparan-solfati, proteoglicani (3%) ed entactina (1%). In questa matrice le cellule endoteliali coltivate in vitro attecchiscono e rapidamente formano tubuli (in 4-12 ore). Recentemente è stata sviluppata una forma di Matrigel depletato di fattori di crescita che evita i problemi associati alla forte stimolazione che le cellule endoteliali subiscono nel primo caso. Il Matrigel è allo stato liquido a 4°C e solidifica rapidamente a temperature superiori. Questa caratteristica peculiare lo rende particolarmente adatto all'inoculo in animali da esperimento; allo stato liquido può essere mescolato ai reagenti da saggiare nel corso dell'esperimento ed una volta iniettato sottocute, solidifica rapidamente a costituire una massa omogenea, detta "plug" che può essere asportata dopo il sacrificio dell'animale al termine dell'esperimento. I limiti del Matrigel risiedono nel fatto che è costoso e richiede tempo e numerosi esperimenti per la messa a punto (Staton CA et al, 2004).

Altri modelli in vivo molto promettenti sono l'"Angiomouse", utilizzato per impiantare linee cellulari transfettate con GFP in modo che le reti vascolari appaiono scure in campo verde (tumore impiantato); il metodo permette una visualizzazione non invasiva dell'angiogenesi e soprattutto in tempo reale utilizzando un microscopio stereotassico a fluorescenza. (Staton CA et al, 2004)

SCOPO DEL LAVORO

Il processo angiogenetico è noto come fattore favorente la progressione neoplastica (Folkman J, 1995). Il VEGF rappresenta uno dei più studiati e principali mediatori della neoangiogenesi tumorale; esso favorisce la proliferazione e la migrazione delle cellule endoteliali e contribuisce alla formazione di strutture tubulari tramite interazione con il VEGFR-2 (Ferrara N, 2002).

È inoltre stato dimostrato che VEGF viene iperespresso da diversi tipi di tumori umani e che la sua iperespressione favorisce la resistenza al trattamento citotossico, sia chemio che radioterapico e la crescita tumorale e il potenziale invasivo-metastaticizzante. Questo ha portato a considerare la terapia antiangiogenica come elemento importante nel trattamento di molte neoplasie (Folkman J, 1995).

Gas6, una proteina di 75 KDa, è risultata in uno studio in vitro inibire l'angiogenesi VEGF dipendente attraverso un meccanismo di defosforilazione del VEGFR-2 tramite il recettore Axl e la proteina fosfatasi SHP-2. Inoltre Gas6 è risultato inibire l'angiogenesi VEGF dipendente "in vivo" nel saggio della membrana corion-allantoidea di pollo (Gallicchio et al., 2005).

Sulla base di queste premesse si può ipotizzare che Gas6 possa essere un potenziale inibitore anche della neoangiogenesi tumorale VEGF dipendente.

Lo scopo del presente studio è quindi quello di valutare l'effetto della proteina Gas6 verso l'angiogenesi tumorale VEGF dipendente "in vivo" ed in particolare nel modello murino di angiogenesi con "matrigel plug".

Gli obiettivi del progetto saranno quindi i seguenti:

- **Confermare l'effetto della proteina Gas6 rispetto all'angiogenesi VEGF dipendente nel modello murino di "matrigel plug".**

Tale conferma risulta necessaria in quanto il modello murino di matrigel plug permette di simulare il processo di invasione vascolare di una matrice fibro-connettivale preesistente; evento simile a quanto avviene nell'angiogenesi tumorale in cui si osserva la migrazione di nuovi vasi all'interno di tessuti preesistenti.

- **Valutare l'effetto della proteina Gas6 rispetto all'angiogenesi tumorale VEGF dipendente nel modello murino di "matrigel plug".**

Tale obiettivo verrà valutato analizzando l'effetto di Gas6 sulla neoangiogenesi indotta mediante impianto diretto di cellule tumorali wild type (wt) e trasfettate per overesprimere Gas6 singeniche con i topi C57BL/6 e inoculo del surnatante da coltura cellulare delle stesse nel matrigel plug. Inoltre si valuterà l'effetto di Gas6 sia somministrato nel plug di matrigel sia per via parenterale (intraperitoneale).

- **Valutare l'effetto della proteina Gas6 rispetto alla crescita tumorale di linee tumorali produttrici di VEGF in modelli murini "in vivo".**

Tale obiettivo verrà valutato analizzando l'effetto di Gas6 sulla crescita di neoplasie ottenute da inoculo sottocutaneo di linee tumorali produttrici di VEGF wt e trasfettate per overesprimere Gas6. Ove opportuno il Gas6 verrà somministrato per via intraperitoneale.

MATERIALI E METODI

Animali

- Topi C57BL/6NCrIBR di sesso maschile, età 6 settimane (Charles River Laboratories, Lecco, Italia)

Sostanze e reagenti

- Grow Factor Reduced Matrigel Matrix (Becton Dickinson Italia).
- Gas6 murino ricombinante (R&D Systems Italia)
- VEGF-A164 murino ricombinante (R&D Systems Italia)
- Ematossilina ed eosina
- Drabkin's Reagent (1 g/l di NaHCO₃, 200 mg/l di potassio ferricianato e 50 mg/l di potassio cianato) (Sigma, Italia).
- Emoglobina Bovina (Sigma, Italia).

Materiale di consumo ed apparecchiature

- Microscopio Olympus BX 51
- Fotocamera digitale Olympus C-3030 ADU
- Microtomo a slitta
- Spettrofotometro, Beckton Dickinson.

Saggio di angiogenesi con matrigel plug.

