

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



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

Relazione 2° 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).

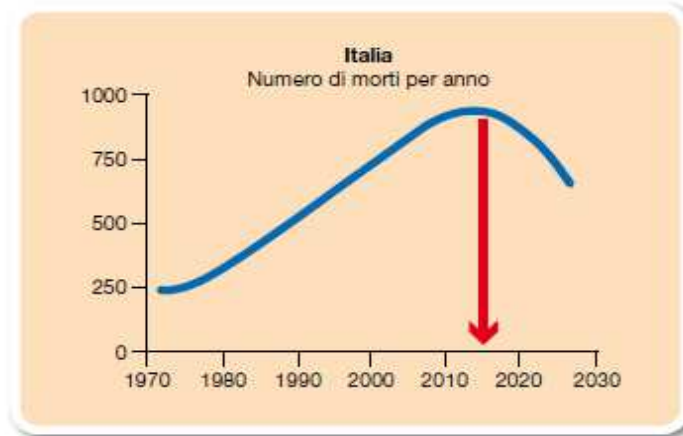


Fig.1. Casi su un milione di abitanti in Italia.

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).

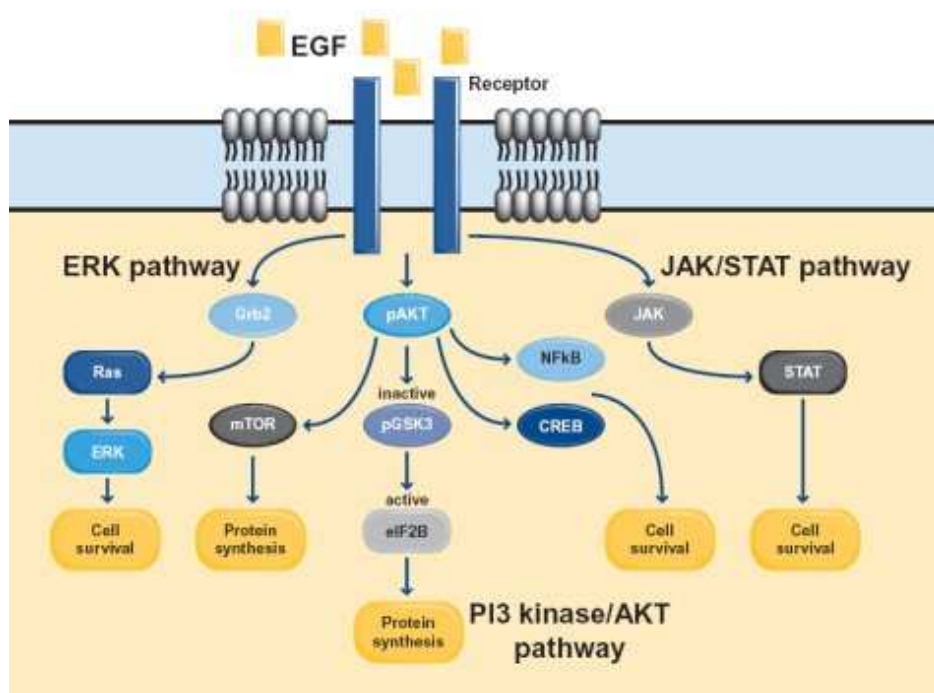


Fig. 2. Vie di trasduzione attivate da EGFR in seguito al legame con un ligando EGF

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).

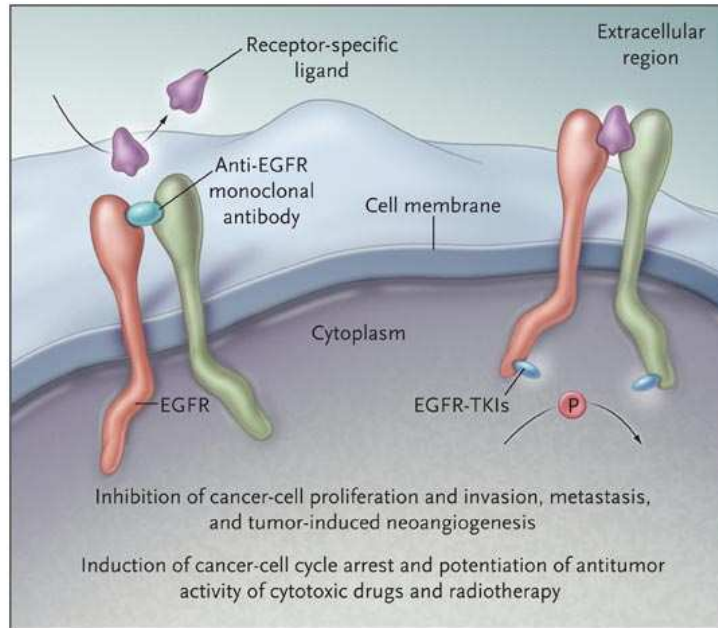


Fig. 3 .Farmaci Inibitori di EGFR

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.

v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS)

Il gene KRAS codifica per una proteina G monometrica appartenente alla superfamiglia delle GTPasi. La proteina K-ras è coinvolta nella trasmissione del segnale a valle dei recettori RTK e nell'attivazione di meccanismi biologici fondamentali come la proliferazione, la crescita e il differenziamento cellulare.

In seguito al legame del fattore di crescita con il recettore tirosin-chinasico la proteina Grb si lega a Sos determinando la fosforilazione del GDP legato a K-ras in GTP. K-ras legato a GTP attiva la cascata molecolare a valle.

