

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



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

Relazione 1° anno

TITOLO

**Valutazione dell'assetto molecolare
nel Mesotelioma Pleurico Maligno**

*Candidato: Rosanna Mezzapelle
Tutor: Prof. Renzo Boldorini*

INTRODUZIONE

Il mesotelioma è un tumore raro ma molto aggressivo che origina dalle cellule del mesotelio pleurico, peritoneale e pericardico.

Tra questi quello più frequente è il mesotelioma pleurico che rappresenta l'80% dei casi, quello peritoneale ne rappresenta il 20%, mentre le altre forme sono rare (Boutin et al.,1998).

Diversi studi epidemiologici hanno individuato nell'esposizione alle fibre di amianto il principale fattore di rischio correlato con l'insorgenza del mesotelioma pleurico, cofattori sono considerati la predisposizione genetica e infezione da SV40, anche se quest'ultima è una questione piuttosto dibattuta (Strickler HD, 1996).

L'amianto è un minerale silicato di cui esistono due principali sottotipi: anfiboli (crocidolite, amosite, antofillite, tremolite e actinolite) e serpentino.

Le fibre di anfiboli sono molto sottili (diametro 3µm), e risultano per questo facilmente inalabili.

Le fibre di amianto, se respirate, sono in grado di depositarsi a livello della pleura concentrandosi ai siti di drenaggio linfatico e determinando uno stato di infiammazione cronico. Inoltre sono in grado di danneggiare il fuso mitotico della cellula, determinando alterazioni alla mitosi che possono causare aneuploidia e danni al DNA (Ault et al. 1995; Kamp et al. 1995).

Il rischio di malattia è linearmente correlato con la dose, tuttavia non esiste una dose soglia.

La particolarità del MPM è il periodo di latenza, cioè il tempo che intercorre dal momento dell'esposizione ai possibili fattori di rischio alla diagnosi, e può variare da 10 a 45 anni.

In Italia il MPM ha una incidenza di circa 2 casi su 100.000 abitanti, questa aumenta nelle aree in cui sono presenti attività produttive legate all'uso dell'amianto, tra queste, per quanto concerne la regione Piemonte, la zona di Casale Monferrato in cui infatti il tasso di incidenza del MPM dal 1990 al 2006 è di 56.9 su 100.000 abitanti per gli uomini, e di 33 su 100.000 per le donne (Centro di Riferimento per l'Epidemiologia e la Prevenzione Oncologica in Piemonte).

Secondo recenti studi di previsione, l'incidenza è destinata a crescere ancora per i prossimi 10 anni, con un picco massimo nel 2015 (Peto J. Et al.) (Figura 1).

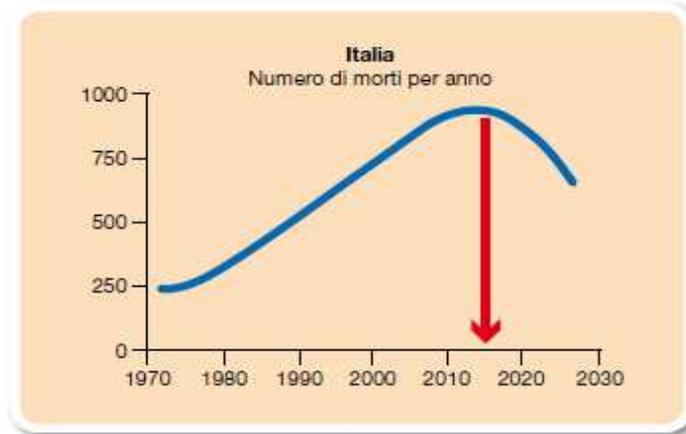


Fig.1. Casi su un milione di abitanti in Italia.

La prognosi nei pazienti affetti da MPM è pessima: la sopravvivenza, nei non trattati, varia dai 4 ai 12 mesi, tuttavia la diagnosi precoce permetterebbe un aumento della sopravvivenza media fino a 5 anni (Pass et al.,2001). Il mesotelioma maligno presenta una variabilità fenotipica, e sulla base delle quantità relative di cellule epiteliali e cellule fusate si distinguono tre tipi istologici principali: epiteliale, sarcomatoso (o fibroso) e misto (o bifasico), i quali sono associati a una diversa prognosi (Boutin et al, 1994; Robinson et al.,2005). Il MPM epiteliomorfo presenta la prognosi migliore.

Diagnosi

Una diagnosi di mesotelioma si ottiene per lo più con un'accurata valutazione del quadro clinico e soprattutto dell'aspetto radiologico delle lesioni pleuriche, confermate da una biopsia del tessuto.

Per quanto riguarda gli esami di natura radiografica le principali metodiche utilizzate sono:

- **Tomografia Computerizzata (TAC)**

Le TAC sono in grado di evidenziare l'effusione pleurica, l'ispessimento della pleura, la sua calcificazione, l'ispessimento delle fessure interlobulari e l'eventuale invasione della parete toracica. La TAC non è, tuttavia, in grado di distinguerle dalle modifiche associate al tumore benigno, o di distinguere tra adenocarcinoma del polmone e mesotelioma. Le scansioni TAC possono essere utili per guidare l'aspirazione con ago sottile delle masse pleuriche per la diagnosi dei tessuti.

- **Acquisizioni di immagini a risonanza magnetica (MRI)**

Le scansioni MRI vengono per lo più utilizzate per stabilire le dimensioni del tumore prima di una terapia aggressiva. Dal momento che forniscono immagini su piani multipli, riescono a

identificare meglio i tumori distinguendoli dalle strutture normali. Sono anche più accurate delle scansioni TAC nella valutazione dell'ingrandimento dei linfonodi mediastinici che si trovano tra i due polmoni, e di una superficie diaframmatica libera, entrambi importanti nella candidatura per l'intervento chirurgico.

▪ **Tomografia a emissione di positroni (PET)**

L'acquisizione di immagini PET sta acquistando una parte importante nella diagnosi e nella valutazione del mesotelioma. Le immagini PET sono considerate le più diagnostiche dei siti di insorgenza tumorale, e le migliori per la determinazione dello stadio del mesotelioma.

Sul piano anatomico-patologico l'analisi essenziale per la diagnosi di mesotelioma è la biopsia tissutale e/o l'analisi del liquido pleurico. Quest'ultimo si presenta all'indagine citologica frequentemente ematico, ad elevato contenuto proteico, con bassi leucociti e basso pH. L'elevato contenuto di acido ialuronico è suggestivo di mesotelioma, ma scarsamente specifico, pertanto l'analisi citologica su liquido pleurico, come anche su ago aspirato trans pleurico, raramente portano ad una diagnosi di certezza.

Risulta quindi di fondamentale supporto alla diagnosi la valutazione istologica del preparato di biopsia pleurica, che però non sempre è in grado di fornire una risposta definitiva. In molti casi occorre avvalersi di tecniche a conferma della diagnosi di MPM per la ricerca dei markers tumorali, quali l'immunoistochimica .

In relazione all'istogenesi embriologica del tessuto di origine, il mesotelioma pleurico esprime markers della serie epiteliale e mesoteliale come la citocheratina 5/6, la calretinina, la trombomodulina, la mesotelina e il Wilms Tumor 1 (WT-1). La presenza di positività di almeno due markers, nel contesto di un quadro istologico e clinico sospetto, è considerata sufficiente nel confermare la diagnosi di mesotelioma pleurico (Chieriac et al, 2009).

Molto spesso si giunge alla diagnosi di mesotelioma già quando questo è in uno stadio avanzato.

La stadiazione ad oggi più utilizzata per il mesotelioma è la stadiazione dell'International Mesothelioma Interest Group (IMIG) (Rusch ,1995) che può essere così sintetizzata:

Stadio I: il tumore è confinato alla pleura parietale e a parte della

viscerale da un solo lato, senza coinvolgimento dei linfonodi.

Tumore resecabile.

Stadio II: tumore sempre confinato alla pleura parietale e viscerale da

un solo lato, ma più esteso. Anche per questo stadio

non vi è coinvolgimento dei linfonodi.

Tumore operabile.

Stadio III : in questo stadio la malattia interessa estesamente pleura parietale e viscerale (potendo coinvolgere anche altre strutture come il pericardio o tessuti della parete toracica) e inoltre c'è un coinvolgimento dei linfonodi.

Tumore non resecabile.

Stadio IV: questo stadio comporta l'interessamento della pleura controlaterale oppure la presenza di liquido pleurico contenente cellule tumorali oppure il coinvolgimento di strutture ossee (coste o colonna vertebrale) o di altri organi al di fuori della gabbia toracica.

Terapia.

Il MPM è una neoplasia per la quale non esiste un protocollo terapeutico standardizzato, in quanto tutti i tipi di trattamento sono gravati da un alto tasso di recidiva e una scarsa sopravvivenza. I tipi di trattamenti da adottare dipendono dall'età del paziente, dal suo performance status e dalla stadiazione, e variano dalla chirurgia, alla brachiterapia, alla radioterapia esterna, alla applicazione intracavitaria di radioisotopi, alla chemioterapia, alla immunoterapia fino a combinazioni di due o più terapie (Rusch, 2003).

Il trattamento chirurgico può essere radicale oppure palliativo, teso cioè a rimuovere tutto il tessuto neoplastico, oppure ad una citoriduzione, nel tentativo di migliorare la sintomatologia e le condizioni cliniche del paziente. Nell'ambito della chirurgia si possono pertanto distinguere due tipi di approccio: la pleurectomia/decorticazione che prevede la resezione dei foglietti pleurici macroscopicamente interessati da neoplasia, con risparmio del parenchima polmonare e la pneumonectomia extrapleurica che prevede l'asportazione "en bloc" della pleura parietale, del polmone e dell'emidiaframma e pericardio omolaterale (Rice et al., 2011).

I sostenitori del trattamento palliativo sostengono la semplice pleurectomia e il controllo del versamento pleurico, conservando al contempo parenchima polmonare funzionante. Per questo tipo di intervento, la mortalità operatoria oscilla dall'1,5 al 5% (Rusch, 1995). La malattia residua viene controllata con terapia radiante e chemioterapia intrapleurica ottenendo una sopravvivenza ad 1 e 2 anni del 65% e 40% rispettivamente con un intervallo libero da malattia di 11 mesi (Rusch, 1994). La pleurectomia/decorticazione, asportando tutta la pleura parietale e viscerale dall'apice del polmone al diaframma, può avere intento radicale solo nel I stadio di malattia.

