

**Università degli Studi del Piemonte
Orientale "Amedeo Avogadro"**



Dottorato di Ricerca

in

Medicina Molecolare

Ciclo XX

Relazione 4° 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 invasivo spesso mortale. MM origina dalle cellule mesoteliali che ricoprono la pleura, il peritoneo e il pericardio¹. È stato stimato che l'incidenza del MM aumenterà nei prossimi anni in Europa, mentre in USA negli ultimi dieci anni la frequenza è già aumentata del 90%². La natura aggressiva del MM e la sua resistenza alle terapie convenzionali, sono responsabili della scarsa prognosi di questi pazienti (12-18 mesi dalla diagnosi). L'associazione di chirurgia, chemio-terapia e radio-terapia ha mostrato alcuni benefici negli stadi precoci della malattia, ma la prognosi rimane nella maggior parte dei casi sfavorevole³.

È stato osservato che fibre e minerali fibrosi, come l'asbesto e l'erionite, sono strettamente correlati con l'insorgenza del MM. L'asbesto è una risorsa naturale ubiquitaria composta di microscopici agglomerati di fibre. Le fibre di asbesto inducono aberrazioni cromosomiche nelle cellule mesoteliali tramite un'azione meccanica e mediante la produzione di radicali dell'ossigeno⁴. 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 due principali categorie di fibre di asbesto: "anfibole" e "serpentine"⁵. Tra le anfibole, sono universalmente riconosciute come le più pericolose, la crocidolite e l'amosite⁶. Riguardo alle serpentine, il crisotilo è l'unico asbesto conosciuto e ci sono due opposti punti di vista sul suo potere carcinogenico. 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. Quasi il 90% dell'esposizione mondiale all'asbesto è procurata dal crisotilo che è l'unico tipo di asbesto estratto nel mondo occidentale⁷. Inoltre, il crisotilo è spesso contaminato dalla tremolite, un asbesto anfibolo che causa il MM⁸.

L'alta incidenza di MM nei villaggi di Tuzkoy, Karain e "Old" Sarihidir in Turchia è stata invece associata con l'esposizione ambientale all'erionite⁹. L'erionite è una forma altamente patogena di zeolite, simile in apparenza e proprietà all'asbesto¹⁰. Studi nell'uomo e nei roditori hanno dimostrato che il potenziale trasformante dell'erionite è maggiore che dell'asbesto¹¹. L'erionite presenta bassa citotossicità e la peculiare proprietà di accumulare ferro sulla sua superficie. Gli ioni ferro carichi positivamente generano metaboliti reattivi dell'ossigeno che causano danni al DNA nelle cellule mesoteliali. Di conseguenza, la bassa citotossicità dell'erionite rispetto all'asbesto, permette la proliferazione delle cellule mesoteliali con il conseguente accumulo di mutazioni¹². L'erionite è presente in diverse aree geografiche. È stato dimostrato che l'erionite dell'Oregon (USA) ha proprietà genotossiche ed induce un'alta incidenza di MM nei topi. Da questi dati è ipotizzabile che l'erionite dell'Oregon possa essere pericolosa per l'uomo, ma non sono ancora disponibili dati epidemiologici di conferma¹⁰.

Sebbene l'asbesto sia la maggior causa riconosciuta del MM, l'infezione da SV40 è stata proposta come possibile concausa². Nel corso dei primi tre anni di dottorato abbiamo condotto esperimenti di carcinogenesi *in vitro* trattando le cellule mesoteliali con fibre di asbesto anfibole ed erionite. Sono state utilizzate

cellule mesoteliali primarie transfettate col genoma di SV40 o wild-type. Le cellule mesoteliali SV40 positive sono risultate meno sensibili alla citotossicità indotta da crocidolite¹³. Le cellule che sopravvivono alla crocidolite sono così soggette ad alta instabilità genomica e conseguente trasformazione. In contrasto, l'erionite, a causa della sua bassa citotossicità è in grado di trasformare le cellule mesoteliali senza l'apporto di SV40. La dimostrazione che l'erionite trasforma le cellule mesoteliali con un meccanismo diverso dalla crocidolite ha aggiunto un importante tassello nella comprensione del meccanismo di carcinogenesi del MM. A seguito della pubblicazione del relativo articolo scientifico abbiamo deciso di ripetere gli stessi esperimenti di carcinogenesi *in vivo*. Nel topo è stato dimostrato che la crocidolite induce MM, mentre nessuno studio è stato realizzato in questi animali con l'erionite¹⁴.

Recentemente, Osteopontin (OPN) è stata proposta come marcatore tumorale per la diagnosi precoce del MM. OPN è una glicoproteina associata alla carcinogenesi indotta da asbesto. In uno studio recente, i livelli di OPN sono stati comparati tra pazienti con MM e altri con malattie da esposizione ad asbesto non maligne. Questo studio ha dimostrato che OPN può essere usata per discriminare tra pazienti esposti all'asbesto che hanno sviluppato il MM e pazienti che sono stati esposti all'asbesto senza sviluppare MM¹⁵.

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), Platelet

Derived Growth Factor (PDGF) e Transforming Growth Factor-beta (TGF-B) ¹⁶⁻¹⁹. E' stato dimostrato che la proliferazione delle cellule di MM puo` essere limitata inibendo l'attività dei meccanismi molecolari che proteggono dall'apoptosi²⁰. Un farmaco di attuale interesse è imatinib mesylate (Gleevec, STI571; Novartis Pharma AG, Basel, Svizzera) 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 ²⁰.