Il gene KRAS è localizzato sul braccio corto del cromosoma 12. Le mutazioni nel gene KRAS interessano il codone 12 e 13 dell'esone 2 e sono per la maggior parte puntiformi. Meno frequentemente si osservano mutazioni anche nel codone 61. Tali mutazioni sono responsabili dell'attivazione costitutiva della proteina K-ras e della via da questa mediata non più dipendente dal

legame con EGFR-ligando, determinando quindi resistenza al trattamento con anticorpi anti-EGFR.59 tesi graglia (Lievre A JCO 2008)

v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF)

Il gene BRAF codifica per una proteina appartenente alla famiglia delle raf/mil serina-treonina chinasi ed è localizzato sul cromosoma 7q34.

La proteina B-raf rappresenta un elemento chiave nella trasduzione del segnale della via delle MAPK ed è coinvolta nella regolazione della crescita, divisione e differenziamento cellulare.

B-raf risulta fortemente deregolata in molti tumori umani. Il principale meccanismo di deregolazione è rappresentato dall'insorgenza di mutazioni puntiformi, in particolare negli esoni 11 e 15, codificanti per il dominio tirosin chinasi, con una posizione predominante nel nucleotide 1799, dove si verifica la sostituzione di una timina con un'adenina con conseguente cambio amminoacidico valina-glutammato a livello del codone 600 (V600E). La presenza della mutazione V600E causa l'inserimento di una carica negativa in prossimità dei residui 599 e 602, mimando in tal modo la fosforilazione costitutiva (Davies H. et al., 2002). La frequenza della mutazioni nella sequenza genica di BRAF varia a seconda del tipo di tumore: mutazioni di BRAF sono state riscontrate in circa il 10% dei carcinomi del colon retto e nell'80% dei melanomi. (Tan YH et al. 2008). La proteina B-raf rappresenta il bersaglio di alcuni farmaci ad azione molecolare come il Vemurafenib, attualmente utilizzato nel trattamento dei melanomi late stage.

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 e quindi della via di trasduzione del segnale a valle di PI3K, 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 et al., 2004; Di Nicolantonio et al., 2010).

ERCC1 e TS

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 (ERCC1)

L'enzima ERCC1 appartiene al complesso NER (nucleotide excision repair complex), il suo gene localizza sul cromosoma 19q1.3. 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).

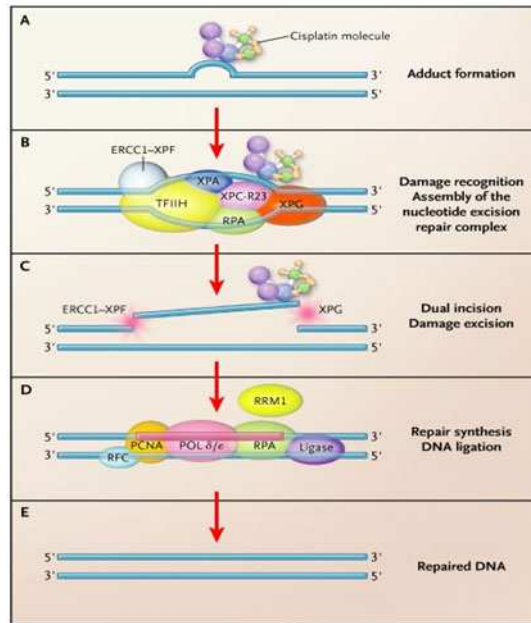


Fig. 4. Complesso NER e riparazione del danno al DNA indotto dal cisplatino.

Timidilato sintetasi (TS)

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 desossiridina 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).

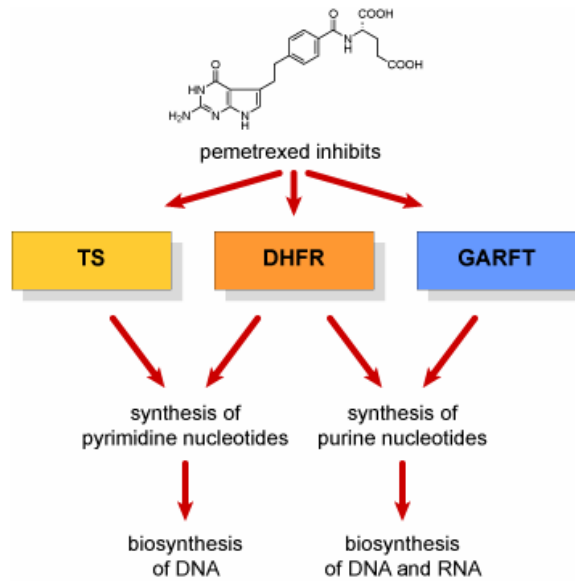


Fig.5. Bersagli molecolari del pemetrexed.

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 proteica e 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 questi due anni di dottorato è stato condotto uno studio di tipo retrospettivo su 77 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 Giugno 2012 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 77 pazienti attualmente esaminati 20 sono donne (23,5%) e 57 uomini (76,5%), età media 68 (range 34-82).

Dei 77 pazienti analizzati 17 sono stati trattati con terapia a base di Platino (23%), 37 con Platino associato a pemetrexed (46%), 2 solo con pemetrexed (2%), un paziente è stato sottoposto a trattamento chemioterapico non meglio specificato, 3 pazienti hanno ricevuto platino associato a radioterapia (5%) e 17 pazienti non sono stati sottoposti a terapia (23%).

In 59 di 77 casi l'istotipo è epitelioide (77%), 8 casi sono sarcomatosi (10%) e 10 bifasici (13%).
Dei 77 pazienti esaminati 50 presentano una storia documentata di esposizione all'asbesto.

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/μL.

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	} per 40 cicli
DENATURAZIONE: 95°C per 30 sec	
APPAIAMENTO ED ESTENSIONE: 61°C per 60 sec	

Sequenziamento diretto.