La radioterapia può essere utile per il controllo del dolore e del versamento pleurico ma è scarsamente efficace come terapia primaria, viene per lo più utilizzata in combinazione con la chemioterapia (Gordon et. al, 1982).

Anche l'efficacia della chemioterapia è difficile da valutare. I chemioterapici vengono usati da soli o in associazione, attualmente il più utilizzato per la cura del MPM è il cisplatino (Tilleman et al. 2009). Questa macromolecola, superata la membrana cellulare, crea addotti al DNA riconosciuti dalla cellula come danno, inducendo quindi due possibili vie di risposta opposte: la morte cellulare per apoptosi o la riparazione del danno stesso per opera del complesso NER (nucleotide excision repair complex), composto da oltre trenta enzimi, tra i quali il più importante e cruciale nell'azione enzimatica è l'excision repair cross-complementing group-1 (ERCC1)(Zheng et al., 2007).

Attualmente il cisplatino viene somministrato in associazione al pemetrexed (commercialmente conosciuto con il nome di *Alimta*®), agente antifolico che inibisce gli enzimi coinvolti nel ciclo dei folati. Il target enzimatico principale del pemetrexed è la timidilato sintasi (TS), enzima coinvolto nella sintesi ex novo del DNA (Garcia-Carbonero 2006).

La terapia combinata di cisplatino e pemetrexed ha determinato un aumento dell'overall survival (12.1 vs 9.3 mesi) e un miglioramento della qualità di vita (Vogelzang et al. 2003). Recentemente diversi studi hanno indagato la possibilità di utilizzare metodiche molecolari al fine di valutare il valore predittivo e prognostico associato all'espressione proteica e dell' mRNA della TS e dell' ERCC1 in associazione alla cura con pemetrex e cisplatino (Zucali et al. 2011; Righi et al. 2010).

Nel'ultimo decennio grandi progressi sono stati fatti nel campo delle cosiddette terapie molecolari (target therapies) nella cura di neoplasia come il cancro del colon retto e il cancro del polmone (Ciardello et al, 2008), portando a evidenziare la presenza di mutazioni e/o iperespressione del gene EGFR codificante per il recettore tirosin-chinasico transmembrana, principale bersaglio di tali terapie (Peaz et. al., 2004; Sharma et al., 2007) e dei geni codificanti le proteine a valle della cascata enzimatica (De Roock et al. 2010).

Attualmente non è possibile intervenire con una terapia a bersaglio molecolare nei confronti del MPM, soprattutto a causa della mancanza di solide conoscenze riguardanti la patogenesi molecolare del tumore, pertanto, data l'origine epiteliale del MPM, alcuni studi hanno focalizzato la loro attività sulla valutazione dello stato mutazionale e l'espressione di EGFR e sulle molecole coinvolte nei pathway a valle di questo, per determinare un possibile futuro utilizzo di farmaci molecolari, ma i risultati fin'ora ottenuti sono ancora esigui (Rena et al.,2001; Okuda et al.,2007).

Epidermal growth factor receptor (EGFR).

L'Epidermal growth factor receptor è una glicoproteina transmembrana con attività tirosin-chinasica appartenente alla famiglia ErbB codificato dal gene EGFR localizzato sul cromosoma 7 p11-13, ed così costituita:

- una porzione ammino-terminale, extracellulare e glicosilata che rappresenta il sito di legame per ligandi EGF, TGF-alfa.
- Una regione idrofobica transmembrana con funzione di ancoraggio.
- un dominio C-terminale citoplasmatico responsabile dell'attività chinasica e dell'interazione con i trasduttori del segnale intracellulari.

Sulla superficie della membrana è presente in forma monomeric, che in seguito al legame con ligandi extracellulari dimerizza e assume attività tirosin-chinasica, con conseguente autofosforilazione del proprio dominio citoplasmatico (Cohen et al., 1982).

Le vie di trasduzione attivate da EGFR sono numerose, altamente conservate durante l'evoluzione e regolano vari meccanismi tra cui la sopravvivenza cellulare, il differenziamento, la migrazione (Figura 2). La via principalmente studiata e maggiormente coinvolta nei processi cellulari della trasformazione neoplastica è quella delle MAP chinasi.

In seguito alla dimerizzazione del recettore viene attivata la proteina GTPasi KRAS presente in forma inattiva sulla membrana citoplasmatica e, mediante l'attività GTPasica, recluta e attiva per cambiamento conformazionale la proteina Raf-1, prima delle tre protein chinasi (Raf-1, MEK e MAPK) a valle della pathway che formano una cascata enzimatica in cui ogni enzima attiva quello successivo per fosforilazione.

L'ultimo enzima della cascata, la proteina chinasi attivata dai mitogeni (MAPK) entra nel nucleo e attiva modulatori nucleari in grado di regolare l'espressione genica.

Un secondo pathway fondamentale a valle di EGFR è quello delle PI3K/AKT/mTOR, che svolge una funzione critica nella proliferazione cellulare, nella progressione del ciclo cellulare, nell'apoptosi e nel metabolismo. Le PI3K catalizzano il trasferimento di un gruppo γ -fosforico dell'ATP sulla posizione D3 del fosfatidilinositolo-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P₂) producendo così fosfatidilinositolo-3,4,5 trifosfato (PI(3,4,5)P₃) il quale a sua volta funge da ligando per reclutare, sulla faccia interna della membrana cellulare, proteine contenenti domini Pleckstrin Homology (PH), tra cui AKT.

AKT, nota anche come proteina chinasi B, è la serina-treonina chinasi che viene direttamente attivata in risposta a PI3K, ed è il suo più importante effettore (Engelman et al., 2006).

Il principale effettore a valle di AKT è il complesso mTOR, capace di integrare segnali provenienti dall'esterno e dall'interno della cellula, come ad esempio segnali legati allo stato energetico, alla presenza di nutrienti e di fattori di crescita.

La fosfatasi PTEN (Phosphatase and TENsin homologue) è un importante regolatore di questa via di trasduzione, infatti defosforila il PI(3,4,5)P3 a PI(4,5)P2 determinando un blocco nella cascata di amplificazione e fungendo quindi da oncosoppressore (Di Cristofano et al.,2000). Mutazioni o delezioni nel suo gene sono state osservate in numerose neoplasie tra cui anche il MPM (Besson et al., 1999).

Attualmente vi è uno sviluppo clinico di molti composti che hanno come bersaglio il pathway di PI3K/AKT/mTOR, in particolare sono state sviluppate molecole in grado di penetrare la membrana cellulare e inibire PI3K, AKT ed inibitori di mTOR, sia allosterici (rapamicina e derivati) che del sito catalitico (Mita et al.,2003).

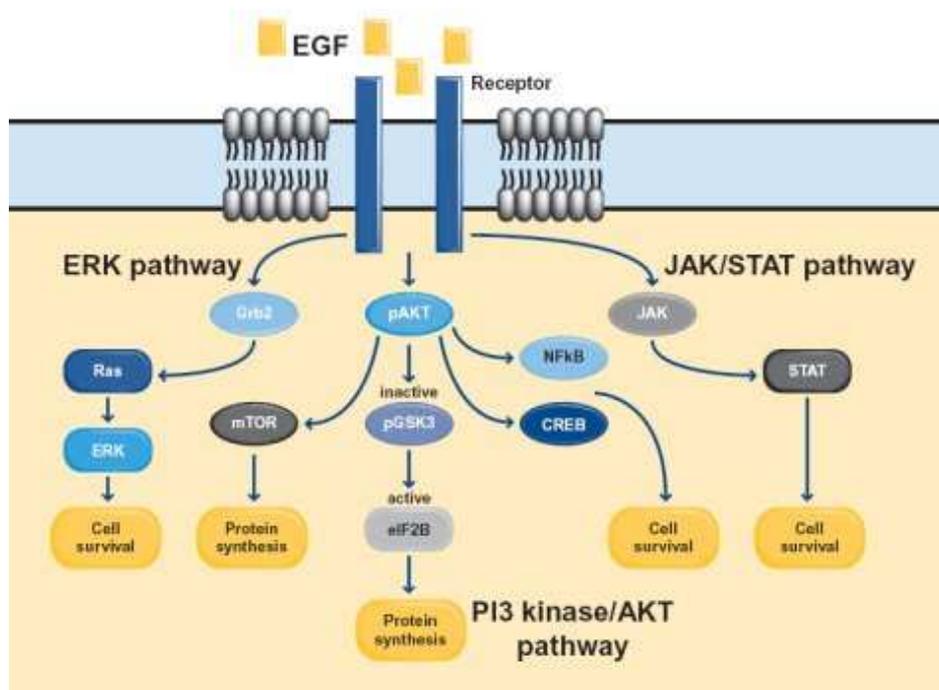


Fig. 2. Vie di trasduzione attivate da EGFR in seguito al legame con un ligando EGF

Mutazioni di EGFR

EGFR è iperespresso e/o costitutivamente attivato in una grande varietà di tumori umani.

L'origine di tale attivazione nelle cellule tumorali può dipendere:

- dall'iperpressione recettoriale che è responsabile della dimerizzazione del recettore ligando-indipendente;

- dall'emergenza di forme mutate del recettore che ne permettono un'attivazione costitutiva, ligando-indipendente;
- dalla presenza di meccanismi ligando-dipendenti eterologhi.

Il meccanismo di iperespressione di EGFR è stato attribuito sia ad attivazione trascrizionale che ad amplificazione genica, anche se, studi più approfonditi, hanno dimostrato che la causa prima sembra essere di tipo epigenetico e cioè un'attivazione trascrizionale.

Il controllo dell'incremento dei livelli di espressione di EGFR nel cancro e l'associazione tra questa iperespressione e il decremento delle possibilità di sopravvivenza nei pazienti hanno portato allo sviluppo di molte strategie terapeutiche che hanno come bersaglio questo recettore, sia in associazione con chemioterapici, nel caso di tumori allo stadio avanzato, sia singolarmente come terapia preventiva (Vecchione et al., 2011).