Tra I farmaci utilizzati per la terapia del MM, gemcitabina (Gemzar; Eli Lilly and Company, Indianapolis, IN) e alimta (Pemetrexed, MTA, LY231514; Eli Lilly and Company) sono i piu` utilizzati in Europa. La gemcitabina è un nucleoside analogo della citidina, utilizzato come singolo agente o in combinazione con il cisplatino. La gemcitabina inibisce la ribonucleotide reduttasi, bloccando la sintesi di nuovo DNA. L'Alimta invece impedisce la sintesi del DNA bloccando metabolismo dei folati tramite l'inibizione della diidrofolati reduttasi (DHFR) e della glicinamide ribonucleotide formil trasferasi (GARF) ^{21, 22}.

SCOPO DEL LAVORO

Durante il quarto anno di dottorato ho iniziato il periodo di stage nel laboratorio del Prof. M.Carbone ad Honolulu. In questo laboratorio I progetti principali riguardano la patogenesi del MM.

La carcinogeneicità dell'erionite, superiore a qualsiasi altra fibra di asbesto finora studiata, ci ha portato ad approfondirne il meccanismo di trasformazione e alla pubblicazione del relativo articolo scientifico. In Cappadocia (Turchia) diversi

villaggi sono stati costruiti utilizzando l'erionite ottenuta dagli scavi minerari limitrofi. L'incidenza di MM in questi villaggi e' molto variabile. Per esempio nei villaggi di Tuzkoy, Karain e "Old" Sarihidir l'incidenza di MM e' del 50% mentre in altri villaggi vicini e' quasi nulla. Inoltre, in questi tre villaggi gli episodi di MM avvengono in alcune case mentre in altre no. Nel laboratorio del Prof. M.Carbone e' stato in precedenza dimostrato che le caratteristiche mineralogiche delle fibre di erionite in questi tre villaggi sono uguali. Di conseguenza e' stato ipotizzato che la diversa incidenza di MM e' dovuta alla predisposizione genetica e non alle diverse proprietà trasformanti dei tipi di erionite presenti in questi villaggi. Allo scopo di confermare questa ipotesi, abbiamo inoculato in topi BALB/c tre tipi di erionite provenienti da diverse aree geografiche con diversa incidenza di MM: una proveniente dal villaggio di Karain, una proveniente dal vicino villaggio di Karlik (in cui nessun caso di MM e' stato osservato) e una proveniente dall'Oregon. La crocidolite ed il PBS sono stati utilizzati per iniettare i topi di controllo.

Gli esperimenti di carcinogenesi nei topi possono essere utili per validare OPN come marcatore per la diagnosi precoce del MM. I livelli di OPN sono stati così valutati periodicamente nei topi iniettati con la maggior dose di crocidolite e di erionite da Karain. I livelli di OPN sono stati anche misurati nei topi iniettati con PBS.

Durante i quattro anni di dottorato abbiamo sviluppato una nuova combinazione terapeutica per il trattamento del MM. Esperimenti condotti in precedenza nel laboratorio di Biologia Molecolare hanno dimostrato che imatinib utilizzato in

combinazione con la gemcitabina induce la morte delle cellule di MM con azione sinergica. Nel corso del primo anno di dottorato, abbiamo invece dimostrato la sinergia dell'alimta in combinazione con imatinib in una linea cellulare di MM. Lo scopo del secondo anno è stato quello di saggiare l'effetto delle due combinazioni terapeutiche su altre linee cellulari di mesotelioma. Finalmente, il lavoro del terzo anno ha portato alla conclusione e alla conseguente pubblicazione dell'articolo riguardante la sinergia del imatinib 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 imatinib. Sempre nel terzo anno di dottorato è stata inoltre confermata l'efficienza della combinazione imatinib-gemcitabina sul modello murino sviluppato in collaborazione con l'IST di Genova. In quest'ultimo anno di dottorato il lavoro condotto *in vivo* sulla combinazione imatinib-gemcitabina è stato pubblicato. Sulla base degli studi *in vitro* ed *in vivo*, il trial clinico di fase II per lo studio della combinazione imatinib-gemcitabina è ora in fase di reclutamento.

MATERIALI E METODI

DNA-Neosintesi

Le cellule HMC sono state esposte alle diverse fibre in terreno al 2% FBS, contenente 10 μ M 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. In presenza di 2% FBS, 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. 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 imatinib. 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. I dati sono stati 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. 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 F12 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 invece 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 2 mesi, 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 la media delle tre valutazioni \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's F12 addizionato con 2% FBS contenente le fibre indicate ($1.25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Le cellule sono state fissate in 11% glutaraldeide dopo 0, 24, 48 e 72 ore e colorate con il Crystal Violet diluito in 10% acido acetico e l'assorbanza a 595 nm (A595) è stata misurata con un lettore per piastre ELISA.