Numerosi esperimenti preliminari sono stati condotti per mettere a punto le seguenti variabili sperimentali: il volume minimo di matrigel da inoculare per avere dati ripetibili, la concentrazione dei fattori proangiogenetici, il tempo necessario di impianto delle masse per ottenere un'angiogenesi valutabile, le procedure di analisi dei risultati.

Qui di seguito sono riportate solo le condizioni sperimentali al termine della messa a punto del metodo.

Il Matrigel, conservato allo stato solido a -20°C, viene scongelato lentamente a 4°C. Mediante l'uso di pipettatore con puntali pre-refrigerati a 4°C, viene prelevata la quantità di Matrigel necessaria per l'esperimento. I campioni vengono allestiti in sterilità mediante l'uso di cappa a flusso laminare. Tutte le tappe di allestimento dei campioni vengono eseguite in ghiaccio al fine di mantenere il Matrigel allo stato liquido.

Il matrigel allo stato liquido viene addizionato con le molecole favorenti l'angiogenesi (rmVEGF 100 ng/ml, surnatante cellule B16F10 alla diluizione 1:5 in presenza/assenza della proteina Gas6 (rmGas6 500 ng/ml). Ogni esperimento viene condotto in presenza degli opportuni controlli negativi (solo matrigel e solo rmGas6). Le singole provette vengono agitate mediante Vortex, in modo da rendere omogenea la diffusione dei diversi fattori nella matrice. Aliquote di 350 µl dei diversi preparati di Matrigel vengono trasferite mediante aspirazione molto lenta, per non generare bolle, in siringhe da 1 ml dotate di ago 25 Gauge, pre-refrigerate a 4°C. Le siringhe vengono dotate di un codice e poste in ghiaccio in attesa dell'inoculo.

I topi vengono anestetizzati uno alla volta mediante esposizione a vapori di etere per circa 30-45". Una volta anestetizzato, l'animale viene tenuto per coda e collottola da un operatore. Un secondo operatore esegue l'inoculo nel sottocute in sede interscapolare. Prima dell'iniezione del Matrigel viene eseguito uno scollamento dei tessuti mediante movimento laterale dell'ago in modo da formare lo spazio che conterrà la masserella. Dopo l'iniezione l'ago viene mantenuto in sede per 10". Gli animali vengono riposti quindi nelle gabbie precedentemente allestite (una per ogni gruppo sperimentale).

Al settimo giorno dall'inoculo i topi vengono sacrificati mediante dislocazione cervicale previa anestesia. Viene eseguito un taglio della cute dorsale a losanga. I lembi cutanei vengono scollati dal sottocute sino ad esposizione delle masserelle di Matrigel che risultano facilmente visibili e vengono isolate dai tessuti circostanti. Viene eseguita una accurata rimozione dei tessuti circostanti le masse di matrigel.

Quantificazione della neoangiogenesi.

Tecnica istopatologica.

Le masse asportate vengono poste in apposite biocassette contrassegnate da un codice di identificazione e quindi immerse in soluzione tamponata di formalina al 4% per la fissazione. Dopo 24 ore i campioni vengono processati per l'inclusione in paraffina.

Dopo l'inclusione, previo raffreddamento del blocchetto istologico in congelatore a -20°C per 30', vengono tagliate con microtomo sezioni di spessore variabile tra 3 e 5 µm, posizionate su vetrino e fissate mediante incubazione in termostato a 60°C per 15 min. I vetrini vengono contrassegnati con gli stessi codici riportati sulle biocassette.

Successivamente le sezioni vengono sparaffinate e rese idrofile mediante bagni in concentrazioni scalari decrescenti prima di xilolo e poi di etanolo. A questo punto viene

eseguita colorazione con ematossilina di Mayer ed eosina, mediante apparecchio automatico Zeiss Micron. I vetrini vengono infine disidratati in scala di alcoli, chiarificati in xilolo e montati in balsamo. Le sigle di identificazione dei vetrini vengono oscurate con etichette adesive sulle quali viene riportata una numerazione casuale in modo che i campioni non siano riconoscibili durante le valutazioni.

I vetrini, dunque, vengono osservati in cieco da due operatori mediante microscopio ottico (Olympus BX 51). Viene effettuata una visione d'insieme per stabilire l'idoneità del campione (vengono esclusi i campioni in cui l'area di matrigel è inferiore ad 1 campo ottico 100x, oppure i campioni con più di 3 frammentazioni per campo ottico a 100x). Se il campione viene considerato idoneo all'analisi, vengono selezionate le 5 aree più vascolarizzate (hot spots) e analizzate ciascuna a 200x. Dalla valutazione di tali aree viene assegnato un punteggio da 0 a 4 utilizzando la seguente scala di valutazione morfologica modificata da Weidner (1991):

0: assenza o rare cellule

1: presenza di cellule non organizzate

2: presenza un fronte compatto di infiltrazione cellulare o formazioni tubulari senza lume (cordone con più di 5 cellule).