Le mutazioni più comuni di EGFR nei tumori umani risultano essere delezioni localizzate sull'esone 19 che coinvolgono una parte del dominio extracellulare deputata al legame con il ligando, producendo in questo modo un recettore costitutivamente attivo. Studi relativi al tumore del polmone non a piccole cellule (Non Small Cell Lung Cancer - NSCLC) sono state riscontrate: delezione sull'esone 19, sostituzione nell'esone 21 di una leucina con una arginina nella posizione 858 (L858R) e altre sostituzioni localizzate sugli esoni 18 e 20 (Kosaka, T. et al., 2004). Mutazioni in EGFR sono state riscontrate nella maggiore parte dei pazienti con NSCLC responsivi agli inibitori delle tirosin chinasi EGFR (TKIs) (Harichand-Herdt et al., 2008), tuttavia tumori che presentavano una mancata risposta ai farmaci TKI hanno mostrato una comune mutazione a carico dell'esone 20 con sostituzione della treonina 790 in metionina (T790M).

Attualmente i due principali TKIs, approvati dalla Food and Drug Administration, sono Gefitinib e Erlotinib, conosciuti commercialmente con il nome di Iressa e Tarceva rispettivamente (Krause et al., 2005).

I TKIs sono derivati sintetici chinazolinici a basso peso molecolare con il seguente meccanismo di azione:

- si legano al dominio intracellulare degli RTK;
- prevengono l'attivazione della funzione chinasi;
- inibiscono il segnale di EGFR

Oltre agli inibitori chinasi vengono usati degli anticorpi monoclonali cetuximab (Erbix) e Panitumumab (Vectibix), che interferiscono con il legame extracellulare con il ligando (Cunningham, 2004) (Figura 3).

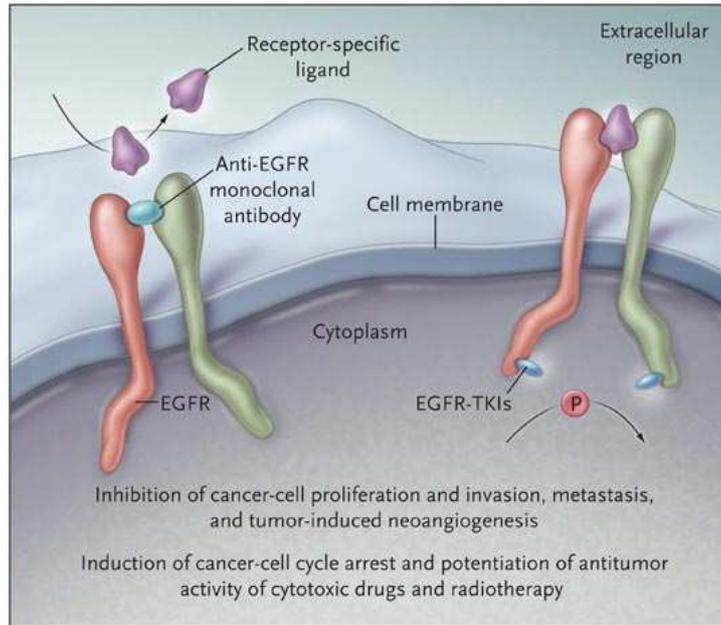


Fig. 3. Farmaci Inibitori di EGFR

In alcuni lavori scientifici è stato valutato lo stato mutazionale di EGFR nel MPM (Cortese et al., 2006), non evidenziando alcuna mutazione genetica, tuttavia questi studi sono stati condotti su una casistica piuttosto esigua tale da non poter confermare con certezza questo dato. Ad oggi quindi l'utilizzo degli inibitori di EGFR nella cura del MPM è precluso.

Fosfoinositolo 3 Chinasi (PI3K)

Le proteine fosfatidilinositolo-3-fosfato chinasi (PI3K) catalizzano la conversione del fosfatidilinositolo-bisfosfato (PIP₂) a fosfatidilinositolo-trifosfato (PIP₃), un importante mediatore intracellulare che riveste una funzione nodale nel ciclo cellulare modulando il segnale di arresto della crescita e portando alla sopravvivenza cellulare attivando la proteina AKT. Gli enzimi PI3K sono costituiti da una subunità regolatoria (p85) e una subunità catalitica (p110), codificata da 8 varianti geniche che portano ad altrettante varianti proteiche. Nel gene PIK3CA sono state individuate mutazioni che determinano un'attivazione costitutiva della proteina, portando ad un'attivazione costitutiva della via di trasduzione del segnale, con conseguente capacità della cellula di sopravvivere anche in condizioni non favorevoli (Benvenuti et al., 2008)

Il gene che codifica per la subunità catalitica è localizzato sul cromosoma 3q26.32. Le mutazioni nel gene PIK3CA avvengono principalmente negli esoni 9 e 20, con alcune posizioni preferite (hot-spot) nelle sequenze che codificano per i codoni 542, 545 e 1047. Mutazioni nel gene PIK3CA sono state individuate nel 20-30% dei carcinomi coloretali, e in molte altre malattie neoplastiche, tra cui

i tumori del polmone, dell'ovaio, del fegato, del cervello, dello stomaco e della mammella (Samuel set al., 2004; Di Nicolantonio et al., 2010)

ERCC1 e TS.

Come visto precedentemente, i chemioterapici usati per il trattamento di pazienti affetti da MPM, cisplatino e pemetrexed, rispettivamente creano addotti al DNA e fungono da antimetabolita (Vogelzang et al., 2003) portando entrambi a morte cellulare qualora la cellula non fosse in grado di rimediare al danno indotto.

Nel caso del trattamento con cisplatino risulta utile andare a studiare il grado di espressione genica e proteica dell'enzima ERCC1 coinvolto nella riparazione degli addotti, in quanto bassi livelli di espressione potrebbero essere associati a un migliore outcome del paziente, come peraltro già osservato nel NSCLC (Lord et al., 2002).

Analogamente, la valutazione dell'espressione della timidilato sintasi può conferire informazioni sulla risposta al trattamento con pemetrexed (Zucali et al., 2011, Righi et al., 2001).

Excision repair cross-complementing group-1.

L'enzima ERCC1 appartiene al complesso NER (nucleotide excision repair complex), il suo gene localizza sul cromosoma 19q13. L'ERCC1 è coinvolto nella rimozione degli addotti al DNA causati ad esempio dai raggi UVA o da agenti alchilanti come il cisplatino (Zheng et al., 2007).

Il cisplatino, una volta entrato nel nucleo della cellula è in grado di creare addotti al DNA formando crosslink tra le basi di guanina. Tali addotti vengono riconosciuti come danno e inducono una cascata di segnale che portano la cellula alla morte per apoptosi. Un complesso di molecole inizialmente formato da XPC e hHR23 riconoscono la presenza dell'addotto sul DNA e reclutano le proteine TFIIH e XPG che, insieme alle altre proteine XPA, RPA, XPS e ERCC1, formano il complesso NER che rimuove l'addotto con tagli al 5' e al 3', permettendo all'enzima Polimerasi di sintetizzare un nuovo filamento (Figura 4) (Dip et al., 2004).

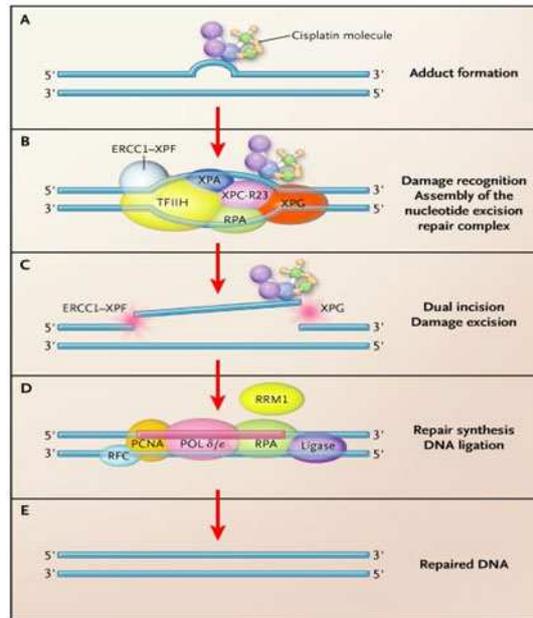


Fig. 4. Complesso NER e riparazione del danno al DNA indotto dal cisplatino.

Timidilato sintetasi.

Il gene che codifica per TS localizza sul cromosoma 18p11 e codifica per un enzima chiave nell'ambito della replicazione cellulare in quanto catalizza uno step fondamentale nella sintesi degli acidi nucleici (DNA), ossia la reazione di metilazione della desossitimidina monofosfato (dUMP) a desossitimidina monofosfato (dTMP).

Il pemetrexed è in grado di inibire non solo TS ma anche gli altri enzimi coinvolti nel ciclo dei folati: diidrofolato reductasi (DHR) e la glicinammide ribonucleotide formiltransferasi (GARFT) determinando un sostanziale blocco nella sintesi di nucleotidi pirimidinici e purinici (Shih et al., 1997) (Figura 5).

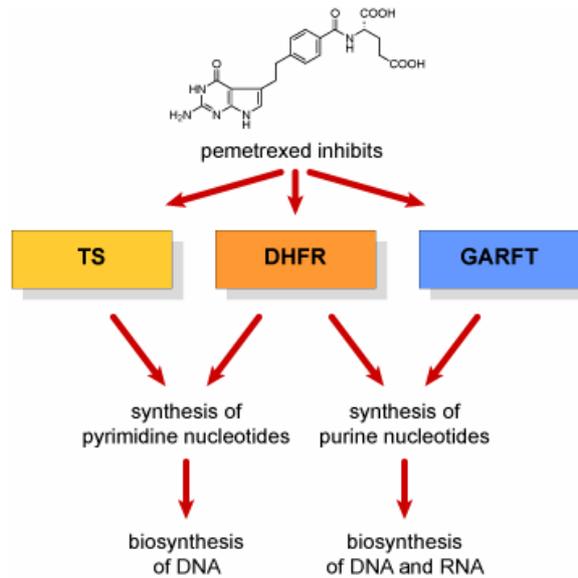


Fig.5. Bersagli molecolari del pemetrexed.