Per la valutazione dello stato mutazionale dei geni *PI3KCA* di *BRAF* e *EGFR*, 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.

PI3KCA

Le mutazioni nel gene *PI3KCA*, codificante la subunità catalitica dell'enzima *PI3K*, avvengono principalmente negli esoni 9 e 20 e sono correlate con lo sviluppo tumorigenico.

Al fine di amplificare gli esoni 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
ESTENSIONE: 72°C per 30 sec } per 40 cicli

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 PI3KCAex9 (5'-TAGCTAGAGACAATGAATTAAGGGAAA-3') e PI3KCAex20 (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	} per 25 cicli
ANNEALING: 50°C per 5 sec	
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.

EGFR.

In seguito alla ricerca delle mutazioni note nel gene EGFR con metodica Saggio Scorpions-ARMS, le mutazioni non note sono state investigate mediante sequenziamento diretto degli esoni 18 19 20 e 21 del gene.

La reazione di PCR effettuata per amplificare gli esoni di nostro interesse è stata effettuata utilizzando i seguenti primers:

EGFR esone18F: 5'-TCCAGCATGGTGAGGGCTGAG-3'

EGFR esone18R: 5'-GGCTCCCCACCAGACCATG-3'

EGFResone19F: 5'-TGGGCAGCATGTGGCACCATC-3'

EGFResone19R: 5'-AGGTGGGCCTGAGGTTTCAG-3'

EGFResone20F: 5'-CCTCCTTCTGGCCACCATGCG-3'

EGFResone20R: 5'-CATGTGAGGATCCTGGCTCC-3'

EGFResone21F: 5'-CCTCACAGCAGGGTCTTCTC-3'

EGFResone21R: 5'-CCTGGTGTGAGGAAAATGCT-3'

La procedura prevede come per PI3KCA 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:

DENATURAZIONE INIZIALE: 50 C° per 2 minuti, 95 C° per 10 minuti

DENATURAZIONE: 95°C per 40 sec
ANNEALING: 58°C per 40 sec
ESTENSIONE: 72°C per 35 sec

} per 40 cicli

ESTENSIONE FINALE: 72°C per 3 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 (esone 18 242bp; esone 19 217 bp; esone 20 296; esone 21 229bp) 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 (EGFR 18F, 19F, 20F, 21F) 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 INIZIALE

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

} per 25 cicli

I prodotti di reazione vengono sequenziati tramite un sequenziatore automatico a 4 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.

BRAF

Il gene BRAF è stato analizzato nell'esone 15 ed in particolare è stata ricercata la mutazione missenso V600E, che causa un cambio amminoacidico attivante costitutivamente l'enzima.

L'esone 15 è stato amplificato usando i seguenti primer:

BRAF15F: 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3'

BRAF15R: 5'-GGCCAAAAATTTAATCAGTGGA-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:

DENATURAZIONE INZIALE: 95 C° per 10 minuti

DENATURAZIONE: 95°C per 15 sec
ANNEALING: 52°C per 30 sec
ESTENSIONE: 72°C per 30 sec

} per 45 cicli

ESTENSIONE FINALE: 72°C per 3 min

TERMINAZIONE: 4°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 (224 bp) 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 15F e 15R 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
ESTENSIONE: 60°C per 4 min

} per 25 cicli

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.

Mutant Enriched PCR (ME-PCR)

L'analisi mutazionale del gene KRAS è stata condotta a livello dell'esone 2 nei codoni 12 e 13 utilizzando una tecnica mutant enriched PCR, altamente sensibile, in grado di discriminare 1 mutato su uno sfondo di 1000 molecole WT.

Per la determinazione di mutazioni a carico dei codoni 12 e 13 del gene KRAS sono state eseguite due distinte reazioni per ogni codone. La metodica prevede l'amplificazione mediante utilizzo di primer specifici per ogni codone, che presentano una sostituzione nucleotidica sul primer senso a monte del codone. Tale sostituzione nucleotidica determina la creazione di un sito di restrizione a cavallo del codone, che verrà riconosciuto e tagliato da uno specifico enzima di restrizione, rendendo il prodotto non più amplificabile. Qualora nel codone di interesse fosse presente una mutazione, l'enzima non sarà in grado di riconoscere il sito di restrizione e non effettuerà la digestione enzimatica, lasciando integro il frammento per la successiva reazione di PCR.

Il DNA precedentemente concentrato a 25 ng/uL è stato amplificato mediante una prima reazione di PCR (PCR esterna) per amplificare il codone 12, utilizzando le seguenti concentrazioni in un volume finale di reazione di 50 uL: PCR buffer 1X (Qiagen, Manchester, UK), MgCl₂ 1,5 mM (Qiagen, Manchester, UK), dNTPs 0,08 mM (Promega, Madison, USA), primers 0,1 mM ciascuno, Taq Polimerasi 2 U/uL (Qiagen, Manchester, UK). Alla miscela di reazione sono stati aggiunti 2 uL di DNA. L'amplificazione del codone 12 è stata condotta utilizzando i primers 3F e 10B. Una seconda PCR esterna è stata condotta in parallelo per amplificare il codone 13, utilizzando lo stesso protocollo sopradescritto ma con primers differenti: 9F e 10B.

Per la reazione di sequenza viene utilizzato il termociclatore Eppendorf (Amburgo, Germania) con le seguenti condizioni:

DENATURAZIONE INIZIALE: 95°C per 10 minuti

DENATURAZIONE: 95°C per 30 sec

ANNEALING: 50°C per 1 min cod 12/ 54°C per 1 min cod13

ESTENSIONE: 72°C per 1 min

ESTENSIONE FINALE: 72°C per 3 min

} per 20 cicli

Terminata la reazione di PCR, il prodotto amplificato viene posto in frigorifero a 4°C.

