

- Capitolo 5 -

RISULTATI

Strategie anti-apoptotiche

SV40-dipendenti e SV40-indipendenti

5.1 Citotossicità da Asbesto.

Il secondo obiettivo che ci siamo prefissi è stato quello di studiare il ruolo giocato dai fattori di crescita tipici del MM rispetto al complesso fenomeno della morte cellulare indotta da asbesto.

Molti lavori hanno dimostrato che HGF, a seconda del modello cellulare in cui è implicato, media un effetto di *promozione* (Gohda *et al.*,1998; Conner *et al.*, 1999; Araraki *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2002) o di *protezione da apoptosi* (Bardelli *et al.*,1996; Fan *et al.*,1998; Bowers *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2001), passando attraverso l' attivazione del suo recettore Met.

Le fibre d'asbesto hanno la capacità di indurre danni a carico del DNA cromosomale (Wang *et al.*, 1987) e alterazioni dovute a danno ossidativo a carico di molecole importanti per le funzioni vitali cellulari (Broaddus *et al.*,1996).

La progressiva **resistenza all' apoptosi** detta anche **survival** può rappresentare parte di un processo multifasico che conduce gradualmente alla trasformazione neoplastica del mesotelio (Xu *et al.*, 1999). Le cellule mesoteliali SV40/Tag-positive sono meno sensibili all' effetto apoptotico conseguente alla fagocitosi delle fibre (Wu *et al.*, 2000) e, una volta sopravvissute all' esposizione, mostrano elevata instabilità genomica (Levrèse *et al.*, 1998), implicata nella trasformazione cellulare (Bocchetta *et al.*, 2000).

Per confermare questi dati già presenti in letteratura, attraverso un saggio basato sull'incorporazione dei sali di tetrazolio e sulla loro trasformazione mediante enzimi mitocondriali in cristalli blu di formazano, solubili in DMSO (*saggio MTT*), è stata valutata nel modello mesoteliale la tossicità conseguente al trattamento con fibre di crocidolite e amosite, usando come controllo una stimolazione con fibre di vetro. I due tipi di fibre d' asbesto usati sono silicati fibrosi appartenenti alla serie mineralogica degli anfiboli, che include fibre ad alto contenuto in ferro e quindi in grado di produrre un forte stress ossidativo:



Crocidolite $-\text{Na}_2(\text{MgFe})_7\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$

Tremolite $-\text{Ca}_2\text{Mg}_5\text{Si}_8\text{O}_{22}(\text{OH})_2$

E' stata osservata una crescita esponenziale della tossicità da asbesto in corrispondenza dell' aumentare dei tempi di stimolazione oltre a una chiara correlazione dose-risposta (**Fig. 27A**). Le fibre di vetro hanno a loro volta indotto una tossicità sul mesotelio non del tutto trascurabile, seppur di molto inferiore a quella misurata nei campioni esposti ad asbesto. Non si sono invece osservate differenze significative di citotossicità tra il trattamento con fibre di crocidolite e quello con fibre di amosite a parità di dosaggio (**Fig. 27B**) e per questo motivo gli esperimenti successivi sono stati condotti solo con il secondo tipo di fibre, capace di dare sospensioni più omogenee in terreno di coltura.

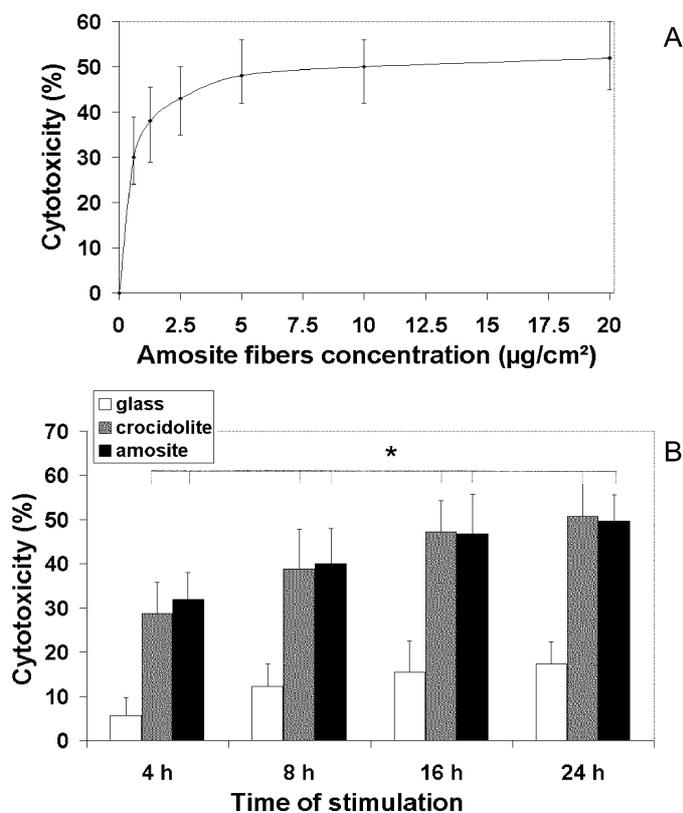


Fig.27. Citotossicità da asbesto in cellule HMC. (A) Curva dose-risposta realizzata mediante saggio MTT. (B) Time-course in cellule HMC esposte a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ di fibre dei vari tipi. * = significativamente diversi dai campioni stimolati con fibre di vetro a parità di tempo (P<0,01).

Va inoltre osservato che la risposta alle fibre è risultata essere molto differente tra linee mesoteliali ottenute da diversi pazienti, suggerendo che, pur esistendo una comune tendenza

del mesotelio a subire gli effetti tossici dell' asbesto, esista comunque una non trascurabile variabilità soggettiva nella sensibilità.