SCOPO DEL LAVORO

Viste le caratteristiche epiteliali dei MPM epiteliomorfi, il nostro studio si propone di valutare lo stato mutazionale dei geni implicati nelle vie di traduzione attivate da EGFR che rappresentano il bersaglio molecolare delle target therapies comunemente somministrate ai pazienti con tumore al polmone non a piccole cellule (NSCLC). In particolare verrà valutata la presenza di mutazioni nel gene codificante per EGFR e la sua overespressione proteica, e nei geni che svolgono un ruolo chiave nelle cascate di segnalazione a valle del recettore, quali: KRAS e BRAF, per quanto riguarda la via di amplificazione delle MAPK, e PTEN, PI3K, AKT e mTOR per il pathway PI3K-AKT. Inoltre verrà valutata l'espressione dell'RNA messaggero (mRNA) del gene Excision Repair Cross-Complementation Group1 (ERCC1), enzima appartenente al nucleotide excision repair complex che risulta un fattore determinante l'efficacia della cura con farmaci alchilanti come il cisplatino, e l'espressione proteica dell'enzima Timidilato Sintetasi (TS), bersaglio della terapia con pemetrexed (Righi et al., 2009).

MATERIALI E METODI

Raccolta dei campioni

In questo primo anno di dottorato è iniziato uno studio di tipo retrospettivo su 17 casi di MPM in cura presso la divisione di Chirurgia Toracica dell'Ospedale "Maggiore della Carità" di Novara, nei quali l'analisi immunoistochimica con anticorpi anti-citocheratina 5/6, calretinina, trombomodulina, mesotelina Wilms Tumor 1 (WT-1) è risultata positiva per almeno due marcatori.

Per ogni caso, dall'analisi della cartella clinica e delle schede di dimissione, sono stati rilevati:

- dati anagrafici ed identificativi del paziente;
- data in cui è stata effettuata la diagnosi di mesotelioma pleurico maligno;
- data di intervento chirurgico o della biopsia;
- tipo di trattamento;
- valutazione dello stato del paziente (vivo o morto);
- sopravvivenza: dalla data della diagnosi a Settembre 2011 per i vivi, dalla data della diagnosi alla data del decesso per i morti.

Mediante la consultazione del database WINANA dell'Anatomia Patologica dell'Ospedale "Maggiore della Carità" di Novara, sono stati rilevati i seguenti dati (Cod. snomed M-90523):

- numero dell'esame istologico definitivo sul frammento chirurgico o bioptico di pleura;
- istotipo di mesotelioma pleurico maligno: epiteliomorfo, sarcomatoso, bifasico;
- preparati istologici colorati con ematossilina-eosina corrispondenti.

Per ciascun caso sono stati analizzati il/i preparato/i istologico colorato con ematossilina eosina al fine di:

- ulteriore conferma diagnostica, compresa la ridefinizione dell'istotipo tumorale;
- controllo sulla disponibilità di materiale cellulare sufficiente all'esecuzione dello studio;
- scelta del campione qualitativamente migliore nel caso in cui fossero disponibili più preparati.

Di 17 pazienti attualmente esaminati 4 sono donne (23,5%) e 13 uomini (76,5%), età media 73 (range 52-91).

Dei 17 pazienti analizzati 4 sono stati trattati con terapia a base di Platino (24%), 12 con Platino associato a pemetrexed (70%) e un solo paziente non è stato sottoposto a terapia (6%).

In 16 di 17 casi l'istotipo è epitelioide (94%), uno è sarcomatoso (6%)(Tabella 1).

N. Paziente	Sesso	Età alla diagnosi	Istotipo	Trattamento	Sopravvivenza	Vivo o Morto
1	F	91	Epitelioide	Platino	8	Morto
2	F	77	Epitelioide	No	8	Morto
3	M	76	Epitelioide	Platino + Alimta	12	Vivo
4	M	79	Epitelioide	Platino + Alimta	15	Vivo
5	M	73	Epitelioide	Platino + Alimta	13	Vivo
6	M	71	Epitelioide	Platino	8	Morto
7	M	73	Epitelioide	Platino	13	Vivo
8	M	53	Epitelioide	Platino + Alimta	15	Vivo
9	M	66	Epitelioide	Platino + Alimta	16	Vivo
10	F	77	Sarcomatoso	Platino + Alimta	10	Morto
11	M	77	Epitelioide	Platino	10	Vivo
12	M	76	Epitelioide	Platino + Alimta	9	Morto
13	M	71	Epitelioide	Platino + Alimta	4	Morto
14	F	85	Epitelioide	Platino + Alimta	6	Morto
15	M	82	Epitelioide	Platino + Alimta	12	Vivo
16	M	67	Epitelioide	Platino + Alimta	13	Vivo
17	M	52	Epitelioide	Platino + Alimta	14	Vivo

Tab. 1. Dati clinico patologici dei pazienti in studio.

Preparazione del materiale

In tutti i casi su preparato istologico colorato con ematossilina-eosina è stata selezionata da un anatomico patologo al microscopio ottico l'area di campione comprendente almeno il 70% di cellule neoplastiche, priva di necrosi. In seguito, è stato reperito il campione di tessuto corrispondente, incluso in paraffina, sul quale è stata eseguita una macrodissezione manuale comprendente l'area neoplastica precedentemente selezionata.

Dal materiale incluso in paraffina sono state ottenute 6-7 sezioni dello spessore di 5 µm che sono state poste in provette sterili da 1,5 ml al fine di procedere con l'estrazione del DNA, altrettante sezioni dello spessore 5 µm, poste in provette sterili da 1,5 ml, per procedere con l'estrazione dell'mRNA.

Infine per campione sono state ottenute due sezioni dello spessore di 5 µm disposte su vetrino polarizzato per l'analisi immunohistochimica.

Estrazione del DNA da tessuto paraffinato

Per l'estrazione del DNA da campione istologico fissato in formalina e incluso in paraffina è stato utilizzato il metodo del fenolo-cloroformio.

Il materiale, è stato digerito aggiungendo 25 µL di proteinasi K e 450 µL di soluzione di lisi (SDS 1%, EDTA 20mM, Tris HCl pH 7,5 20mM) in incubazione a 55°C overnight. Il DNA disciolto in soluzione è stato separato dalla restante fase organica mediante aggiunta di un volume di cloroformio (M-medical, Milano, Italia) e un volume di fenolo (CELBIO, Milano, Italia) tamponato con Tris-EDTA a pH 7,5-7,6. Dopo centrifugazione a 3500 rpm per 10 min, la fase contenente il DNA è stata trasferita in una provetta da 1,5 mL. Il DNA è stato precipitato con aggiunta di etanolo 100% freddo e incubato a -20°C per almeno circa 90 min; il pellet è stato ottenuto mediante centrifugazione a 14000 rpm per 10 min. Per eliminare i sali residui, il DNA è stato trattato con etanolo 70% e fatto asciugare; successivamente è stato risospeso in acqua DEPC-Treated DNase-RNase free (BIOLINE, Taunton, USA) in un volume finale di 30 µL per i campioni istologici e conservato a -20°C.

Ogni 4-5 campioni estratti è stato inserito un controllo negativo di estrazione costituito da acqua DEPC-Treated DNase-RNase free (BIOLINE, Taunton, USA).

Sui campioni così ottenuti, inclusi i controlli negativi di taglio e di estrazione, è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro (Eppendorf, Amburgo, Germania) a 260 nm per valutare la concentrazione di DNA presente in ognuno, mentre, per indagare il grado di purezza dei campioni, sono stati valutati il rapporto a 260/280 per la contaminazione da proteine e il rapporto a 260/230 per la presenza di contaminanti quali fenolo, composti aromatici, peptidi e carboidrati.

Saggio genetico Scorpions® - ARMS (Amplification Refractory Mutation System)

Per la determinazione delle mutazioni di EGFR mediante saggio ARMS è stato utilizzato il kit DxS TheraScreen®: EGFR 29 Mutation Kit (Diagnostic Innovations, Manchester, Inghilterra), destinato all'uso con Applied BioSystems 7500 Real-Time PCR System (Applied BioSystems, Monza, Italia). Tale kit prevede l'amplificazione con metodica real-time PCR del DNA di interesse utilizzando saggio ARMS associato alla tecnologia DxS Scorpions®. La combinazione delle due metodiche comporta un aumento di specificità del saggio che, in relazione alla quantità di DNA presente nel campione, è in grado di rilevare circa l'1% del DNA mutato su uno sfondo di DNA genomico wild-type.

Il kit TheraScreen® è in grado di identificare le 29 mutazioni sul gene EGFR, localizzate negli esoni 18-21; in particolare: 3 mutazioni puntiformi dell'esone 18 (senza distinguerle l'una dall'altra), 19 delezioni nell'esone 19 (senza distinguerle l'una dall'altra), una mutazione puntiforme e 3 inserzioni nell'esone 20, e 2 mutazioni puntiformi nell'esone 21 (Tabella 2).

Mutazione	Modifica delle basi
DEL19	Δ K745-I759
L858R	CTG→CGG
L861Q	CTG→CAG
G719X	GGC→XGC
S768I	AGC→ATC
INSERZIONI20	Ins770P, D,N

*Tab. 2. Mutazioni
EGFR rilevate dal kit DxS Scorpions®.*

Per ogni campione vengono effettuate 7 diverse reazioni: una con il saggio di controllo e 6 con i diversi saggi contenenti primers specifici per ogni singola mutazione.

Il saggio di controllo, che amplifica una regione dell'esone 2 del gene *EGFR*, serve per ottenere una valutazione del DNA totale in ogni campione.

Ogni saggio di mutazione contiene una molecola Scorpion® marcata con fluorocromo FAM (assorbanza a 520 nm) e un primer ARMS, che consentono di distinguere il DNA wild-type dall'eventuale DNA mutante rilevato con il saggio PCR real-time.

I campioni, analizzati utilizzando il kit, sono stati precedentemente diluiti con acqua DEPC-Treated DNase-RNase free (BIOLINE, Taunton, USA) ad una concentrazione di DNA pari a 25 ng/ μ L.

Tutte le miscele di reazione contengono un saggio di controllo esogeno, o controllo interno, marcato con fluorocromo HEX (assorbanza a 550 nm).

La procedura prevede la preparazione di tre differenti miscele di reazione per tutti i campioni di DNA, un controllo negativo costituito da acqua DEPC-Treated DNase-RNase free (BIOLINE, Taunton, USA), ed un controllo positivo, costituito da una miscela di plasmidi contenenti tutte le mutazioni identificate dal kit.

La piastra viene quindi sigillata utilizzando MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Monza, Italia) e inserita nello strumento ABI7500 Fast (Applied Biosystems, Monza, Italia) per dare avvio alla reazione di PCR real-time con il seguente protocollo termico:

DENATURAZIONE INIZIALE: 95°C per 10 min
DENATURAZIONE: 95°C per 30 sec
APPAIAMENTO ED ESTENSIONE: 61°C per 60 sec

} per 40 cicli

Sequenziamento diretto.