Per evitare la presenza di contaminazioni durante l'esecuzione della PCR e per valutarne l'effettiva riuscita, vengono inseriti dei controlli negativi in cui il DNA viene sostituito con acqua sterile DEPC-treated e RNAsi free e due controlli positivi mutati rispettivamente nel codone 12 e nel codone 13.

I prodotti di amplificazione sono stati quindi sottoposti a una prima digestione enzimatica utilizzando specifici enzimi di restrizione: BstnI per il codone 12 che agisce a 60°C (NewEngland BioLabs, Ipswich, MA, USA) e BglI per il codone 13 che agisce a 37°C (Fermentas, Canada). La reazione è stata eseguita in un volume finale di 20 uL con buffer di reazione 1X, enzima 5 U/uL e 15 uL di amplificato. L'incubazione è stata mantenuta over night.

Il prodotto di digestione è stato poi amplificato mediante reazione di PCR interna con le seguenti concentrazioni: PCR buffer 1X, MgCl₂ 1,5 mM, dNTPs 0,2 mM, primers 0,5 uM ciascuno, Taq Polimerasi 2 U/uL, 1 uL di prodotto di digestione. Per amplificare il codone 12 sono stati utilizzati i primers 3F e 14B, mentre per il codone 13 i primers 9F e 4B.

Le condizioni di amplificazione di PCR interna sono uguali per entrambi i codoni:

DENATURAZIONE INIZIALE: 95°C per 10 minuti	}	per 45 cicli
DENATURAZIONE: 95°C per 30 sec		
ANNEALING: 54°C per 1 min		
ESTENSIONE: 72°C per 1 min		
ESTENSIONE FINALE: 72°C per 3 min		

Terminata la reazione di PCR, il prodotto amplificato viene posto in frigorifero a 4°C.

Il prodotto di amplificazione è stato sottoposto a una seconda digestione enzimatica nelle stesse condizioni descritte per la prima digestione.

La visualizzazione del prodotto di amplificazione e di digestione è stata eseguita mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3%, utilizzando Etidio Bromuro (Qiagen, Manchester, UK) come colorante in grado di intercalarsi alle basi nucleotidiche, permettendo di visualizzare il DNA quando sottoposto a raggi ultravioletti. Come controllo per la dimensione delle bande di amplificazione è stato utilizzato il peso molecolare GeneRuler Low range (Fermentas, Canada).

Il prodotto di amplificazione della PCR interna mostrerà una sola banda di circa 143 bp, mentre il prodotto di digestione interna potrà presentare: una banda di 113 bp qualora fosse presente solo DNA wild type, una banda di 143 bp in caso di DNA mutato non digerito, o entrambe le bande nel caso fosse presente sia l'allele WT che quello mutato.

In presenza di mutazione la banda corrispondente è stata quindi purificata mediante kit commerciale (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up kit, Macherey-Nagel, Duren, Germany) il prodotto di PCR interna, per essere poi sottoposto a sequenziamento diretto.

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) risospendendo 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 immunoistochimica della TS 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.

La reazione immunoistochimica di ERCC1 viene eseguita sullo strumento Ventana (Ventana Medical Systems, Tucson, USA) usando l'UltraView DAB kit e un anticorpo monoclonale anti-ERCC1 clone 8F1, dilution 1:50 (ThermoScientific, Erembodegem, Belgium).

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 e ERCC1 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 si 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

1. ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

Sopravvivenza e trattamento

Nel corso del primo anno di studio sono stati analizzati 67 pazienti affetti MPM (48 uomini 72% e 19 donne – 28%), di cui 51 epiteliorfidi (76%), 7 sarcomatoso (10%) e 9 bifasici (14%). Dei 67 pazienti analizzati 16 sono stati trattati con terapia a base di platino (24%), 32 con platino associato a pemetrexed (48%), 2 solo con pemetrexed (3%), 3 pazienti con platino associato a radioterapia (5%), un solo paziente è stato sottoposto a trattamento chemioterapico non meglio specificato, 13 pazienti non sono stati sottoposti a terapia (20%). Dei 67 pazienti presi in esame 54 sono deceduti mentre i restanti 13 sono ancora in vita con una sopravvivenza media, calcolata dalla data di diagnosi della patologia a Giugno 2012, di 14 mesi (minimo 1 - massimo 39).

L'analisi statistica condotta sui soli pazienti trattati, ha mostrato correlazione statistica tra il trattamento con terapia combinata (platino+pemetrexed) e il decesso del paziente ($P < 0.05$) (Tabella 3), tuttavia l'analisi di sopravvivenza con curve di Kaplan-Meier e successiva analisi Log-Rank test non ha mostrato differenza significativa tra i due diversi tipi (altro Vs platino+pemetrexed) di trattamento e la sopravvivenza ($P = 0.07$) seppure al limite della significatività (Figura 6).