3: riscontro di vasi formati con lume visibile, ma assenza di globuli rossi

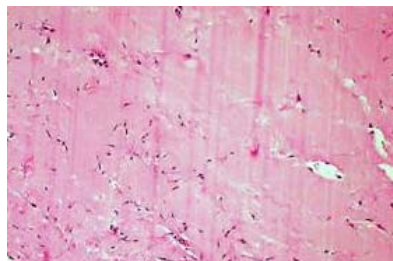
4: presenza di vasi canalizzati e interconnessi tra loro, con globuli rossi nel lume



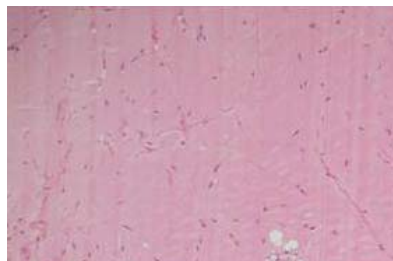
0



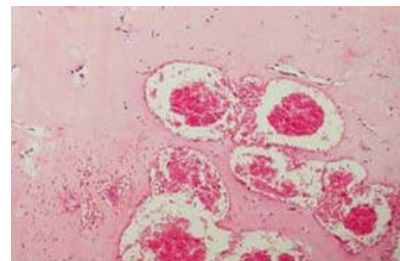
1



2



3



4

Viene quindi calcolato uno score medio per ciascun campione (punteggi delle 5 hot spots I operatore + punteggi delle 5 hot spots II operatore / 10) che viene utilizzato per l'analisi successiva. I codici dei vetrini vengono, a questo punto, decriptati ed i dati inseriti in un foglio di calcolo elettronico per l'analisi statistica mediante opportuno software.

In esperimenti preliminari è stato controllato lo score ottenuto su sezioni colorate con ematossilina-eosina con sezioni parallele dopo colorazione istologica con soluzione tricromica di Masson e con colorazione istochimica con anticorpo anti CD-31. Non sono state evidenziate significative differenze nella quantificazione dell'angiogenesi tra questi tipi di colorazioni. Pertanto si è proceduto con la colorazione in ematossilina-eosina che è risultata più ripetibile, uniforme e di più semplice esecuzione rispetto alle altre metodiche

Tecnica di dosaggio dell'emoglobina.

Al momento dell'espianto ciascuna massa viene diluita 1:2 in acqua deionizzata ed è lasciata a 4°C overnight. Il giorno successivo, i campioni sono agitati su vortex, dopodichè la dissoluzione completa è facilitata mediante pipettate ripetute. Eventuali residui vengono eliminati mediante centrifugazione.

Per la determinazione quantitativa della concentrazione dell'emoglobina nelle masse si utilizza il Drabkin's Reagent (1 g/l di NaHCO₃, 200 mg/l di potassio ferricianato e 50 mg/l di potassio cianato). Viene preparata una curva standard, con emoglobina bovina in soluzione di Drabkin alle seguenti concentrazioni: 0 – 60 – 120 – 180 mg/ml.

Quindi si aggiunge la soluzione di Drabkin, con diluizione 1:2, a ciascun campione. Quindi i campioni sono ulteriormente centrifugati, il surnatante è diluito 1:12 in soluzione di Drabkin. Dopo 15 minuti a temperatura ambiente viene misurata l'assorbanza con lo spettrofotometro, alla lunghezza d'onda di 540 nm. La concentrazione dell'emoglobina viene calcolata mediante interpolazione con la curva standard mediante regressione lineare.

Analisi statistica.

La presenza di differenze dotate di significatività statistica tra le variabili dei diversi gruppi viene valutata mediante test-T di Student per campioni indipendenti e analisi della varianza ANOVA con test post hoc di Tuckey (differenze statisticamente significative per valori di $p < 0,05$)

RISULTATI

Messa a punto del modello murino con “matrigel plug” per lo studio dell’angiogenesi e valutazione dell’effetto di Gas6 rispetto all’angiogenesi indotta da VEGF.

Sono stati condotti esperimenti preliminari seriatati per mettere a punto le condizioni sperimentali ottimali del modello di “matrigel plug”. I principali parametri di messa a punto del metodo sono stati i seguenti: titolazione della concentrazione di VEGF nei plug (50-75-100-150 ng/ml), permanenza del plug (7 giorni vs 10 e 15 gg), sede dell’inoculo (interscapolare vs inguinale). Le condizioni ottimali sono risultate le seguente: concentrazione VEGF 100 ng/ml, permanenza del plug di 7 gg, inoculo in sede interscapolare.

Gas6 è risultato ridurre significativamente l’angiogenesi VEGF dipendente nel modello di angiogenesi in vivo con matrigel plug. Tale risultato è stato confermato sia valutando i risultati dello score istologico sia quelli del dosaggio dell’emoglobina.

TECNICA ISTOLOGICA.

Sono stati condotti esperimenti seriatati (3 repliche di esperimenti, ogni caso eseguito in quadruplicato) per valutare l’efficacia dell’inibizione dell’angiogenesi VEGF da parte della proteina Gas6 mediante valutazione istologica.

Analizzando le medie degli scores istologici, si è evidenziata una modesta risposta angiogenetica nei controlli negativi ($1,4 \pm 0,8$) sostanzialmente invariata in presenza di Gas6 ($1,5 \pm 0,9$). In presenza di VEGF, alla concentrazione di 100 ng/ml, si è osservato come atteso un’incremento dello score medio di angiogenesi ($3,0 \pm 0,9$). Gas6 è risultato efficace nell’inibire l’angiogenesi VEGF mediata, con netta riduzione dello score ($2,1 \pm 1,0$). (Figura 1). Tale riduzione è statisticamente significativa (Test post-hoc di Tukey, VEGF vs tutti i gruppi $p < 0,05$, gli altri confronti n.s.).