Per la valutazione dello stato mutazionale del PI3KCA, i campioni sono stati diluiti in con acqua DEPC-Treated DNase-RNase free (BIOLINE, Taunton, USA) per ottenere una concentrazione di DNA pari a 25 ng/μL.

Le mutazioni nel gene PI3K avvengono principalmente negli esoni 9 e 20.

Al fine di amplificare il gene di nostro interesse è stata eseguita una reazione di PCR con i seguenti primers:

PI3KCA esone 9F: 5'-GGGAAAAATATGACAAAGAAAGC-3'

PI3KCA esone 9R: 5'-CTGAGATCAGCCAAATTCAGTT-3'

PI3KCA esone 20F: 5'-CTCAATGATGCTTGGCTCTG-3'

PI3KCA esone 20R: 5'-TGGAATCCAGAGTGAGCTTTC-3'

La procedura prevede la preparazione della miscela di reazione per tutti i campioni di DNA, un controllo negativo e un controllo positivo.

La mix di reazione contiene: Treated DNase-RNase free (BIOLINE, Taunton, USA), PCR Buffer 1X, MgCl₂ 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM, primer 0,5 μM, TaqGold 2U/ μL (Applied Biosystems-Roche).

La reazione è stata eseguita su termociclatore (Eppendorf, Amburgo, Germania) con le seguenti condizioni:

Per l'esone 9:

DENATURAZIONE INIZIALE: 95°C per 10 min

DENATURAZIONE: 95°C per 30 sec
AMPLIFICAZIONE: 56°C per 30' sec
ESTENSIONE: 72°C per 30 sec

} per 40 cicli

ESTENSIONE FINALE: 72°C per 10 min

TERMINAZIONE: 10°C.

Per l'esone 20:

DENATURAZIONE INIZIALE: 95°C per 10 min

DENATURAZIONE: 95°C per 30 sec
AMPLIFICAZIONE: 55°C per 30' sec } per 40 cicli
ESTENSIONE: 72°C per 30 sec }

ESTENSIONE FINALE: 72°C per 10 min

TERMINAZIONE: 10°C.

Per controllare l'avvenuta amplificazione dei campioni, si procede ad elettroforesi su gel di agarosio al 3% e visualizzazione tramite bromuro di etidio.

I prodotti di amplificazione delle opportune dimensioni (251 bp esone 9; 241 bp esone 20) vengono prelevati dal gel per essere sottoposti ad analisi di sequenza dopo eluizione con kit commerciale NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Germania).

Il DNA eluito viene quindi sottoposto a sequenziamento diretto tramite l'utilizzo di BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied BioSystems, Monza, Italia) con l'aggiunta dei primers PI3KAex9 (5'-TAGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAA-3') e PI3KAex20 (5'-TTGATGACATTGCATACATTCG-3') alla concentrazione di 3,2 ng/μL.

Ai 12 μL di mix dispensata in ogni provetta vengono aggiunti 8 μL di DNA eluito per un volume finale di 20 μL. Per la reazione di sequenza viene utilizzato il termociclatore Eppendorf (Amburgo, Germania) con le seguenti condizioni:

DENATURAZIONE: 96°C per 10 sec
ANNEALING: 50°C per 5 sec } per 25 cicli
ESTENSIONE: 60°C per 4 min }

I prodotti di reazione vengono sequenziati tramite un sequenziatore automatico a 16 capillari (ABI-prism 3100, Applied BioSystems, Monza, Italia) dopo essere stati purificati con il kit commerciale Spin Columns Centrisep (Princeton Separations, Adelphia, NJ, USA).

Le sequenze così ottenute vengono analizzate manualmente tramite allineamento con la sequenza wild-type di PI3K (esone 9: GAAACTCCATGCTTAGAGTTGGAGTTTGACTGGTTCAGCAGT GTGGTAAAGTTCCCAGATATGTCAGTGATTGAAGAGCATGCCAATTGGTCTGTATCCCG AGAAGCAGGATTTAGCTATTCCCACGCAGGACTG; esone 20: CTGTTTCATATAGATTTT GGACACTTTTTGGATCACAAGAAGAAAAATTTGGTTATAAACGAGAACGTGTGCCAT TTGTTTTGACACAGGATTTCTTAATAGTGATTAGTAAAGGAGCCCAAGAATGCACAAAG ACAAGAGAATTTGAGAG).

Estrazione dell'mRNA e retrotrascrizione

Per l'estrazione dell'RNA da campione istologico fissato in formalina è stata seguita la procedura prevista dal kit commerciale RecoverAll Total nucleic acid isolation (Ambion, Austin, Texas)) risospesando l'RNA in 60 uL di elution solution.

Il contenuto di RNA totale è stato determinato misurando l'assorbanza a 260 nm: a questa lunghezza d'onda ogni unità di assorbanza corrisponde a 40 µg/mL di RNA.

La trascrizione inversa è stata effettuata con 500 ng di RNA usando il kit RevertAid First Strand cDNA synthesis (Fermentas, St. Leon-Rot, Germania) e 0,2 µg/µL di random esame come primer inversi.

Real-time PCR

L'analisi dell'espressione del gene ERCC1 è stata determinata mediante lo strumento 7500Fast (Applied Biosystems, Monza, Italia). Le reazioni di real-time PCR sono state effettuate in triplo in un volume totale di 20 µL contenente 3 µL di cDNA, 1X di TaqMan Universal PCR Master Mix no AmpErase UNG e 1X di TaqMan Gene Expression Assay.

Le condizioni impiegate nella reazione di PCR sono state quelle fornite dalla casa produttrice: 1 ciclo a 95°C per 20 sec e 40 cicli di denaturazione a 95°C per 3 sec e di allineamento ed estensione a 60°C per 30 sec.

La quantificazione relativa del gene di interesse è stata determinata mediante il metodo comparativo $\Delta\Delta CT$ utilizzando il software Sequence Detector System 7500 v 2.0.4, dove il target veniva normalizzato rispetto al riferimento endogeno β -actina. Come calibratore è stato utilizzato un pool di RNA estratto da tessuto normale (indenne da neoplasia) di: polmone, fegato e intestino.

Immunoistochimica

Le sezioni, precedentemente tagliate, sono state sparaffinate effettuando due passaggi in xilolo e reidratate con lavaggi in scala alcolica decrescente (100%, 85%, 70%) e acqua.

Si procede poi alla riesposizione dei siti antigenici mascherati dalla fissazione; per questo studio lo smascheramento è stato eseguito con EDTA (acido etildiamminotetracetico 10x, pH 8). Le sezioni su vetrino sono state immerse nell'EDTA già in ebollizione e sono state effettuati 4 cicli (due cicli da 4 minuti seguiti da 2 cicli da 3 minuti) alla massima temperatura del microonde, avendo cura di

aggiungere acqua sterile ad ogni ciclo per evitare che i vetrini siano esposti all'aria, impedendone così l'essiccamento.

La reazione viene eseguita sullo strumento Dako Autostainer (Dako, Glostrup Denmark) e prevede i seguenti steps:

- incubazione con H₂O₂ al 3% per 10 min in modo da inibire la perossidasi endogena.
- incubazione con anticorpo monoclonale murino anti-TS umana (clone TS106, Dako) diluito 1:50 in diluente Ventana (Ventana Medical System, Tucson, Arizona) per 1 ora.
- Incubazione con anticorpo secondario Envision HRP Rabbit/mouse (Dako).
- Immunodetezione con 3', 3-diaminobenzidina (DAB) per 4 min.

Infine le sezioni sono state controcolorate con ematossilina di Mayer, deidratate e montate per l'osservazione al microscopio ottico.

Interpretazione dei dati.

L'espressione proteica di TS è stata valutata semiquantitativamente attraverso l'uso dell'H-score (Olaussen et al. 2006), che prevede il seguente algoritmo:

l'intensità della colorazione assume un valore compreso tra +1, debolmente colorato, +2, moderatamente colorato, e +3, colorazione molto intensa.

Il valore di intensità viene moltiplicato per la percentuale di cellule positive.

Dall'1 al 9% di cellule positive si assegna un valore di 0,1.

Dal 9 al 49% di cellule positive si assegna un valore di 0,5

Dal 49% al 100% di cellule positive si assegna un valore di 1.

L'H-score può assumere quindi valori tra 0 e 3.

Analisi statistica.

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test di Fisher, in quanto i valori ottenuti risultano troppo bassi per eseguire un test del χ^2 .

Le analisi di sopravvivenza sono state effettuate utilizzando il metodo di Kaplan-Meier. Il confronto tra le due curve è stato condotto mediante il Log-rank test.

Valori di P <0,05 sono stati considerati statisticamente significativi (intervallo di confidenza: 95%).

RISULTATI

Sopravvivenza e trattamento

Nel corso del primo anno di studio sono stati analizzati 17 pazienti affetti MPM (13 uomini – 76% e 4 donne – 24%), di cui 16 epiteliorfidi (94%) e 1 sarcomatoso (6%). Dei 17 pazienti analizzati 4 sono stati trattati con terapia a base di platino (24%), 12 con platino associato a pemetrexed (70%) e un solo paziente non è stato sottoposto a terapia (6%). Dei 17 pazienti presi in esame 7 sono deceduti mentre i restanti 10 sono ancora in vita con una sopravvivenza media, calcolata dalla data di diagnosi della patologia al Settembre 2011, di 11 mesi (minimo 10 - massimo 16) (Tabella 1).

L'analisi statistica condotta sui soli pazienti trattati, non ha mostrato correlazione tra il trattamento in singolo con platino e la terapia combinata con platino+pemetrexed con il decesso del paziente ($P=0,49$) (Tabella 3.), inoltre l'analisi di sopravvivenza con curve di Kaplan-Meier e successiva analisi Log-Rank test non mostrato differenza significativa tra i due diversi tipi di trattamento e la sopravvivenza ($P=0,17$) (Figura 6).