		N° pazienti vivi	N° pazienti morti	Fisher's exact test
Trattamento	Altro	3	32	P=0.03
	Platino+Pemetrexed	10	22	
TS	POS	6	22	P=0.76
	Neg	7	32	
ERCC1	POS	6	23	P=1
	Neg	7	31	

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

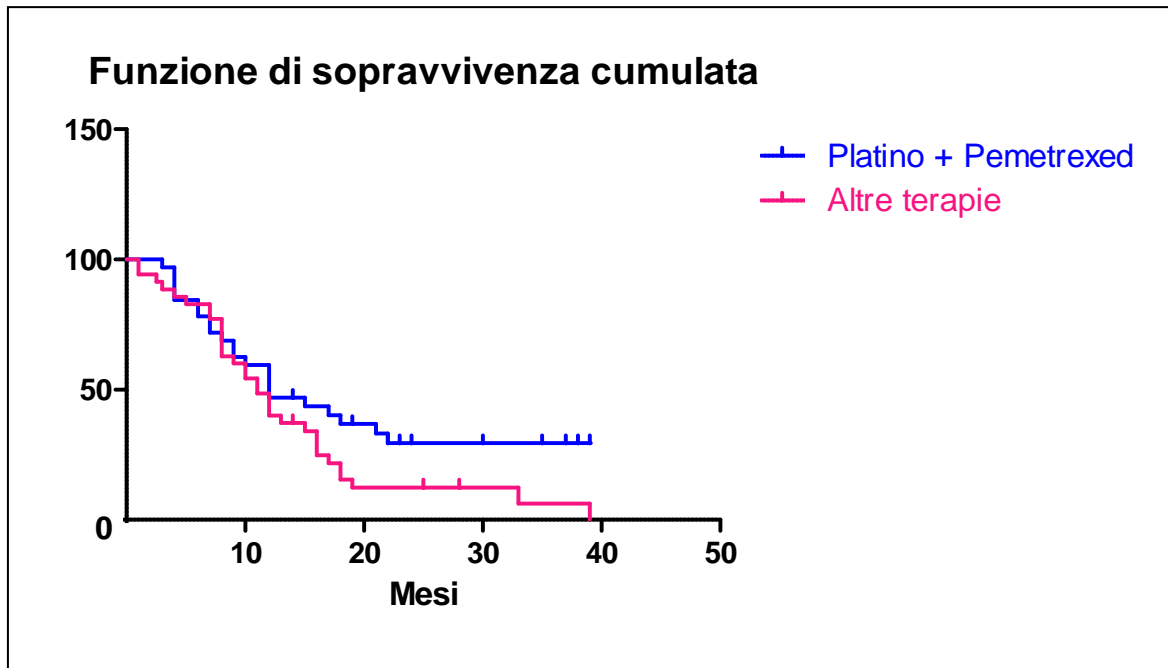


Fig.6. Curve di sopravvivenza Kaplan-Meier, confronto tra trattamento Altre terapie e Platino+Pemetrexed

Espressione proteica della TS

L'analisi immunohistochimica dell'enzima TS è stata effettuata su sezioni di 5 μ m di spessore ottenute dai preparati istologici chirurgici o biotici dei 67 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).

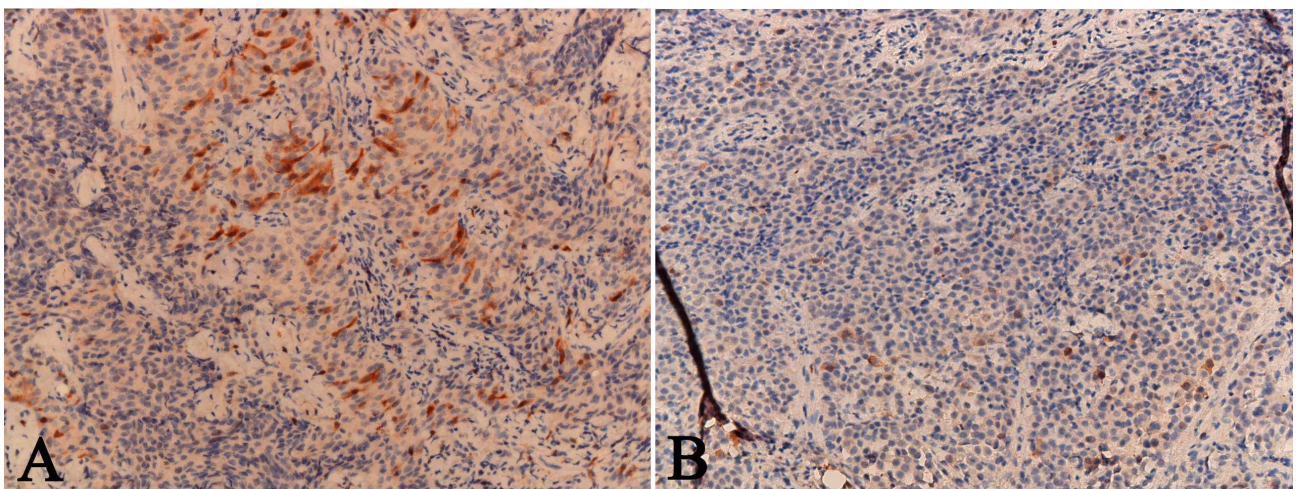


Fig.7. Reazione immunohistochimica con anticorpo anti-TS.

A) alti livelli di TS, H-score > 0,1; B) bassi livelli di TS, H-score \leq 0,1. Ingrandimento 200X.

In base ai valori di H-score ottenuti e dai dati riportati in letteratura, è stato deciso di usare il valore di mediana come cut-off di positività a seconda del quale la popolazione è stata categorizzata (mediana=0,1; valori $\leq 0,1$ classificati come negativi, valori $>0,1$ classificati come positivi). Ventotto pazienti su 67 hanno mostrato una alta espressione di TS (28/67 – 42%) mentre 39 sono risultati negativi (39/67 – 58%), non è stata evidenziata nessuna correlazione statistica tra espressione di TS e morte del paziente ($P=0,76$) (Tabella 3). Ugualmente l'analisi con curve di sopravvivenza su pazienti trattati con pemetrexed (in singolo e in combinazione) non ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra pazienti con alti livelli di TS e pazienti con bassi livelli di espressione della proteina (LogRank $P=0,43$) (Figura 8).