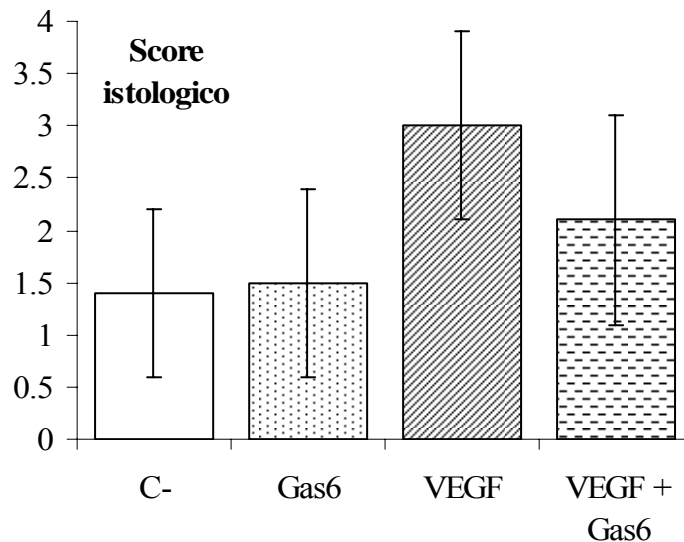


Fig.1 Effetto di Gas6 su angiogenesi VEGF dipendente. Indagine istologica.

TECNICA DI DOSAGGIO DELL'EMOGLOBINA

In 2 repliche di esperimenti con ogni caso eseguito in triplicato sono stati confermati i risultati ottenuti tramite indagine istologica, infatti Gas6 alla concentrazione di 500 ng/ml è risultato efficace nel ridurre l'angiogenesi VEGF indotta. La concentrazione media di Hb è risultata essere di $2,4 \pm 2,3$ mg/ml per il controllo negativo solo matrigel e $2,2 \pm 1,9$ per il controllo negativo matrigel + Gas6. In presenza di VEGF la concentrazione di Hb è risultata di $14,0 \pm 8,7$ mentre in presenza di VEGF + Gas6 di $6,0 \pm 2,9$ (Figura 2). Pertanto Gas6 ha determinato una riduzione del $57 \pm 20\%$ la concentrazione di emoglobina nei plug di matrigel. Tale riduzione è risultata al limite della significatività statistica (Test post hoc di Tukey, $p < 0,05$ VEGF vs tutti i gruppi, $p = 0,06$ nel confronto VEGF vs VEGF + Gas6). Gli altri confronti non sono risultati statisticamente significativi.

Tali risultati confermerebbero l'effetto inibitorio dell'angiogenesi VEGF dipendente da parte di Gas6. Naturalmente ulteriori repliche sperimentali saranno necessarie per confermare ulteriormente tale risultato.

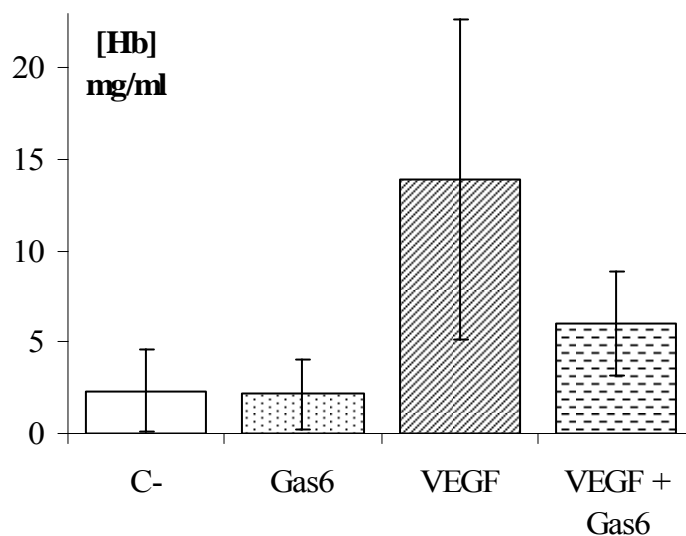


Fig.2 Effetto di Gas6 su angiogenesi VEGF dipendente. Dosaggio Hb.

Valutazione dell'effetto di Gas6 riguardo alla neoangiogenesi tumorale VEGF dipendente.

E' stato avviato la valutazione preliminare dell'effetto di Gas6 sull'angiogenesi tumorale indotta da neoplasie che spontaneamente producono elevati livelli di VEGF.

Sono stati eseguiti esperimenti preliminari per valutare l'induzione dell'angiogenesi utilizzando il surnatante della linea cellulare tumorale murina B16F0 (melanoma) singenica con in topi C57BL/6NCrIBR nel modello di matrigel plug, descritta in letteratura (Ishikawa M et al., 2007) overprodurre VEGF. 3 milioni di cellule B16F0 sono state piastrate in fiasche T75 e fatte amplificare in presenza di DMEM con FBS 10%. Giunte a confluenza dopo 3 gg le cellule sono state lavate con PBS e starvate con DMEM senza FBS. Dopo 3 giorni il surnatante è stato raccolto. Quindi è stato eseguito il dosaggio del VEGF murino mediante kit ELISA commerciale ottenendo una concentrazione di ≈ 100 ng/ml. Valutazioni preliminari istologiche e con dosaggio dell'Hb su plug di matrigel hanno evidenziato un'intensa vascolarizzazione, superiore a quella indotta utilizzando esclusivamente VEGF, pertanto il surnatante è stato testato nel plug di matrigel utilizzando una diluizione 1:5 in matrigel (concentrazione di VEGF circa di 20 ng/ml).

Dati non definitivi hanno evidenziato l'efficacia della proteina Gas6 nell'inibire l'angiogenesi neoplastica indotta mediante il surnatante delle cellule B16F0. Infatti in un esperimento con casi in quintuplicato Gas6 è risultato ridurre l'angiogenesi del 69%. Infatti il surnatante delle B16F0 ha prodotto una concentrazione di Hb di $13,1 \pm 9,9$ mentre lo stesso surnatante ha determinato una concentrazione di Hb di $3,8 \pm 3,1$ in presenza di mGas6 alla concentrazione di 500 ng/ml ($p=0,06$).