Ciclo cellulare

Le cellule sono state sincronizzate con 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Colcemid (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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Propidium Iodide (PI-Sigma-Aldrich) in 0.1 M PBS pH 7.2 e 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 o REN-luc (trasdotte con un vettore lenti virale che conteneva il gene della *luciferasi*) in 0.5 mL di terreno Ham's F-12. Per valutare le dimensioni tumorali e la localizzazione delle cellule luminescenti nei topi inoculati con le cellule Ren/luc, dopo anestesia e i.p. iniezione di 0.3 mL a 15 mg/mL di D-luciferin, i segnali bioluminescenti sono stati misurati con IVIS system 100 series (Xenogen Corp., Alameda, CA, USA). Le zone d'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 sacrificati quando lo sviluppo del tumore limitava la mobilità degli animali. La sopravvivenza è stata valutata mediante il metodo di Kaplan-Meier.

Per gli studi di carcinogenesi sono stati utilizzati topi BALB/c. Nove gruppi da 15 topi ciascuno sono stati inoculati i.p. con: PBS; 4 g di crocidolite; 0,4 g di crocidolite; 4 g di erionite dall'Oregon; 0,4 g di erionite dall'Oregon; 4 g di erionite da Karain; 0,4g di erionite da Karain; 4 g di erionite da Karlik; 0,4g di erionite da Karlik. Le dosi sono state suddivise in 10 dosi, una ogni 2 settimane.

Valutazione dei livelli di Osteopontin

Il sangue è stato prelevato nei topi ogni 2 mesi mediante incisione dell'arteria sovra mandibolare. Il sangue è stato lasciato riposare per 30 minuti a temperatura ambiente e conseguentemente centrifugato a 10000 g. Il plasma è stato separato e diluito 100 volte. La determinazione dei livelli di OPN è stata eseguita mediante ELISA utilizzando il kit "Quantikine" (R&D system, Minneapolis, MN, USA) secondo le direttive del produttore.

Procedure di necropsia per gli studi istologici

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 con farmaci o inoculati con le fibre, sono state deparaffinate con xylene e reidratate. Invece, 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 gli anticorpi 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 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

Durante i primi anni di dottorato sono stati condotti studi di carcinogenesi utilizzando diversi tipi di amianto anfibolo ed erionite. Le cellule mesoteliali sono state esposte 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 l'apoptosi, solo per l'amosite è stato riscontrato un numero significativamente più alto di cellule, che presentavano la tipica condensazione della cromatina evidenziata dalla colorazione Hoechst.

I dati di proliferazione e di apoptosi indicano chiaramente che le fibre di erionite e di asbesto hanno un meccanismo trasformante diverso fra loro. Allo scopo di valutare la capacità di indurre stress ossidativo delle diverse fibre, è stata determinata la quantità di 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG) nelle cellule esposte. 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*}

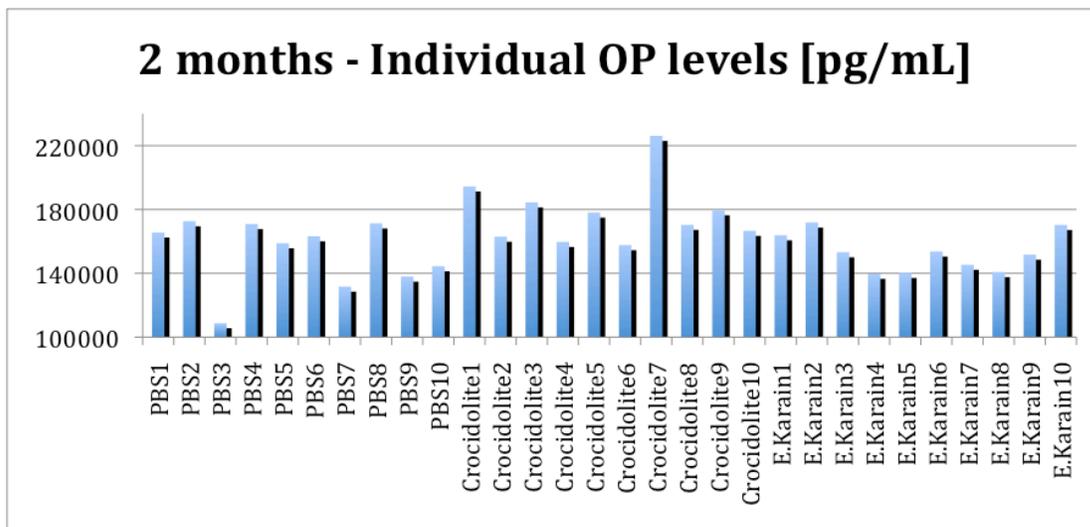
Durante il quarto anno di dottorato ho iniziato il periodo di stage estero nel laboratorio del Prof. Michele Carbone all'Università delle Hawaii (UH). In questo