		N° pazienti vivi	N° pazienti morti	Fisher's exact test
Trattamento	Platino	2	2	P=0.49
	Platino+Pemetrexed	8	4	
TS	POS	4	4	P=0.42
	Neg	6	3	
ERCC1	POS	3	2	P=0.40
	Neg	7	5	

Tab. 3. Valori di P calcolati con test esatto di Fisher

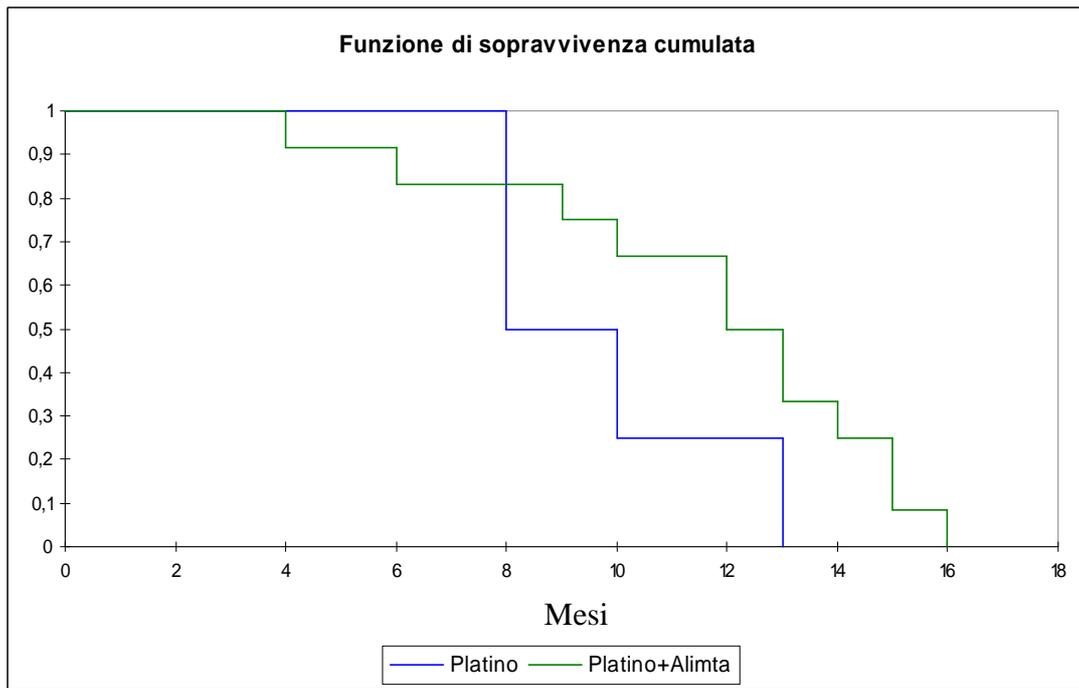


Fig.6. Curve di sopravvivenza Kaplan-Meier, confronto tra trattamento Platino e Platino+Alimta

Espressione proteica della TS

L'analisi immunoistochimica dell'enzima TS è stata effettuata su sezioni di 5µm di spessore ottenute dai preparati istologici chirurgici o biotici dei 17 pazienti in esame.

La positività anticorpale è stata valutata sia a livello nucleare che citoplasmatico.

Il valore di H-score è stato ottenuto moltiplicando l'intensità della colorazione (+1,+2,+3) e la percentuale di cellule positive come indicato in letteratura (Olaussen et al., 2006).

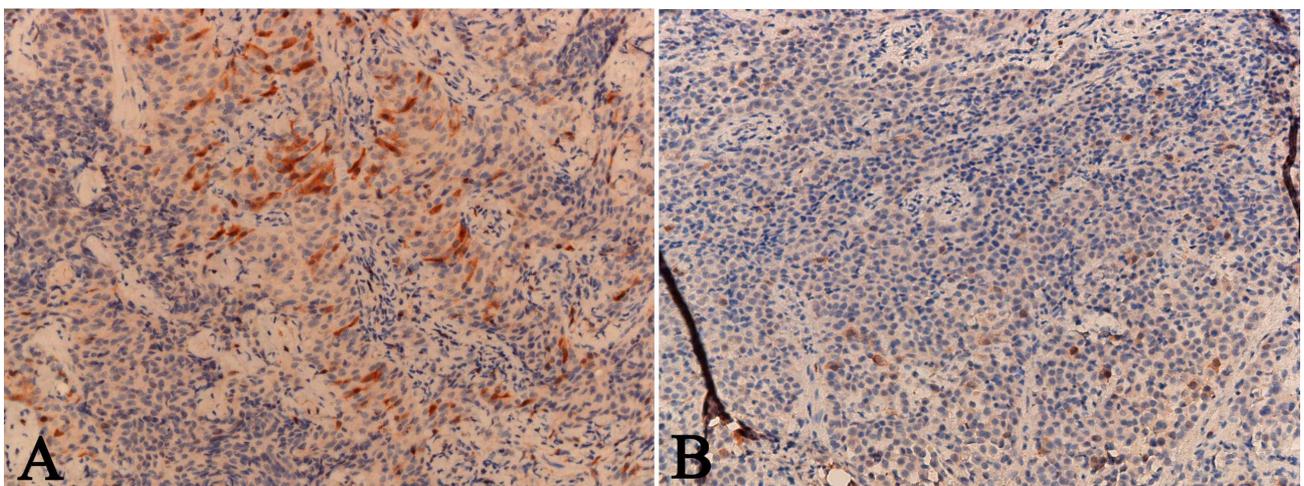


Fig.7. Reazione immunoistochimica con anticorpo anti-TS.

A) alti livelli di TS, H-score > 0,3; B) bassi livelli di TS, H-score ≤ 0,3. Ingrandimento 200X.

In base ai valori di H-score ottenuti è stato deciso di usare il valore di mediana come cut-off di positività a seconda del quale la popolazione è stata categorizzata (mediana=0,3; valori $\leq 0,3$ classificati come negativi, valori $>0,3$ classificati come positivi). Otto pazienti su 17 hanno mostrato una alta espressione di TS (8/17 – 47%) mentre 9 sono risultati negativi (9/17 – 53%), non è stata evidenziata nessuna correlazione statistica tra espressione di TS e morte del paziente ($P=0,42$) (Tabella 3). Ugualmente l'analisi con curve di sopravvivenza non ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra pazienti con alti livelli di TS e pazienti con bassi livelli di espressione della proteina, anche ai limiti della significatività (LogRank $P=0,06$) (Figura 8).

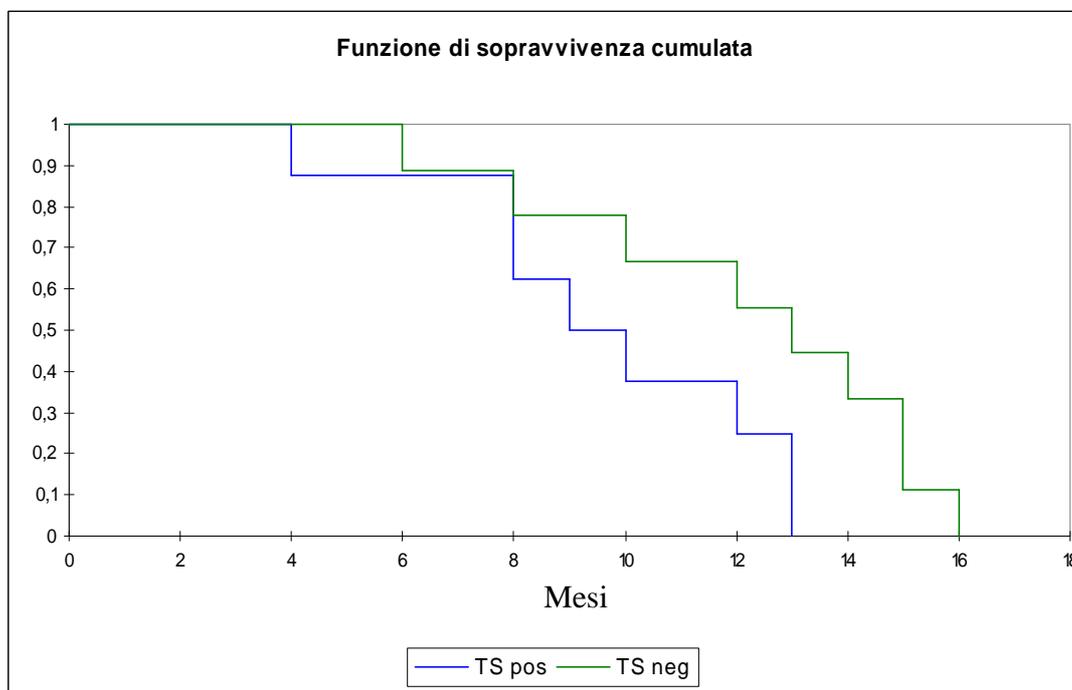


Fig.8. Analisi curve di sopravvivenza Kaplan-Meier pazienti con alti valori di TS vs pazienti con bassi valori

Espressione genica di ERCC1

L'espressione dell'mRNA dell'enzima ERCC1 è stata valutata sui 17 casi in esame mediante real-time PCR. Il valore di cut-off è stato ottenuto facendo la media dei valori di Relative Quantification (0,68).

In base al valore di cut-off la popolazione è stata suddivisa in: pazienti con alta espressione di ERCC1 e pazienti con bassa espressione; 5 pazienti su 17 mostravano una alta espressione di mRNA (5/17 – 29%), mentre i rimanenti 12 avevano bassi valori di ERCC1 (12/17 – 71%). L'analisi statistica con test esatto di Fisher non ha mostrato correlazione tra espressione di ERCC1 e

morte dei pazienti ($P=0,4$) (Tabella 3), confermata anche dall'analisi di sopravvivenza con Log-rank test ($P=0,41$) (Figura 9).

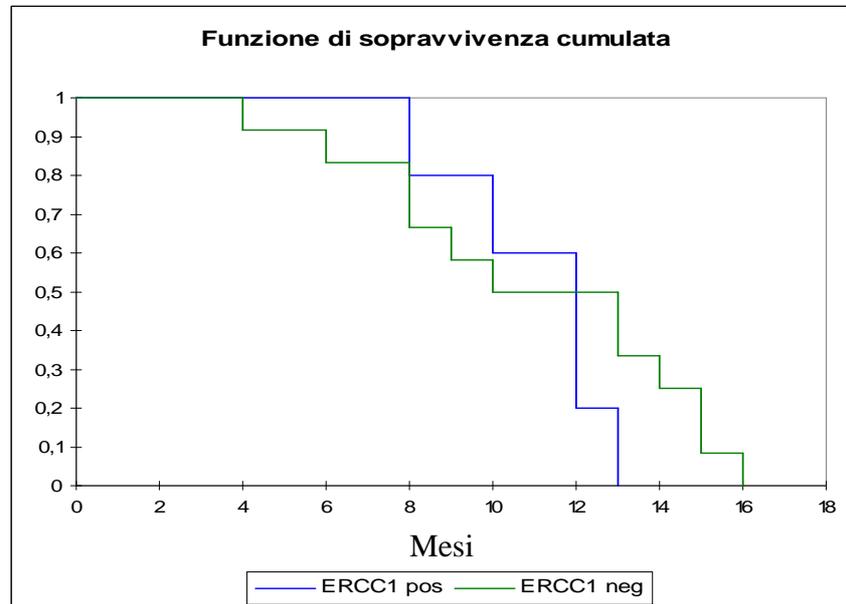


Fig.9. Analisi curve di sopravvivenza Kaplan-Meier valori di espressione dell' mRNA ERCC1

Analisi dello stato mutazionale del gene EGFR.