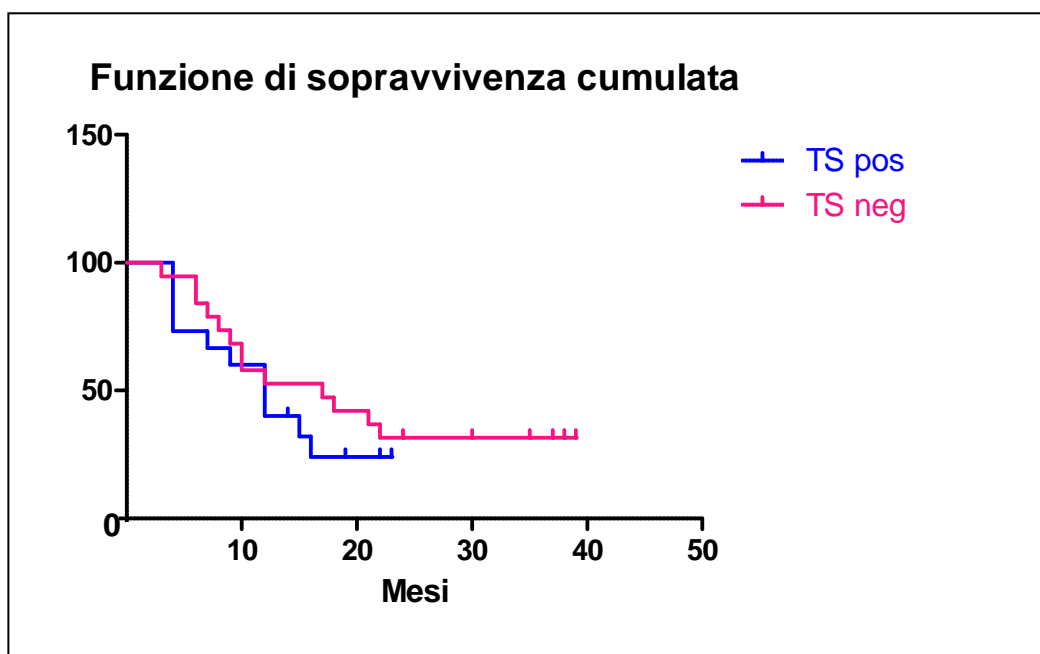


Fig.8. Analisi curve di sopravvivenza Kaplan-Meier: pazienti con alti valori di TS vs pazienti con bassi valori

Espressione proteica di ERCC1

L'analisi immunoistochimica dell'enzima ERCC1 è stata effettuata su sezioni di 5 μ m di spessore ottenute dai preparati istologici chirurgici o biotici dei 67 pazienti in esame.

La positività anticorpale è stata valutata a livello nucleare. È stato ottenuto il valore di H-score secondo i criteri proposti da Olausson et al.

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=2; valori ≤ 2 classificati come negativi, valori >2 classificati come positivi). Ventinove pazienti su 67 hanno mostrato una

alta espressione di TS (29/67 – 43%) mentre 38 sono risultati negativi (38/67 – 57%), non è stata evidenziata nessuna correlazione statistica tra espressione di ERCC1 e morte del paziente ($P=1$) (Tabella 3). Ugualmente l'analisi con curve di sopravvivenza su pazienti trattati con platino (in singolo e in combinazione) non ha mostrato una differenza statisticamente significativa tra pazienti con alti livelli di ERCC1 e pazienti con bassi livelli di espressione della proteina (LogRank $P=0,61$) (Figura 9).

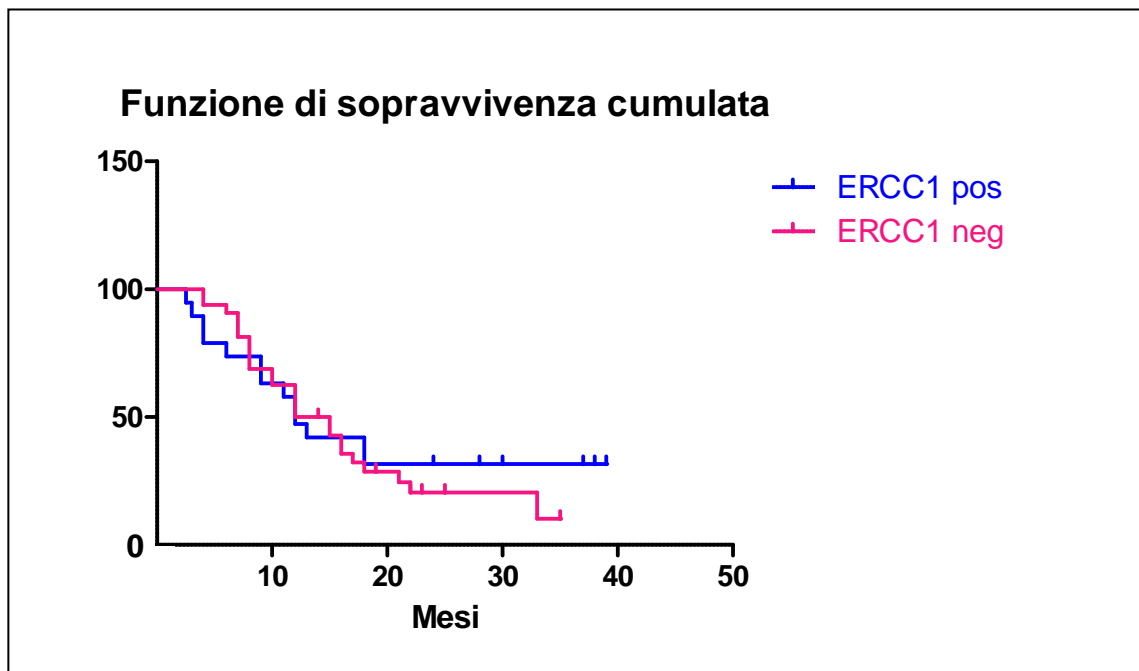


Fig.8. Analisi curve di sopravvivenza Kaplan-Meier : pazienti con alti valori di ERCC1 vs pazienti con bassi valori

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 10).