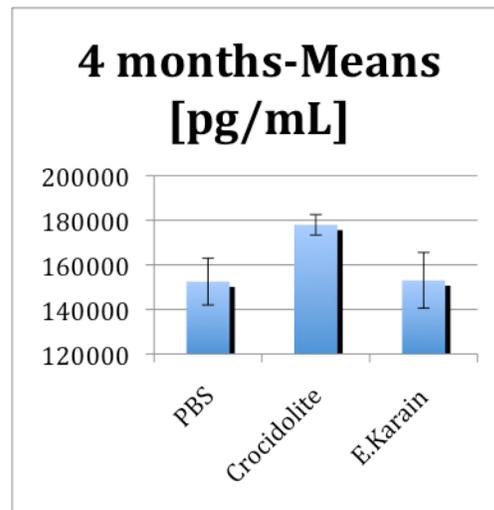
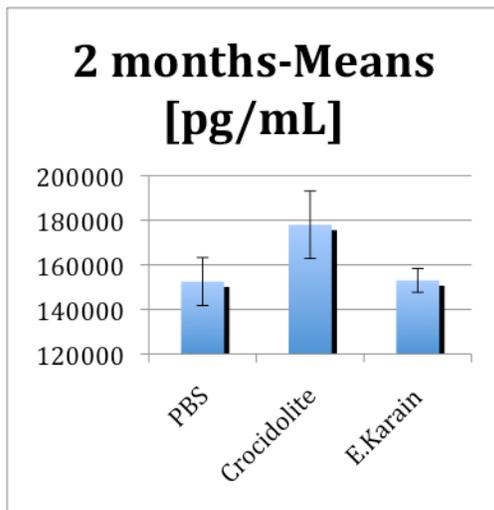
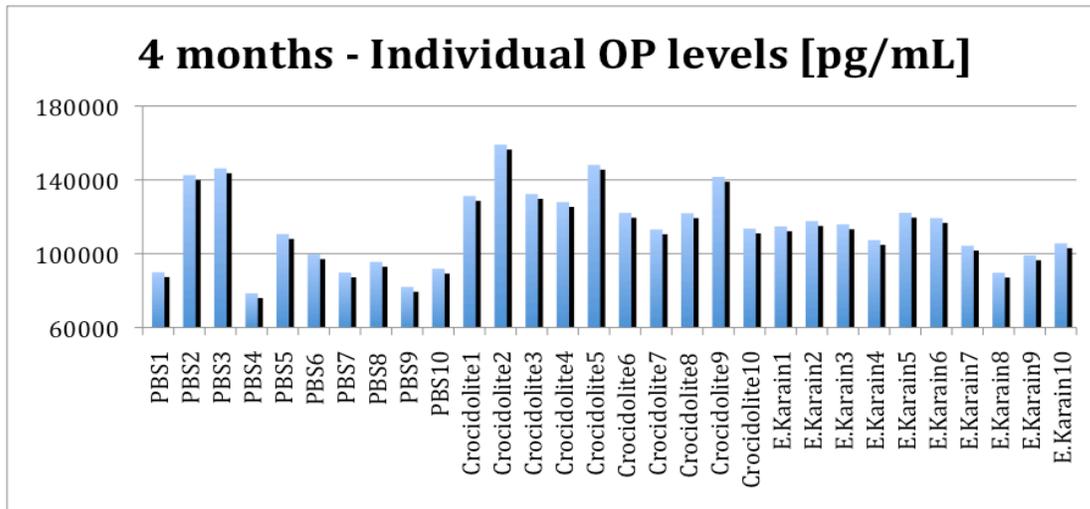
laboratorio l'argomento di studio principale e` la patogenesi del MM. Allo scopo di terminare il mio progetto sulla carcinogenesi da erionite, gli stessi esperimenti effettuati con le cellule mesoteliali sono stati ripetuti in topi BALB/c. Precisamente, sono state inoculate intraperitonealmente tre tipi di erionite provenienti da diverse aree geografiche con diversa incidenza di MM: una proveniente dal villaggio di Karain, una proveniente dal vicino villaggio di Karlik in cui nessun caso di MM e` stato osservato e una proveniente dall'Oregon. La crocidolite ed il PBS sono stati utilizzati per iniettare i topi di controllo. Per ogni tipologia di fibre, sono state iniettate due differenti dosi: 0,4 mg e 4 mg. Le quantita` totali di fibre sono state suddivise in 10 iniezioni, una ogni 2 settimane.

A quasi sei mesi dall'inizio dell'esperimento, i trattamenti sono stati completati e tre topi iniettati con la crocidolite hanno gia` sviluppato MM. Due topi erano stati inoculati con la maggior dose e uno con quella minore. Per due di questi topi e` stato possibile mettere in coltura le cellule di MM. Queste cellule saranno utilizzate per diversi scopi tra cui quello di sviluppare un modello singenico di MM. A causa del lungo tempo di latenza tra l'esposizione alle fibre e l'insorgenza del MM, nessun topo inoculato con i tre tipi di erionite ha gia' sviluppato la malattia. Se la predisposizione genetica e` la causa della diversa incidenza di MM in Cappadocia, le diverse fibre dovrebbero causare MM con la stessa frequenza nei topi.

Questo esperimento di carcinogenesi *in vivo* e` utile per confermare l'utilizzo di osteopontin come marcatore per la diagnosi precoce di MM. L'ipotesi dell'esperimento e` che durante lo sviluppo del MM, i livelli di OPN aumentino nei

topi malati. Dall'inizio dei trattamenti, i livelli di OPN sono stati valutati dopo due e quattro mesi in dieci topi per ogni gruppo, inoculati con la maggior dose di crocidolite e di erionite da Karain. I livelli di OPN sono stati anche misurati nei topi iniettati con PBS. In entrambe le valutazioni, i livelli medi di OPN nei topi esposti alla crocidolite erano statisticamente piu' alti di quelli riscontrati nei topi esposti all'erionite ed al PBS. Nonostante, i livelli di OPN sono risultati molto variabili tra la prima e la seconda valutazione, almeno in uno delle due periodiche determinazioni, i topi che hanno sviluppato MM avevano i livelli in assoluto piu` alti di OPN. Questi topi erano il numero 2 che e` stato sacrificato dopo 127 giorni dall'inoculo ed il numero 7 che e' stato sacrificato dopo 145 giorni. Le seguenti tabelle indicano i livelli di OPN individuali e medi dopo 2 e 4 mesi dall'inizio esperimento.