L'analisi mutazionale di EGFR è stata condotta mediante Real Time PCR con metodica Scorpions; i campioni sono stati riuniti a coppie sfruttando la sensibilità del saggio di visualizzare 1 cellula mutata su uno sfondo di 100 cellule normali.

Dei 17 casi analizzati, nessuno presenta mutazioni (tra le 7 riscontrabili utilizzando il kit Therascreen) (Tabella 4).

L'analisi della delezione T790M, non prevista tra le mutazioni ricercate dal kit, è attualmente in corso mediante sequenziamento diretto.

Analisi dello stato mutazionale del gene PI3K.

L'analisi di sequenziamento diretto degli esoni 9 e 20 del gene codificante per la subunità catalitica della PI3K, ha mostrato assenza di mutazioni in 16 casi su 17 analizzati (16/17 – 94%), mentre 1 su 17 (6%) è risultato non valutabile a causa della probabile frammentazione del materiale genomico (Tabella 4).

N. paziente	Sesso	Età alla diagnosi	Stato EGFR	Stato PI3KCA
1	F	91	WT	WT
2	F	77	WT	WT
3	M	76	WT	WT
4	M	79	WT	WT
5	M	73	WT	WT
6	M	71	WT	WT
7	M	73	WT	WT
8	M	53	WT	WT
9	M	66	WT	WT
10	F	77	WT	WT
11	M	77	WT	WT
12	M	76	WT	WT
13	M	71	WT	WT
14	F	85	WT	WT
15	M	82	WT	WT
16	M	67	WT	NV
17	M	52	WT	WT

Tab. 4. Stato mutazionale del gene EGFR e PI3KCA

DISCUSSIONE

Il mesotelioma pleurico maligno è una patologia relativamente rara, con una incidenza di circa 2000-3000 nuovi casi l'anno, decisamente più bassa rispetto al tumore al polmone (160.000 nuovi casi l'anno) (Yang H et al. 2008); tuttavia l'incidenza di insorgenza di questa patologia tende ad aumentare in quelle regioni dove si svolgono attività lavorative legate all'amianto. Nella regione Piemonte, la zona di Casale Monferrato è maggiormente colpita da MPM a causa dell'alta lavorazione dell'asbesto negli anni '90, con una incidenza di 56,9 casi su 100.000 abitanti per gli uomini e di 33 su 100.000 per le donne, che risulta notevolmente elevata se paragonata all'incidenza nella popolazione italiana di 2 casi su 100.000 abitanti (Centro di Riferimento per l'Epidemiologia e la Prevenzione Oncologica in Piemonte), inoltre l'insorgenza della neoplasia è prevista aumentare nella prossima decade (Peto J. Et al.). Il MPM rappresenta quindi una patologia estremamente attuale su cui bisogna indagare per comprenderne i meccanismi molecolari di cui fin'ora si conosce poco.

Negli ultimi anni diversi lavori si sono focalizzati sulla caratterizzazione molecolare dei tumori, principalmente di origine epiteliale, per determinare la suscettibilità di un paziente di accedere a trattamento farmacologico con farmaci molecolari. Sono stati analizzati i geni EGFR, KRAS, BRAF, PI3K, PTEN, AKT, in svariate tipologie tumorali quali: il cancro del colon-retto, cancro alla mammella, tumore al polmone non a piccole cellule, evidenziando mutazioni o overespressione proteica in grado di indicare la resistenza o meno ai farmaci indirizzati a bloccare il recettore EGFR (Shigematsu et al., 2005; Frattini et al., 2007; Benvenuti et al., 2007). Un ulteriore trattamento terapeutico prevedere l'utilizzo di farmaci in grado di agire direttamente a livello del DNA, o creando addotti (farmaci a base di platino) o inibendone la sintesi (farmaci inibitori del ciclo dei folati).

La cura del MPM attualmente prevede l'impiego di quest'ultima categoria di farmaci, in particolare il platino e il pemetrexed. Per questo motivo negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi lavori scientifici in cui è stata valutata l'espressione, sia proteica che di mRNA, delle proteine cardine coinvolte nella rimozione degli addotti di platino e nella sintesi *ex novo* del DNA, su cui agisce il pemetrexed.

Righi et al., in uno studio retrospettivo, hanno osservato che pazienti che presentano bassi livelli di espressione di TS hanno una sopravvivenza maggiore quando trattati con terapia a base di pemetrexed rispetto ai pazienti con un alti livelli di TS. Non è stata invece evidenziata una correlazione tra i livelli di mRNA e proteici di ERCC1 e l'overall survival quando trattati con platino (Righi et al., 2010).

Analogamente Zucali et al., hanno analizzato i valori di espressione proteica di TS mediante immunohistochimica in associazione alla risposta alla terapia con pemetrexed, osservando che bassi valori dell'enzima risultano in un migliore outcome in pazienti trattati con lo stesso farmaco, proponendo un potenziale ruolo predittivo e/o prognostico di TS come biomarker nei pazienti affetti da MPM (Zucali et al., 2011).

Nel 2005 e nel 2007 sono stati condotti due distinti trials clinici per valutare l'utilizzo di farmaci inibenti il dominio tirosin chinasi di EGFR. Nel primo è stato somministrato Gefitinib a 43 pazienti con MPM, mentre nel secondo trial i 63 pazienti arruolati sono stati trattati con Erlotinib. In entrambi i casi gli autori hanno concluso che il trattamento utilizzato non sembra essere efficace nella cura del MPM, suggerendo quindi la presenza di meccanismi molecolari di resistenza ai farmaci anti-EGFR a valle del recettore (Govindan et al., 2005; Garland et al., 2007). In seguito a queste osservazioni, diversi studi sono stati condotti per valutare lo stato mutazionale di EGFR e delle proteine a valle nella cascata di segnale, quali KRAS, BRAF e PI3K nei MPM, senza evidenziare mutazioni in nessuno di questi geni (Cortese et al., 2006; Destro et al., 2006; Okuda et al., 2008; Metcalf et al., 1992; Kitamura et al., 2002; Dote et al., 2004; Suzuki et al., 2009).

Nonostante i numerosi lavori citati, la casistica dei pazienti analizzati risulta sempre limitata per poter affermare con certezza i risultati ottenuti.

Il presente lavoro si propone quindi di raccogliere un ampio numero di pazienti affetti da MPM afferenti presso la Chirurgia Toracica dell'Ospedale "Maggiore della Carità" di Novara, sottoposti a biopsia pleurica o chirurgia, per indagare l'assetto molecolare della patologia al fine di individuare delle possibili mutazioni utili a scopo terapeutico.

I dati preliminari ottenuti in questa prima fase dello studio sono stati inizialmente condotti su una casistica limitata, e ovviamente non permettono di trarre conclusioni di carattere generale, anche in relazione alla scarsa significatività statistica degli stessi.

Tuttavia sembrano emergere i seguenti orientamenti a conferma di quanto riportato attualmente in letteratura:

- La mutazione del gene EGFR, a differenza di quanto rilevato nei tumori NSCLC, non sembra un evento critico nel processo di cancerogenesi dei mesoteliomi epiteliomorfi; infatti in nessuno dei 17 casi fin'ora esaminati, sono state osservate mutazioni pur utilizzando una metodica ad alta sensibilità come la Real-time PCR con metodica Scorpions®. Questo dato conferma quanto riportato in letteratura su studi che utilizzano prevalentemente metodiche a bassa sensibilità (sequenziamento diretto).

- L'analisi mutazionale dei geni siti a valle di EGFR è stata condotta, per ora, solo per PI3KCA, e non ha evidenziato specifiche mutazioni. Sono in corso valutazioni analoghe di RAS, BRAF, mTOR, PTEN.
- Non risultano correlazioni statisticamente significative tra il dato di sopravvivenza grezza e l'espressione proteica e del mRNA di ERCC1.
- Considerazione a parte merita il dato riguardante l'espressione proteica di TS: anche in questo caso non si sono rilevate correlazioni statisticamente significative tra l'espressione di TS e la sopravvivenza. Tuttavia il valore riscontrato ($p=0,06$) suggerisce che tale dato potrebbe essere corretto con l'aumento del campionamento, come dimostrato dal recente studio condotto dal gruppo di Zucali su una casistica molto più ampia.

BIBLIOGRAFIA

Ault JG, Cole RW, Jensen CG, Jensen LC, Bachert LA, Rieder CL. *Behavior of crocidolite asbestos during mitosis in living vertebrate lung epithelial cells*. Cancer Res. 1995;55:792-8.

Benvenuti S, Frattini M, Arena S, et al. *PIK3CA cancer mutations display gender and tissue specificity patterns*. Hum Mutat. 2008;29:284-8

Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. *Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies*. Cancer Res 2007;67:2643-8.

Besson A, Robbins SM, Yong VW. *PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis*. Eur J Biochem. 1999;263:605-11.

Boutin C, Schlessler M, Frenay C, Astoul P. *Malignant pleural mesothelioma*. Eur Respir J. 1998;12:972–81.

Chirieac LR, Corson JM. *Pathologic evaluation of malignant pleural mesothelioma*. Semin Thorac Cardiovasc Surg. 2009;21:121–4.

Ciardiello F, Tortora G. *EGFR antagonists in cancer treatment*. N Engl J Med. 2008;358:1160-74.