Tali dati, al limite della significatività statistica, sono stati ottenuti soltanto in un singolo esperimento e andranno quindi replicati e sono pertanto da intendersi ancora preliminari. Comunque sono indicativi per un effetto biologico della proteina Gas6 come potenziale inibitore della neoangiogenesi tumorale VEGF dipendente da confermarsi con ulteriori repliche sperimentali.

DISCUSSIONE

Lo stretto legame tra la progressione della malattia neoplastica ed il processo angiogenetico è stato ipotizzato da Folkman più di trenta anni fa. Questo ha portato a considerare la terapia antiangiogenica come elemento importante nel trattamento di molte neoplasie. La terapia antiangiogenetica colpisce in maniera selettiva le cellule endoteliali in proliferazione tumultuosa come nel caso dell'angiogenesi patologica senza interferire con i normali e fisiologici processi angiogenetici (Zhi H e Shi-Deng B, 2004).

L'inibizione dell'angiogenesi tumorale mediante l'inibizione dell'attività di VEGF rappresenta un approccio terapeutico razionale. VEGF, infatti, è il fattore chiave nell'induzione dell'angiogenesi ed è iperespresso in un gran numero di tumori umani (Liekens S et al, 2001).

Il rilascio di VEGF da parte delle cellule tumorali scatena l'attivazione del processo angiogenetico, che connette il tumore alla rete vascolare dell'ospite, consentendo alle cellule tumorali di ricevere l'apporto ematico e nutritivo necessario per la proliferazione e facilitandone la diffusione metastatica (Malonne H, Langer I, 1999). L'iperpressione di VEGF, inoltre, conferisce al tumore resistenza al trattamento citotossico, sia chemio che radioterapico: la struttura vascolare indotta dal VEGF è caratterizzata da un'elevata permeabilità, che determina aumento della pressione interstiziale e intratumorale, ostacolando così un'adeguata diffusione degli agenti chemioterapici e creando aree di relativa ipossia non responsive al trattamento radiante (Folkman J, 1995).

Un recente lavoro ha dimostrato che la proteina Gas6 ha una funzione inibitoria sul processo angiogenetico indotto dal VEGF in vitro e nel saggio "in vivo" della membrana coriantolloidea di pollo (Gallicchio M et al, 2005). Questo effetto si esplicherebbe tramite la defosforilazione del recettore VEGFR2.

Sulla base di tali risultati, abbiamo messo a punto ed iniziato ad impiegare un modello animale murino per confermare l'effetto della proteina Gas6 come inibitore dell'angiogenesi indotta da VEGF e per valutare un potenziale effetto inibitorio sull'angiogenesi tumorale VEGF dipendente.

Sulla base dei risultati ottenuti nel modello "matrigel plug" sia con valutazione morfologica quantificata con un apposito score istologico sia mediante il dosaggio dell'Hb nei plug di matrigel abbiamo confermato che Gas6 effettivamente inibisce l'angiogenesi tumorale VEGF dipendente "in vivo". Tale risultato quindi conferma i dati "in vitro" e quelli ottenuti nel saggio "in vivo" sulla membrana corion-allantoidea di pollo. In considerazione del fatto che i

dati ottenuti con il dosaggio dell'emoglobina nel plug di matrigel presentano elevate deviazioni standard per i campioni considerati e sono al limite della significatività statistica saranno necessarie ulteriori repliche sperimentali per conferma di tali risultati.

In ogni caso, seppur da considerarsi non definitivi, i risultati ottenuti che evidenziano un'effetto inibitorio sull'angiogenesi VEGF dipendente della proteina Gas6 non sono la semplice conferma di quanto già dimostrato in precedenza (Gallicchio et al., 2005) in quanto il modello plug di matrigel rappresenta una simulazione prossima al reale degli eventi patologici neoangiogenetici. Infatti in tale modello viene indotta l'invasione di una rete vascolare di un tessuto fibro-connettivale preesistente. Tale fatto permette di simulare le interazioni tra endotelio, matrice extracellulare e tessuto di supporto che avvengono nell'effettivo processo di neovascolarizzazione di un tessuto tumorale in crescita che non possono essere valutate nel saggio della membrana corion-allantoidea di pollo. In quest'ultimo infatti il ruolo proangiogenetico di VEGF è facilitato dalla più semplice diffusibilità delle sostanze, dall'assenza di resistenze fisiche alla migrazione delle cellule endoteliali e dalla minima presenza di matrice extracellulare. Tale saggio, pertanto, se è utile a confermare l'effetto antiangiogenetico VEGF dipendente di una sostanza non è invece adeguato a simulare le complesse interazioni tissutali che avvengono nella neovascolarizzazione di un tessuto solido.

Pertanto riteniamo che questi risultati, pur con i limiti della necessità di ulteriori repliche sperimentali, siano l'effettiva conferma che Gas6 è un importante attore nel controllo del processo angiogenetico VEGF dipendente.