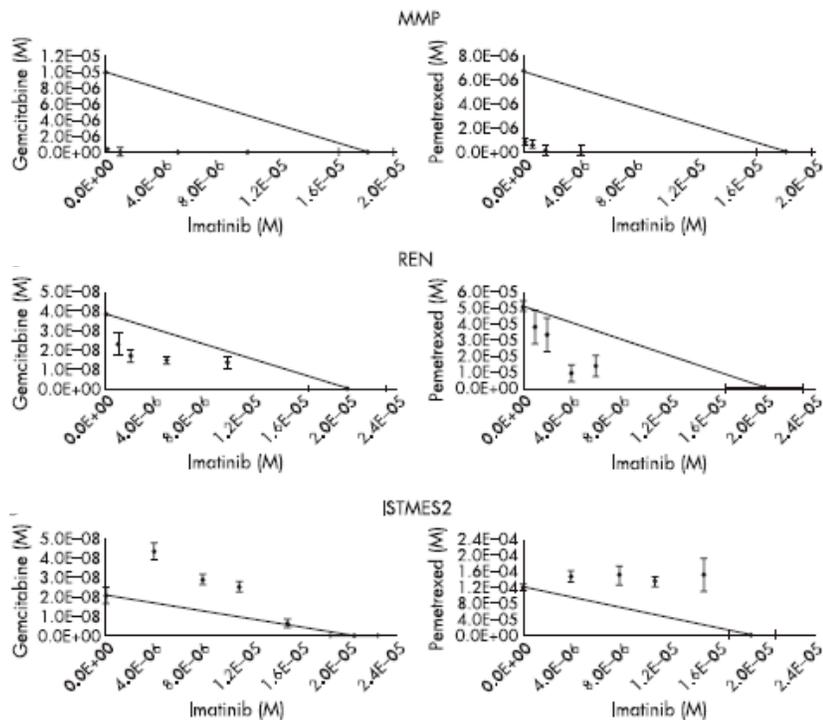




Terapia combinata con imatinib

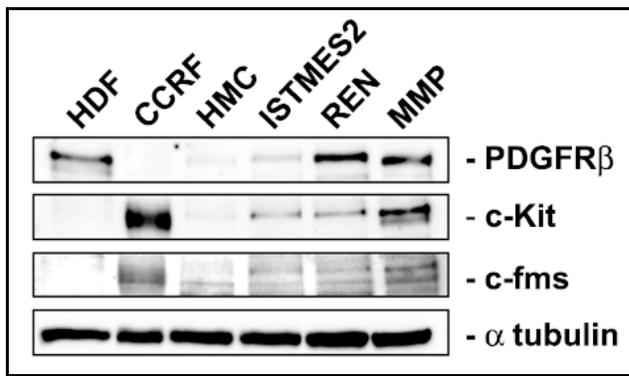
Esperimenti condotti in precedenza hanno dimostrato che STI571 utilizzato in combinazione con la gemcitabina e con l'alimta sulle cellule di mesotelioma maligno induce citotossicità ed apoptosi con un effetto sinergico. Questi dati hanno avvalorato la nostra ipotesi che, l'utilizzo combinato di un chemioterapico 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. Prove di citotossicità sono state eseguite per determinare la curva dose-risposta di un farmaco in presenza di una concentrazione costante dell'altro. Questo metodo permette di valutare in un solo grafico la variazione della LC₅₀ del chemioterapico considerato, al variare della concentrazione del farmaco usato in associazione. Sui due assi del diagramma cartesiano vengono riportati i valori di LC₅₀ dei farmaci usati singolarmente. La retta che unisce questi punti rappresenta l'andamento che dovrebbero avere i valori di LC₅₀ al variare delle concentrazioni dei due farmaci, nel caso ci fosse tra loro un rapporto di addittività. 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.



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 imatinib sono il PDGFR β , c-Kit e c-fms. 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

La sinergia determinata per le cellule MMP è maggiore di quella valutata sulle REN ed è proporzionale al numero di recettori presenti. Sulle cellule della linea ISTMES2, il basso livello espressione dei tre recettori sensibili a imatinib è invece collegato all'antagonismo tra gli effetti dei farmaci. Questi risultati ci portano ad ipotizzare 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 imatinib 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, in collaborazione con il Dr. Michele Cilli dell'IST di Genova, abbiamo inoculato intraperitoneo le cellule di mesotelioma appartenenti alla linea REN precedentemente infettate con un lentivirus contenente il gene della *luciferasi*. Tali cellule, una volta iniettate, possono essere rilevate tramite un misuratore di fluorescenza "*in vivo*" (IVIS system, Xenogen Corp.). Finito lo sviluppo del sistema murino, numerosi esperimenti sono stati effettuati per valutare le associazioni gemcitabina- imatinib e alimta-imatinib già valutate sulle colture cellulari.