Cohen S, Ushiro H, Stoscheck C, Chinkers M. *A native 170,000 epidermal growth factor receptor-kinase complex from shed plasma membrane vesicles*. J Biol Chem. 1982;257:1523-31

Cortese JF, Gowda AL, Wali A, Eliason JF, Pass HI, Everson RB. *Common EGFR mutations conferring sensitivity to gefitinib in lung adenocarcinoma are not prevalent in human malignant mesothelioma*. Int J Cancer. 2006;118:521-2.

Cunningham D. *Cetuximab (Erbix) – an emerging targeted therapy for epidermal growth factor receptor*. Int J Clin Pract 2004;58:970-6.

Destro A, Ceresoli GL, Falleni M, et al. *EGFR overexpression in malignant pleural mesothelioma. An immunohistochemical and molecular study with clinico-pathological correlations.* Lung Cancer 2006;51:207–15.

Di Cristofano A, Pandolfi PP *The multiple roles of PTEN in tumor suppression.* Cell. 2000;100:387-90.

De Roock W, Claes B, Bernasconi D et al. *Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis.* Lancet Oncol. 2010;11:753-62.

Di Nicolantonio, Arena S, Tabernero J et al. *Deregulation of the PI3K and KRAS signaling pathways in human cancer cells determines their response to everolimus.* Clin Invest. 2010;120:2858-66

Dip R, Camenisch U, Naegeli H. *Mechanisms of DNA damage recognition and strand discrimination in human nucleotide excision repair.* DNA Repair 2004;3:1409–23.

Dote H, Tsukuda K, Toyooka S, Yano M, Pass HI, Shimizu N. *Mutation analysis of the BRAF codon 599 in malignant pleural mesothelioma by enriched PCRRFLP.* Oncol Rep 2004;11:361–3.

Frattini M, Saletti P, Romagnani E, et al. *PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients.* Br J Cancer 2007;97:1139-45.

Garcia-Carbonero R, Paz-Ares L. *Systemic chemotherapy in the management of malignant peritoneal mesothelioma.* EJSO 2006;32:676-81.

Garland LL, Rankin C, Gandara DR, et al. *Phase II study of erlotinib in patients with malignant pleural mesothelioma: a Southwest Oncology Group Study.* J Clin Oncol 2007;25:2406–13.

Goldman ID, Zhao R: *Molecular, biochemical, and cellular pharmacology of pemetrexed.* Semin Oncol 2002;29:3-17.

Gordon W Jr, Antman KH, Greenberger JS et al. *Radiation therapy in the management of patients with mesothelioma*. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1982;8:19-25.

Govindan R, Kratzke RA, Herndon 2nd JE, et al. *Gefitinib in patients with malignant mesothelioma: a phase II study by the Cancer and Leukemia Group B*. Clin Cancer Res 2005;11:2300–4.

Harichand-Herdt S. and Ramalingam SS. *Targeted therapy for the treatment of Non-Small Cell Lung Cancer: focus on inhibition of Epidermal Growth Factor Receptor*. Semin Thorac Cardiovasc Surg 2008;20:217-23.

Kamp DW, Israbian VA, Preusen SE, Zhang CX, Weitzman SA. *Asbestos causes DNA strand breaks in cultured pulmonary epithelial cells: role of iron-catalyzed free radicals*. Am J Physiol. 1995;268:471-80.

Kitamura F, Araki S, Suzuki Y, Yokoyama K, Tanigawa T, Iwasaki R. *Assessment of the mutations of p53 suppressor gene and Ha- and Ki-ras oncogenes in malignant mesothelioma in relation to asbestos exposure: a study of 12 American patients*. Ind Health 2002;40:175–81.

Kosaka, T. et al. *Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications*. Cancer Res 2004;64:8919–23.

Krause, D. S. & Van Etten, R. A. *Tyrosine kinases as targets for cancer therapy*. N. Engl. J. Med. 2005;353:172–87.

Lord R., Brabender J., Gandara D., et al. *Low ERCC1 expression correlates with prolonged survival after cisplatin plus gemcitabine chemotherapy in NSCLC*. 2002; 8:2286-91

Metcalf RA, Welsh JA, Bennett WP, et al. *P53 and Kirsten-ras mutations in human mesothelioma cell lines*. Cancer Res 1992;52:2610–5.

Mita MM, Mita A, Rowinsky EK. *The molecular target of rapamycin (mTOR) as a therapeutic target against cancer*. Cancer Biol Ther. 2003;2:S169-77.

Okuda K, Sasaki H, Kawano O, et al. *Epidermal growth factor receptor gene mutation, amplification and protein expression in malignant pleural mesothelioma*. J Cancer Res Clin Oncol. 2008;134:1105-11.

Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, et al.; IALT Bio Investigators. *DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy*. N Engl J Med. 2006;355:983-91

Paez JG, Jänne PA, Lee JC, et al. *EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy*. Science. 2004;304:1497-500.

Pass HI. *Malignant pleural mesothelioma: surgical roles and novel therapies*. Clin Lung Cancer. 2001;3:102-17.

Peto J, Decarli A, La Vecchia C, Levi F, Negri E. *The European mesothelioma epidemic*. Br J Cancer. 1999;79:666-72.

Rena O, Boldorini LR, Gaudino E, Casadio C. *Epidermal growth factor receptor overexpression in malignant pleural mesothelioma: Prognostic correlations*. J Surg Oncol. 2011 (in stampa).

Rice D. *Surgical therapy of mesothelioma*. Recent Results Cancer Res. 2011;189:97-125.

Righi L, Papotti MG, Ceppi P, et al. *Thymidylate synthase but not excision repair cross-complementation group 1 tumor expression predicts outcome in patients with malignant pleural mesothelioma treated with pemetrexed-based chemotherapy*. J Clin Oncol. 2010;28:1534-9.

Robinson BW, Lake RA. *Advances in malignant mesothelioma*. N Engl J Med. 2005;353:1591-603

Rusch V, Saltz L, Venkatraman E, et al. *A phase II trial of pleurectomy/decortication followed by intrapleural and systemic chemotherapy for malignant pleural mesothelioma*. J Clin Oncol. 1994;12:1156-63.

Rusch VW. *Pemetrexed and cisplatin for malignant pleural mesothelioma: a new standard of care?* J Clin Oncol. 2003;21:2629-30.

Rusch VW. *A proposed new international TNM staging system for malignant pleural mesothelioma: from the International Mesothelioma Interest Group*. Chest 1995;108:1122-28.

Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. *High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers*. Science. 2004;304:554.

Sharma SV, Bell DW, Settleman J, Haber DA. *Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer*. Nat Rev Cancer. 2007;7:169-81.

Shigematsu, H. et al. *Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers*. J. Natl Cancer Inst. 2005;97:339-46

Shih C, Chen VJ, Gossett LS, et al. *LY231514, a pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-based antifolate that inhibits multiple folate-requiring enzymes*. Cancer Res. 1997;57:1116-23.

Strickler HD, Goedert JJ, Fleming M, et al. *Simian virus 40 and pleural mesothelioma in humans*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1996;5:473-5.

Yutaro Suzuki, Hideki Murakami, Koji Kawaguchi, et al. *Activation of the PI3KAKT pathway in human malignant mesothelioma cells*. Mol Med Rep 2009;2:181-8.

Tilleman TR, Richards WG, Zellos L, et al. *Extrapleural pneumonectomy followed by intracavitary intraoperative hyperthermic cisplatin with pharmacologic cytoprotection for treatment of malignant pleural mesothelioma: a phase II prospective study*. J Thorac Cardiovasc Surg. 2009;138:405-11.

Vecchione L, Jacobs B, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. *EGFR-targeted therapy*. Exp Cell Res. 2011 (in stampa).

Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, et al. *Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma*. J Clin Oncol. 2003;21:2636-44.

Yang H, Testa JR, Carbone M. *Mesothelioma epidemiology, carcinogenesis, and pathogenesis*. Curr Treat Options Oncol. 2008;9:147-57.

Zheng Z, Chen T, Li X, Haura E, Sharma A, Bepler G. *DNA synthesis and repair genes RRM1 and ERCC1 in lung cancer.* N Engl J Med. 2007;356:800-8.

Zucali PA, Giovannetti E, Destro A, et al. *Thymidylate synthase and excision repair cross-complementing group-1 as predictors of responsiveness in mesothelioma patients treated with pemetrexed/carboplatin.* Clin Cancer Res. 2011;17:2581-90.

Attività Formativa

Seminari

- *Le cellule NK: dalla biologia alla terapia di leucemie ad alto rischio.* Novara, 29 novembre 2010 Lorenzo Moretta
- *Linfomi cutanei primitivi.* Novara, 2 Marzo 2011, Emilio Berti
- *Ferritins: ancient proteins with novel unexpected features.* Novara, 12 Aprile 2011, Sonia Levi
- *Liver fibrosis in children affected by NASH: how to investigate that.* Novara, 29 Aprile 2011, Valerio Nobili
- *Innate immunity and the pathogeneticity of inhaled microbial particles.* Novara, 9 Maggio 2011, Henrick Wolff
- *Farmacologia dell'aterosclerosi,* Novara, 13 maggio 2011, Alberto Corsin
- *Molecular pathogenesis and biomarkers of Parkinson's disease.* Novara, 17 giugno 2011, Mauro Fasano
- *Frontotemporal dementia: trying to solve a complex disorder.* Novara, 24 Giugno 2011, Jonathan D. Rohrer
- *Hypoxia, angiogenesis, and liver fibrogenesis.* Novara, 1 luglio 2011, Maurizio Parola

Corsi

- **Introduzione alle malattie degenerative sistemiche (modulo I).** Novara, 4-11-18 Marzo 2011, Prof. Emanuele Albano
- **Introduzione alle malattie neurodegenerative (modulo II):**
 - Sclerosi laterale amiotrofica, Novara, 25 Marzo 2011, Prof.ssa Lucia Corrado
 - Malattia di Parkinson and Alzheimer, Novara, 1 Aprile 2011, Prof. Cristofori Comi
- **Journal Club,** Novara
- **Corso per lavoratori di nuovo inserimento, ai sensi dell'art. 37 del D. LGS. 81/08,** Novara, 12-13 Aprile 2011.

Congressi

- **Giornate Anatomico-Patologiche Gallaratesi, III edizione.** Gallarate, 07-08 Aprile 2011
- **Corso Nazionale Aiom-Siapec: Modulo di determinazione delle mutazioni di EGFR nel NSCLC; Determinazione delle mutazioni di KRAS nel carcinoma del Colon-Retto.**
Milano, Istituto Europeo Oncologico, 14 Aprile 2011