Infine abbiamo preliminarmente riscontrato che Gas6 è in grado di inibire del 69% la neoangiogenesi indotta dal surnatante di una linea tumorale murina di melanoma. Tale linea (B16F0) è comunemente utilizzata in letteratura come modello di indagine dell'angiogenesi tumorale in vivo ed è dimostrata secernere elevate concentrazioni di VEGF. Abbiamo dimostrato in esperimenti preliminari la possibilità di indurre angiogenesi utilizzando il surnatante di colture cellulari di tale linea se inoculato nel matrigel plug. Abbiamo riscontrato una maggiore risposta angiogenetica rispetto del surnatante di tale linea rispetto a quello ottenuto mediante l'utilizzo di VEGF alla medesima concentrazione. Naturalmente tale risultato può dipendere dalla contemporanea presenza di altre molecole favorevoli la neoangiogenesi nel surnatante di tale linea. In ogni caso il riscontro, seppur preliminare, che Gas6 riduce significativamente l'angiogenesi indotta dal surnatante di tale linea tumorale, pare rilevante in quanto questa sarebbe la prima dimostrazione indiretta dell'efficacia di Gas6 nell'inibizione anche della neoangiogenesi tumorale che avviene mediante secrezione non

solo di VEGF, ma anche di numerosi altri fattori angiogenetici. Non si può quindi escludere che Gas6 possa interferire anche con altri fattori proangiogenetici.

Naturalmente tali dati essendo preliminari andranno necessariamente confermati in ulteriori repliche sperimentali.

Sviluppi del progetto:

- Conferma dell'inibizione da parte di Gas6 dell'angiogenesi indotta dal surnatante delle cellule B16F0 nel plug di matrigel.
- Valutazione dell'inibizione da parte di Gas6 dell'angiogenesi indotta inoculando le cellule B16F0 nel plug di matrigel.
- Clonaggio di un vettore di espressione di Gas6 murino e trasfezione della linea cellulare B16F0.
- Valutazione dell'angiogenesi indotta inoculando cellule B16F0 wild type e trasfettate con Gas6 nel plug di matrigel.
- Studio della possibilità di somministrazione intraperitoneale di Gas6 nel topo e valutazione delle misure di farmacocinetica per ottenere concentrazione plasmatiche di Gas6 di 200-500 ng/ml e valutazione di eventuali complicanze di tale trattamento.
- Valutazione dell'inibizione dell'angiogenesi nel plug di matrigel (VEGF, surnatante B16F0, cellule B16F0 wt) somministrando Gas6 intraperitoneale.
- Valutazione dell'effetto di Gas6 somministrato intraperitoneale sull'angiogenesi e sulla crescita tumorale indotta inoculando le cellule B16F0 nel tessuto sottocutaneo.
- Valutazione dell'effetto di Gas6 umano utilizzando modelli in vitro di angiogenesi indotta da surnatanti di linee neoplastiche umane produttrici di VEGF.
- Eventuale conferma dei risultati con modelli di angiogenesi più evoluti (angiomouse) e impiegando topi knock out per Gas6.

BIBLIOGRAFIA

Avanzi GC, Gallicchio M, Bottarel F, Gammaitoni L, Cavalloni G, Buonfiglio D, Bragardo M, Bellomo G, Albano E, Fantozzi R, Garbarino G, Varnum B, Aglietta M, Saglio G, Dianzani U, Dianzani C. GAS6 inhibits granulocyte adhesion to endothelial cells. *Blood* 1998; 91:2334-40

Avanzi GC, Gallicchio M, Cavalloni G, Gammaitoni L, Leone F, Rosina A, Boldorini R, Monga G, Pegoraro L, Varnum B, Aglietta M. Gas6, the ligand of Axl and Rse receptors, is expressed in hematopoietic tissue but lacks mitogenic activity. *Exp Hematol* 1997; 25:1219-26

Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6:389-95.

Chen J, Carey K, Godowsky PJ. Identification of Gas6 as a ligand for Mer, a neural cell adhesion molecule related receptor tyrosine kinase implicated in cellular transformation. *Oncogene* 1997; 14:2033-9

Collett G, Wood A, Alexander MY, Varnum BC, Boot-Handford RP, Ohanian V, Ohanian J, Fridell YW, Canfield AE. Receptor tyrosine kinase Axl modulates the osteogenic differentiation of pericytes. *Circ Res* 2003; 92:1123-9

Darland DC, D'Amore PA. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest.* 1999 Jan;103(2):157-8.

Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-76

Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 1995; 333:1757-63

Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, Breitman ML. Role of the flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* 1995; 376:66-70

Gallicchio M, Mitola S, Valdembri D, Fantozzi D, Varnum B, Avanzi GC, Bussolino F. Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 - mediated endothelial cell activation by Axl Tyrosine Kinase Receptor1. *Blood* 2005; 105:1970-6

Godowsky PJ, Mark MR, Chen J, Sadick MD, Raab H, Hammonds RG. Reevaluation of the roles of protein S and Gas6 as ligands for the receptor tyrosine kinase Rse/Tyro3. *Cell* 1995; 82:355-8

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996; 86:353-64.

Ishikawa M, Kawase I, Ishii F. Combination of amino acids reduces pigmentation in B16F0 melanoma cells. *Biol Pharm Bull*. 2007; 30:677-81.

Joseph DR. Sequence and functional relationships between androgen-binding protein/sex hormone binding globulin and its homologs protein S, Gas6, laminin, and agrin. *Steroids* 1997; 62:578-88

Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2001; 61:253-70

Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, Lai C, Skinner MK, Klein R, Matsushima GK, Earp HS, Goff SP, Lemke G. Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* 1999; 398:723-8.