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 imatinib 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. La sopravvivenza dei topi non variava in entrambe le casistiche. Allo scopo di investigare l'efficacia dell'alimta *"in vivo"*, sono stati iniettati, con le cellule REN/luc 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 d'inibizione tumorale solo alla fine degli esperimenti, mentre la dose maggiore, sorprendentemente produceva un inaspettato aumento della massa tumorale già dalla prima somministrazione.

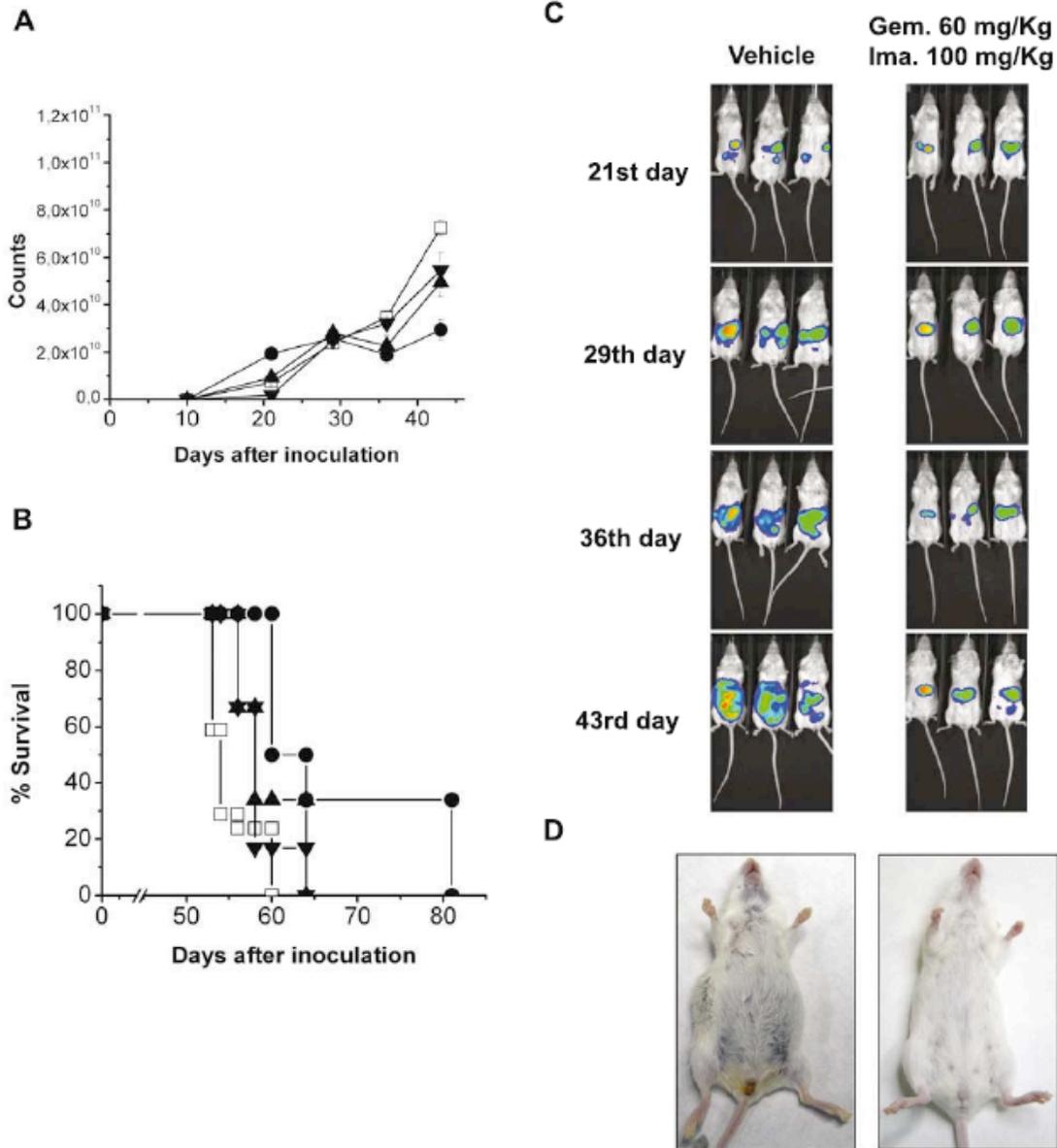
Nonostante la discrepanza dei nostri dati dalla ben stabilita efficacia dell'alimta nel trattamento clinico del mesotelioma, i nostri risultati erano coerenti con quanto precedentemente determinato *"in vitro"*. Infatti, gli esperimenti di citotossicità sulle cellule della linea cellulare REN, dimostravano una resistenza più alta verso l'alimta rispetto alla gemcitabina.

Per quanto riguarda la valutazione dell'efficacia della gemcitabina, abbiamo definito diversi gruppi di trattamento riceventi il veicolo di controllo e la gemcitabina da sola alle concentrazioni di 120 mg/Kg, 60 mg/Kg e 30 mg/Kg. L'inibizione della crescita tumorale è stata osservata per tutti i trattamenti, sebbene la dose di gemcitabina 120 mg/Kg risultasse tossica ed è stata interrotta. 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. Per testare l'effetto della combinazione con imatinib, la dose di 100 mg/Kg di imatinib è stata somministrata insieme alle dosi di 60 mg/Kg e 30mg/Kg di gemcitabina. Rispetto al monotrattamento con il chemioterapico, imatinib a 100 mg/Kg combinato con gemcitabina a 60 mg/Kg causava la diminuzione statisticamente significativa della soppressione della crescita tumorale alla fine del periodo di osservazione. Il trattamento combinato di imatinib 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 imatinib, 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).