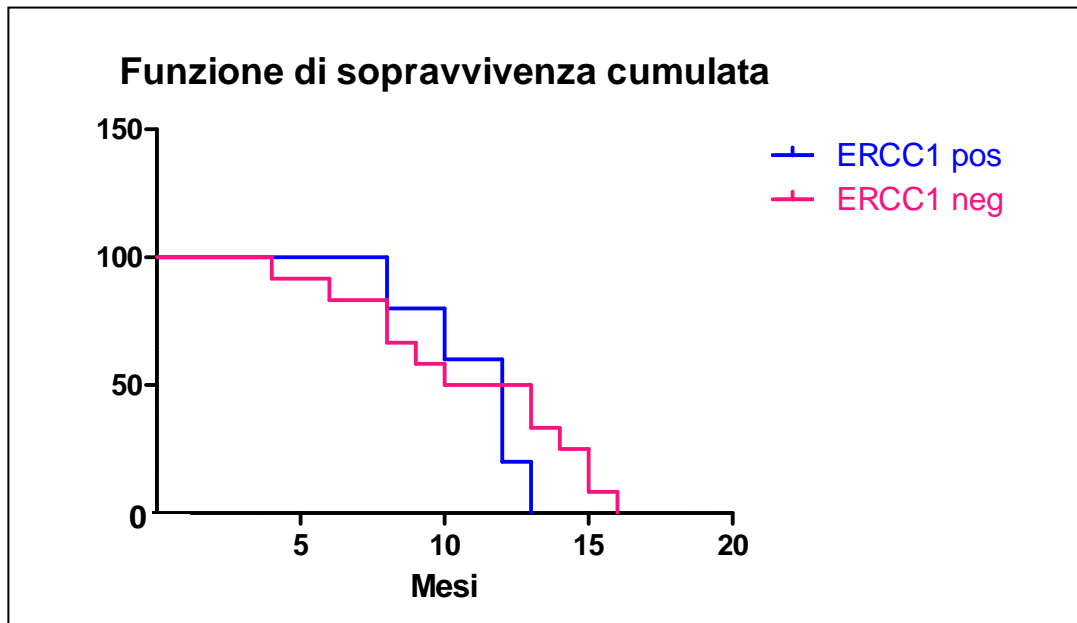


Fig.10. Analisi curve di sopravvivenza Kaplan-Meier valori di espressione dell' mRNA ERCCI

2. ANALISI MUTAZIONALE

Analisi dello stato mutazionale del gene EGFR.

L'analisi mutazionale di EGFR condotta mediante Real-Time PCR con tecnologia DxS Scorpions® ha previsto che i campioni fossero riuniti a coppie sfruttando la sensibilità del saggio di visualizzare 1 cellula mutata su uno sfondo di 100 cellule WT.

Con lo scopo di indagare mutazioni “non note”, è stata effettuata un'analisi di sequenziamento diretto. Dei 77 casi di MPM analizzati, nessuno presenta mutazioni.

Analisi dello stato mutazionale del gene KRAS.

Lo stato mutazionale di KRAS è stato esaminato mediante ME-PCR. Il DNA è stato amplificato con successo in tutti i 77 casi. In 5 casi sono state evidenziate mutazioni di KRAS. In dettaglio, due pazienti presentavano la mutazione puntiforme GGT→GtT nel codone 12, che causa una sostituzione amminoacidica Glicina in Valina (G12V), 2 pazienti presentavano la mutazione puntiforme GGC→GaC nel codone 13 che determina una sostituzione Glicina in Acido Aspartico

(G13D). Un paziente presentava la mutazione GGC→aGC nel codone 13 che causa una sostituzione di Glicina con Serina (G13S). I 5 pazienti con mutazione in KRAS erano tutti asbesto-esposti.

Analisi dello stato mutazionale del gene BRAF.

L'analisi di sequenziamento diretto dell'esone 15 di BRAF ha condotto all'individuazione di 3 casi mutati con mutazione puntiforme nel nucleotide 1799 che porta ad un cambiamento aminoacidico di una Valina in Acido Glutammico in posizione 600 (V600E). I 3 casi mutati si riferiscono a pazienti non esposti ad asbesto.

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 76 casi su 77 analizzati (16/17 – 94%). L'unico caso presentante la mutazione, mostrava una sostituzione aminoacidica nell'esone 20 in posizione 1040 (Metionina in Isoleucina).

Analisi statistica

È stata eseguita l'analisi statistica per confrontare i dati mutazionali con la sopravvivenza dei pazienti mediante curve di Kaplan-Meier, senza tuttavia osservare una correlazione statistica tra la presenza di mutazione e l'OS dei pazienti (P=0.51 - dato non mostrato).

Mediante il test esatto di Fisher è stato condotto un confronto tra presenza di mutazione e le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti, senza evidenziare una significatività statistica (Tabella 4).