Malonne H, Langer I. Mechanisms of tumor angiogenesis and therapeutic implications: angiogenesis inhibitors. *Clinical Experimental Metastasis* 1999; 17:1-14

Manfioletti G, Brancolini C, Avanzi G, Schneider C. The protein encoded by a growth arrest-specific gene (Gas6) is a new member of the vitamin K-dependent proteins related to protein S, a negative coregulator in the blood coagulation cascade. *Mol Cell Biol* 1993; 13:4976-85

Manzow S, Brancolini C, Marks F, Richter KH. Expression of growth arrest-specific (Gas) genes in murine keratinocytes: Gas2 is specifically regulated. *Exp Cell Res* 1996; 224:200-3

Masabumi S. Vascular endothelial growth factor receptor-2: Its unique signaling and specific ligand, VEGF-E. *Cancer Sci* 2003; 94:751-6

Melaragno MG, Wuthrich DA, Poppa V, Gill D, Lindner V, Berk BC, Corson MA. Increased expression of Axl tyrosine kinase after vascular injury and regulation by G protein-coupled receptor agonists in rats. *Circ Res* 1998; 83:697-704

Nakano T, Higashino K, Kikuchi N, Kishino J, Nomura K, Fujita H, Ohara O, Arita H. Vascular smooth muscle cell-derived, Gla-containing growth-potentiating factor for Ca(2+)-mobilizing growth factors. *J Biol Chem* 1995; 270:5702-5

Neubauer A, Fiebeler A, Graham DK, O'Bryan JP, Schmidt CA, Barckow P, Serke S, Siegert W, Snodgrass HR, Huhn D. Expression of Axl, a transforming receptor tyrosine kinase, in normal and malignant hematopoiesis. *Blood* 1994; 84:1931-41

O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R 3rd, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET. Axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukaemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Mol Cell Biol* 1991; 11:5016-31

O'Donnell K, Harkes IC, Dougherty L, Wicks IP. Expression of receptor tyrosine kinase Axl and its ligand Gas6 in rheumatoid arthritis: evidence for a novel endothelial cell survival pathway. *Am J Pathol* 1999; 154:1171-80

Prieto AL, Weber JL, Tracy S, Heeb MJ, Lai C. Gas6, a ligand for the receptor protein-tyrosine kinase Tyro-3, is widely expressed in the central nervous system. *Brain Res* 1999; 816:646-61

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-4

Schneider C, King RM, Philipson L. Genes specifically expressed at growth arrest of mammalian cells. *Cell* 1988; 54:787-93

Staton CA, Stribbling SM, Tazzyman S, Hughes R, Brown NJ, Lewis CE. Current methods for assaying angiogenesis in vitro and in vivo. *Int J Exp Path* 2004; 85:233-48

Stitt TN, Conn G, Gore M, Lai C, Bruno J, Radziejewski C, Mattsson K, Fisher J, Gies DR, Jones PF. The anticoagulation factor protein S and its relative, Gas6, are ligands for the Tyro 3/Axl family of receptor tyrosine kinases. *Cell* 1995; 80:661-70

Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev* 2003; 24:600-32

Varnum BC, Young C, Elliott G, Garcia A, Bartley TD, Fridell YW, Hunt RW, Trail G, Clogston C, Toso RJ. Axl receptor tyrosine kinase stimulated by the vitamin K-dependent protein encoded by growth-arrest-specific gene 6. *Nature* 1995; 373:623-6

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 1991 Jan 3;324(1):1-8.

Zhi H, Shi-Deng B. Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10:463-70

SEZIONE 2:

ATTIVITA'FORMATIVA

CORSI FREQUENTATI

- Corso di inglese, Prof. Irving-Bell
- Corso di statistica, Prof. Magnani

SEMINARI

- “Stem cells in cardiac pathophysiology and treatment”, Dott. Paolo Di Nardo
- “Creazione di *antigen protein microarray* a fini di ricerca e diagnostica”, Dott. Paola Secco
- “Patogenesi molecolare dei linfomi associati ad immunodeficienza”, Dott. Daniela Capello
- “Modulazione funzionale del canale cardiaco Kv4.3 da parte di subunità accessorie”, Dott. Diego Cotella
- “Studio di fattori genetici coinvolti nella suscettibilità alla Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA)”, Dott. Lucia Corrado
- “Gene silencing by RNA interference (RNAi)”, Prof . Paola Defilippi
- “Detection of miRNA target genes through statistical analysis of DNA motifs in human-mouse 3'-UTR regions”, Prof. Michele Caselle
- “The long hand of the small RNAs reaches into several levels of gene regulation”, Prof . Carlo Cogoni
- “Human Cytomegalovirus (HCMV) from clinic to the bench and return”, Prof . Thomas Mertens
- “La valutazione del controllo nervoso della circolazione in clinica: dalla teoria alle applicazioni pratiche”, Prof . Massimo Pagani
- “Fragile X syndrome from RNA metabolism impairment to spine dysmorphogenesis”, Prof . Claudia Bagni
- “Relazioni tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del protein data base”, Dott. Marco Milanesio

- “Difetti genetici del pre-B cell receptor ”, Dott. Simona Ferrari
- “The regulation of hematopoietic stem cells by SMAD signaling”, Prof. Stefan Karlsson
- “Translating basic science into therapeutic strategies for shwachman diamond syndrome”, Prof. Steven R. Ellis
- “Sindromi autoinfiammatorie”, Dott. Alberto Martini
- “Bioinformatic tools for the analysis of UTRs and for the prediction of alternative spliced transcripts”, Dott. Flavio Mignone

CONGRESSI FREQUENTATI (elenco completo: denominazione congresso, sede, data)

- Annual European Congress of Rheumatology (EULAR), Barcelona, June 13-16, 2007
- 11th Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS), Brussels, August 25-28, 2007.
- 17th European Respiratory Society (ERS) Annual Congress, Stockholm, September 15-19, 2007.
- Corso inquadramento diagnostico e impostazione terapeutica delle artropatie psoriasiche, Milano, 17 Novembre 2006
- Aspetti ematologici della Malattia di Gaucher, Verona, 29 giugno 2007.