In quest'ultimo anno di dottorato il lavoro condotto *in vivo* sulla combinazione imatinib-gemcitabina e' stato pubblicato. Sulla base degli studi *in vitro* ed *in vivo*, il trial clinico di fase II per lo studio della combinazione imatinib-gemcitabina e' ora in fase di reclutamento.

Imatinib Mesylate Enhances Therapeutic Effects of Gemcitabine in Human Malignant Mesothelioma Xenografts

Pietro Bertino,¹ Federica Piccardi,² Camillo Porta,⁴ Roberto Favoni,³ Michele Cilli,²
Luciano Mutti,⁵ and Giovanni Gaudino¹

Clin Cancer Res 2008;14(2) January 15, 2008

DISCUSSIONE

Al quarto anno di dottorato, l'inizio dello stage all'estero ha modificato i progetti scientifici che stavo conducendo. Sin dall'inizio del dottorato le mie principali linee di ricerca riguardavano sia la carcinogenesi sia il trattamento farmacologico del MM. Dopo la pubblicazione dell'articolo riguardante il meccanismo di trasformazione mediato dall'erionite, i miei sforzi si sono spostati interamente sulla terapia del MM. Durante l'ultimo periodo a Novara ho condotto numerosi esperimenti per terminare la valutazione sul modello murino della combinazione terapeutica dell'imatinib con la gemcitabina. La pubblicazione del relativo articolo e l'inizio del trial clinico di fase II, hanno terminato questa linea di ricerca. Ricerca durata quattro anni che ha portato un'ipotesi ad essere confermata dapprima sulle linee cellulari, consecutivamente sul modello murino, ed infine sull'uomo.

Nel laboratorio del Prof. M.Carbone, la principale linea di ricerca riguarda i meccanismi di trasformazione mediati da SV40 e dall'erionite. Di conseguenza, e' nata l'esigenza di continuare il mio precedente progetto di carcinogenesi. Dopo il normale periodo di "assestamento" nel nuovo luogo di vita e di lavoro, ho iniziato coi nuovi esperimenti inoculando diverse tipologie di fibre nei topi. Per ora i risultati sono ancora pochi a causa del lungo periodo di latenza precedente l'insorgenza del MM.

SEMINARI

- *"Immunogene Therapy for Malignant Mesothelioma and other Pleural Malignancies: From Bench to Bedside and Back Again"* January 7, 2008. Daniel H. Stermann.
- *"Your Research Partner: The National Cancer Institute's Cancer Information Service"* January 24, 2008. Cancer Information Service Pacific Region Team.
- *"Notch Signaling in Thoracic Malignancies"* January 11, 2008. Maurizio Bocchetta.
- *"Novel Risk Factors for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma"* February 14, 2008. Jimmy Efirid.
- *"Clinical Significance of ODC Inhibition in the Treatment of Cancer"* May 12, 2008. Victor A Levin.
- *"Chemical and Biological Lessons Learnt from Marine Natural Products"* March 13, 2008. Philip Williams.

- *“An Internet-Based Framework for Expanding the Impact of Psychosocial Treatment of Cancer: Efficacy and Mechanisms of Action”* March 20, 2008. Jason Owen.
- *“Pannexins: a novel growth suppressor in gliomas”* April 16, 2008. Christian Naus.
- *“Natural Inhibitors of Carcinogenesis”* April 10, 2008. John M. Pezutto.
- *“Exploring the Anti-Breast Cancer Effect of Bamboo Extract”* April 24, 2008. Jun Panee.
- *“Differential Patterns of Genomic Alterations in Subtypes of Breast Cancer”* April 22, 2008. Lenora Loo.
- *“Regulation of skin tumorigenesis by RasGRP1”* April 29, 2008. Courtney Luke.
- *“Small Molecule Inhibitors of Tumor Metastasis”* May 1, 2008. Demetrios T. Braddock.
- *“Innate Immune Signaling Pathways and Cancer”* May 15, 2008. Glen N. Barber.
- *“Lipid Micronutrients: the Holy Grail of Nutrition and Longevity? Q.E.D.”* May 22, 2008. Robert Cooney.
- *“Integrin Signaling and Cancer”* Friday, May 23, 2008. Martin A. Schwartz.
- *“Assessing the Validity of the Stages of Change: the Example of Smoking Cessation”* August 7, 2008. Thaddeus Herzog.

- *“Identification of Inhibitors of Ras/Raf-1 and Modulators of B-raf/Raf Kinase Inhibitory Protein (RKIP) Interactions by the Yeast Two-Hybrid System”* August 20, 2008. Leng Chee Chang.
- *“The Behavioral Ecological Model (BEM) A Guide for Health Promotion, Cancer Prevention & Control”* August 20, 2008. Melbourne F. Hovell.