Caratteristiche clinico-patologiche	WT	Mutati	P value
<u>Età, media±SD (anni)</u>	66±21	67±12	0.89
<u>Sesso</u>			
Maschi	49/68	8/9	0.432
Femmine	19/68	1/9	
<u>Istotipo</u>			
Epiteliomorfo	51/68	5/9	0.579
Sarcomatoso	10/68	3/9	0.135
Bifasico	7/68	1/9	0.855
<u>Esposizione all'asbesto</u>	44/68	6/9	0.799
<u>Tipo di trattamento</u>			
Nessuno	13/68	1/9	0.623
Platino	19/68	3/9	0.876
Platino+Pemetrexed	36/68	5/9	0.776

Tab. 4. Valori di P calcolati con test esatto di Fisher

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 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 o 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 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.

L'analisi immunohistochimica condotta su una casistica di 67 pazienti per valutare l'espressione proteica delle proteine TS ed ERCC1 non ha mostrato correlazione statistica con la sopravvivenza dei pazienti, sia trattati che non trattati, in contrasto con quanto riportato da Zucali che propone, come già riportato, il ruolo di TS come marcatore prognostico di sopravvivenza. Anche l'analisi di espressione genica del gene di ERCC1, per quanto condotta su un numero limitato di campioni, non sembra essere associata a una peggiore prognosi.

L'analisi mutazionale del gene EGFR, a differenza di quanto rilevato per i tumori NSCLC, fa supporre che non sia questo un evento critico nel processo di cancerogenesi dei mesoteliomi pleurici, sia epiteliomorfi che sarcomatosi o bifasici. Infatti non sono state osservate mutazioni in nessuno dei 77 casi analizzati, pur utilizzando sia una metodica ad alta sensibilità come la Real-time PCR con metodica Scorpions® sia il sequenziamento diretto. Questo dato conferma quanto riportato in letteratura.

L'analisi mutazionale dei geni siti a valle di EGFR è stata condotta nei geni KRAS, BRAF e PI3KCA. Sono stati individuati 5 pazienti con mutazione di KRAS, 3 di BRAF e 1 di PI3KCA. Interessante osservare che tutti i 5 pazienti portatori di mutazione nel gene KRAS presentano una documentata storia di esposizione all'asbesto, mentre nessuno dei rimanenti 4 pazienti mutati ne è stato esposto. Tale dato potrebbe suggerire una tendenza a insorgenza di mutazione in KRAS qualora il paziente sia stato esposto all'asbesto, tuttavia l'analisi statistica non mostra significatività per supportare questa conclusione, a causa dello scarso numero di campioni mutati.

In conclusione, l'analisi immunohistochimica eseguita su una casistica più ampia di pazienti (67) non ha mostrato una correlazione tra sopravvivenza dei pazienti ed alti livelli di espressione proteica, sia di ERCC1 che di TS, escludendoli come markers prognostici per i MPM. L'analisi mutazionale ha evidenziato un basso numero di pazienti portatori di mutazioni nei geni codificanti le proteine a valle di EGFR e nessun caso con mutazione del recettore. Tale dato conferma quanto riportato da precedenti trials clinici, nei quali le terapie con bersaglio molecolare EGFR si sono dimostrate inefficaci probabilmente proprio a causa dell'assenza di mutazioni nel gene. Nel presente lavoro non è stata però eseguita una analisi di overespressione proteica del recettore per EGF, che potrebbe suggerire un possibile trattamento dei pazienti con MPM con anticorpi monoclonali diretti contro il sito di legame con il ligando.

Gli obiettivi futuri del presente lavoro saranno quelli di valutare i livelli di espressione genica di TS ed ERCC1 sulla stessa casistica di pazienti analizzati con immunohistochimica, al fine di confrontare i livelli proteici e genici con i dati di sopravvivenza e trattamento, ottenendo un quadro completo dell'assetto molecolare dei pazienti. Inoltre verrà analizzata l'overespressione del gene EGFR per determinare un possibile trattamento terapeutico con farmaci a base di anticorpi monoclonali diretti contro EGFR, quali Trastuzumab o Panitumumab.

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.

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature. 2002 Jun 27;417(6892):949-54

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.

Tan YH, Liu Y, Eu KW, et al. *Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing*. Pathology 2008; 40 (3): 295–8.

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

- *The resolution of inflammation: players and targets.* Novara, 7 Novembre 2011, Mauro Perretti.
- *Galectins-carbohydratebinding protein: sweet or sour?.* Novara, 20 Dicembre 2011, Mauro Perretti.
- *Cell signalling and genetic predisposition to mesotelioma.* Novara, 13 Gennaio 2012, Giovanni Gaudino.
- *Next generation DNA sequencing and target arrays in the clinics.* Novara, 25 Gennaio 2012, Fortina...
- *Microparticles as novel effectors in Inflammation.* Novara, 15 Maggio 2012, Mauro Peretti.
- *Resolvins and Omega-3 in Inflammation.* Novara, 16 Maggio 2012, Mauro Peretti.
- *Recent Advances in Hematopoietic Stem Cell Gene Therapy: from microRNA Regulation to Targeted Gene Transfer.* Novara, 21 Giugno 2012, Luigi Naldini.

Corsi

- **Genetic and Molecular Medicine.** Novara, 21 Maggio-1 Giugno 2012. Prof. Ellis
- **Summer School on Molecular Biomedicine.** Udine, 9-13 Luglio 2012
- **Corso d'Inglese.** Novara, Maggio-Settembre 2012. Prof. Marcello Arsura

Congressi

- **Carcinoma polmonari: ricerca di algoritmi per un miglior trattamento del paziente.** Lugano, 1 Dicembre 2011
- **Melanoma: finalmente buone notizie.** Lugano, 26 Aprile 2012
- **Molecular Basis for resistance to targeted agents.** Trento 14-16 Giugno 2012