COMUNICAZIONI A CONGRESSI (elenco completo: autori, titolo, denominazione congresso, sede, data)

A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

Sainaghi PP, Collimedaglia L, Alciato F, Leone MA, Puta E, Naldi P, Castello L, Monaco F, Avanzi GC. Elevation of Gas6 protein concentration in cerebrospinal fluid of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). *Eur J Neurol* 2007; 14 Suppl I: 126 (Abstract to the 11th Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS), Brussels, August 25-28, 2007.)

Sainaghi PP, Alciato F, Carnieletto S, Massarotti M, Sola D, Castello L, Inglese E, Bellomo G, Avanzi GC. Measurement of Gas6 protein in patient with acute dispnea. *Eur Respir J* 2007; 30 Suppl 51: 51 (Abstract to the 17th European Respiratory Society (ERS) Annual Congress, Stockholm, September 15-19, 2007).

B) Altre comunicazioni

Sainaghi P.P, Alciato F., Sola D., Castello L., Bergamasco L., Avanzi G.C. Gas6 modulates cytokines secretion in U-937 (human monocyte-like cell line) with an anti-inflammatory effect. *Ann Rheum Dis.* 2007 July. 66 Suppl II :150 (Abstract to the Annual European Congress of Rheumatology (EULAR), Barcelona, June 13-16, 2007)

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO (elenco completo)

Alciato F, **Sainaghi PP**, Castello L, Bergamasco L, Carnieletto S, Avanzi GC. Development and validation of an ELISA method for detection of growth arrest specific 6 (Gas6) protein in human plasma. *J Immunoassay Immunochem.* 2007. In press

Bartoli E, Bergamasco L, **Sainaghi PP**, Guidetti F, Castello L. An improved method to compute the solute and water derangements of hyperglycaemia. *Eur J Appl Physiol.* 2007. In press.

Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Carnevale Schianca GP, Bartoli E. Metabolic characteristics of glucose intolerance: the critical role of obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007. In press.

Bartoli E, Castello L, Bergamasco L, **Sainaghi PP**. A new method to distinguish the hyponatremia of electrolyte loss from that due to pure solvent changes. *Eur J Appl Physiol.* 2007 Sep;101(1):133-42.

Sainaghi PP, Castello L, Limoncini AM, Bergamasco L, Bartoli E, Schianca GP. Poor specificity of fasting plasma glucose cut-off values in ruling out glucose intolerance: the complementary usefulness of OGTT. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2007 Feb;115(2):112-7.

Pubblicazioni inviate per pubblicazione (attualmente in revisione).

Sainaghi PP, Collimedaglia L, Alciato F, Leone MA, Puta E, Naldi P, Castello L, Monaco F, Avanzi GC. Elevation of Gas6 protein concentration in cerebrospinal fluid of patients with chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP). (*J Neurol*, submitted for publication)

Pubblicazioni precedenti alla data d'iscrizione al Dottorato in Medicina Molecolare.

Avanzi GC, Castello L, **Sainaghi PP**, Bergamasco L, Boldorini R, Bartoli E. A malignant fibroleiomyoma of the testis. *Clin Lymphoma Myeloma*. 2006 Mar;6(5):414-6.

Castello L, **Sainaghi PP**, Bergamasco L, Letizia C, Bartoli E. Pathways of glomerular toxicity of cyclosporine-A: an "in vitro" study. *J Physiol Pharmacol*. 2005 Dec;56(4):649-60.

Bartoli E, Castello L, **Sainaghi PP**, Schianca GP. Progression from hidden to overt type 2 diabetes mellitus: significance of screening and importance of the laboratory. *Clin Lab*. 2005;51(11-12):613-24.

Carnevale Schianca GP, **Sainaghi PP**, Castello L, Rapetti R, Limoncini AM, Bartoli E. Comparison between HOMA-IR and ISI-gly in detecting subjects with the metabolic syndrome. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006 Mar-Apr;22(2):111-7.

Castello L, Pirisi M, **Sainaghi PP**, Bartoli E. Quantitative treatment of the hyponatremia of cirrhosis. *Dig Liver Dis*. 2005 Mar;37(3):176-80.

Castello L, Pirisi M, **Sainaghi PP**, Bartoli E. Hyponatremia in liver cirrhosis: pathophysiological principles of management. *Dig Liver Dis*. 2005 Feb;37(2):73-81.

Sainaghi PP, Castello L, Bergamasco L, Galletti M, Bellosta P, Avanzi GC. Gas6 induces proliferation in prostate carcinoma cell lines expressing the Axl receptor. *J Cell Physiol*. 2005 Jul;204(1):36-44

Bartoli E, Castello L, **Sainaghi PP**. [Diagnosis and therapy of hyponatremia]. *Ann Ital Med Int*. 2003 Oct-Dec;18(4):193-203.

Guidetti F, Grazioli S, Capelli F, Marini C, Gallicchio M, De Micheli D, Castello L, **Sainaghi PP**, Fra GP, Saglio G, Avanzi GC. Primitive hematopoietic stem cells shows a polyclonal pattern in myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. 2004 Jan;89(1):21-8.

Carnevale Schianca GP, Rossi A, **Sainaghi PP**, Maduli E, Bartoli E. The significance of impaired fasting glucose versus impaired glucose tolerance: importance of insulin secretion and resistance. *Diabetes Care*. 2003 May;26(5):1333-7.