CORSI FREQUENTATI

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

PARTECIPAZIONE A CONGRESSI

Durante i precedenti tre anni passati a Novara, il Prof. Gaudino mi ha dato la possibilità di partecipare a 2 congressi internazionali ed a 2 nazionali. Durante il quarto anno di dottorato il Prof. Michele Carbone non mi ha permesso di partecipare ad alcun congresso perché non possedevo abbastanza dati prodotti nel suo laboratorio.

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. Clin Cancer Res. 2008 Jan 15;14(2):541-8.
- The relationship between simian virus 40 and mesothelioma. Rivera Z, Strianese O, Bertino P, Yang H, Pass H, Carbone M. Curr Opin Pulm Med. 2008 Jul;14(4):316-21. Review.
- Targeting alpha7-nicotinic receptor for the treatment of pleural mesothelioma. Catassi A, Paleari L, Servent D, Sessa F, Dominioni L, Ognio E, Cilli M, Vacca P, Mingari M, Gaudino G, Bertino P, Paolucci M, Calcaterra A, Cesario A, Granone P, Costa R, Ciarlo M, Alama A, Russo P. Eur J Cancer. 2008 Aug 20. [Epub ahead of print]

BIBLIOGRAFIA

1. Weiner SJ, Neragi-Miandoab S. Pathogenesis of malignant pleural mesothelioma and the role of environmental and genetic factors. J Cancer Res Clin Oncol 2008 Sep 12.

2. Yang H, Testa JR, Carbone M. Mesothelioma Epidemiology, Carcinogenesis, and Pathogenesis. *Curr Treat Options Oncol* 2008 Aug 15.
3. Yano T, Morodomi Y, Ito K, et al. [Treatment of malignant pleural mesothelioma--present status and future view]. *Fukuoka Igaku Zasshi* 2008 Apr;99(4):74-9.
4. Christensen BC, Godleski JJ, Marsit CJ, et al. Asbestos exposure predicts cell cycle control gene promoter methylation in pleural mesothelioma. *Carcinogenesis* 2008 Aug;29(8):1555-9.
5. Berman DW, Crump KS. A meta-analysis of asbestos-related cancer risk that addresses fiber size and mineral type. *Crit Rev Toxicol* 2008;38 Suppl 1:49-73.
6. Roggli VL, Vollmer RT. Twenty-five years of fiber analysis: what have we learned? *Hum Pathol* 2008 Mar;39(3):307-15.
7. Mirabelli D, Calisti R, Barone Adesi F, et al. Excess of Mesotheliomas after Exposure to Chrysotile in Balangero, Italy. *Occup Environ Med* 2008 Jun 4.
8. Greenberg M. The defence of chrysotile, 1912-2007. *Int J Occup Environ Health* 2008 Jan-Mar;14(1):57-66.
9. Dikensoy O. Mesothelioma due to environmental exposure to erionite in Turkey. *Curr Opin Pulm Med* 2008 Jul;14(4):322-5.
10. Dogan AU, Dogan M, Hoskins JA. Erionite series minerals: mineralogical and carcinogenic properties. *Environ Geochem Health* 2008 Aug;30(4):367-81.

11. Davis JM, Bolton RE, Miller BG, Niven K. Mesothelioma dose response following intraperitoneal injection of mineral fibres. *Int J Exp Pathol* 1991 Jun;72(3):263-74.
12. Bertino P, Marconi A, Palumbo L, et al. Erionite and asbestos differently cause transformation of human mesothelial cells. *Int J Cancer* 2007 Jul 1;121(1):12-20.
13. Villanova F, Procopio A, Rippon MR. Malignant mesothelioma resistance to apoptosis: recent discoveries and their implication for effective therapeutic strategies. *Curr Med Chem* 2008;15(7):631-41.
14. Kane AB. Animal models of malignant mesothelioma. *Inhal Toxicol* 2006 Nov;18(12):1001-4.
15. Grigoriu BD, Scherpereel A, Devos P, et al. Utility of osteopontin and serum mesothelin in malignant pleural mesothelioma diagnosis and prognosis assessment. *Clin Cancer Res* 2007 May 15;13(10):2928-35.
16. Palumbo C, Bei R, Procopio A, Modesti A. Molecular targets and targeted therapies for malignant mesothelioma. *Curr Med Chem* 2008;15(9):855-67.
17. Ramos-Nino ME, Blumen SR, Sabo-Attwood T, et al. HGF mediates cell proliferation of human mesothelioma cells through a PI3K/MEK5/Fra-1 pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008 Feb;38(2):209-17.
18. Hoang CD, Zhang X, Scott PD, et al. Selective activation of insulin receptor substrate-1 and -2 in pleural mesothelioma cells: association with distinct malignant phenotypes. *Cancer Res* 2004 Oct 15;64(20):7479-85.

19. Lee AY, Raz DJ, He B, Jablons DM. Update on the molecular biology of malignant mesothelioma. *Cancer* 2007 Apr 15;109(8):1454-61.
20. Amati M, Tomasetti M, Mariotti L, et al. Assessment of Biomarkers in asbestos-exposed workers as indicators of cancer risk. *Mutat Res* 2008 Jun 27.
21. Zucali PA, Giaccone G. Biology and management of malignant pleural mesothelioma. *Eur J Cancer* 2006 Nov;42(16):2706-14.
22. Kindler HL. Systemic Treatments for Mesothelioma: Standard and Novel. *Curr Treat Options Oncol* 2008 Sep 3.