Correlazioni dose-risposta e tempo-risposta sono state osservate anche in linee mesoteliali trasfettate (Tag-HMC e SV40-HMC) e nei mesoteliomi da noi esaminati (MMB e MMCA).

Il dato particolarmente rilevante è stato che, a parità di stimolazione, le linee Tag positive (Tag-HMC, SV40-HMC e MMCA) sono sempre apparse significativamente più protette rispetto ai rispettivi controlli Tag negativi (HMC per il modello mesoteliale e MMB per il mesotelioma maligno) e che HGF è risultato in grado di esercitare un effetto di protezione seppur non in modo completo per via probabilmente della presenza di altri meccanismi di protezione Tag e tag dipendenti (**Fig. 28**).

Questo dato è stato osservato anche in seguito a stimolazione con altri tipi di sostanze note per la loro tossicità, capaci di produrre azione ossidante (perossido di idrogeno) o di agire attraverso meccanismi diversi da quello ossidativo (VP16 o etoposide, inibitore della Topoisomerasi II) (non mostrato).

I dati ottenuti mediante saggio MTT hanno il limite di fornire indicazioni solo sulla citotossicità complessiva, intesa come somma del processo apoptotico e di quello necrotico in atto, in quanto la trasformazione enzimatica mitocondriale dei sali di tetrazolio in formazano si riduce indistintamente sia durante l' apoptosi sia durante la necrosi.

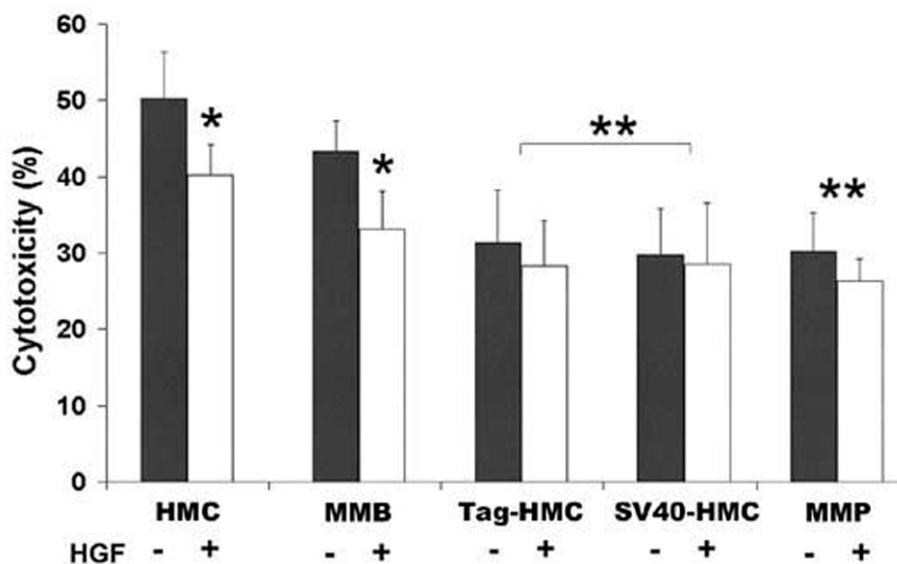


Fig.28. Correlazione tra espressione di Tag e survival. Le linee cellulari sono state esposte a 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ di amosite per 24 h, in presenza o assenza di HGF purificato (50 ng/ml). I risultati di tossicità sono stati ottenuti mediante saggio MTT. * = significativamente differente rispetto al trattamento senza HGF ($P < 0.01$); ** significativamente differente rispetto ai rispettivi controlli Tag-negativi (HMC e MMB) ($P < 0.01$).

Essendo interessati a discriminare tra i due tipi di morte cellulare conseguenti ai trattamenti da noi eseguiti, è stata abbinata al saggio MTT l'analisi al citofluorimetro di cellule marcate dopo i vari trattamenti con Annexina V-FITC e Propidio Ioduro. La prima sostanza si lega alla fosfatidilserina, un fosfolipide che viene esposto sul lato esterno della membrana cellulare durante l'apoptosi. Il propidio ioduro è invece capace di formare un addotto con il DNA quando, in condizioni di esteso danno alle membrane, quali quelle presenti durante un processo apoptotico tardivo o necrotico, riesce ad entrare nella cellula e a legarsi agli acidi nucleici.

Dall'esame contemporaneo delle due marcature, è stato possibile ricavare utili informazioni sulla vitalità cellulare, l'apoptosi e la necrosi.

In seguito a stimolazione delle stesse linee con stimoli tossici di tipo sia ossidante sia non ossidante abbiamo osservato che l'apoptosi indotta dai vari agenti tossici era sensibilmente più pronunciata nelle linee Tag-negative (**Fig. 30A**).

La maggior protezione osservata nelle linee SV40/Tag-positive è sicuramente in parte spiegabile con dati già noti relativi agli antigeni T (tag e Tag) di SV40, che dimostrano che alcuni domini di queste proteine virali sono responsabili in modo più o meno diretto di una riduzione del processo apoptotico.

E' infatti risaputo che Tag lega e inattiva p53, molecola coinvolta nell' induzione di apoptosi (Schrump e Waheed, 2001).

Tag potrebbe inoltre contribuire indirettamente all' aumento della sopravvivenza cellulare attraverso l' induzione recentemente scoperta dell' espressione dell' enzima telomerasi (Foddis *et al.*, 2002).

Inoltre, è stato dimostrato che Tag stesso è provvisto di un dominio altamente omologo al fattore anti-apoptotico bcl-2 (Conzen *et al.*, 1997).

Anche **small t antigen (tag)** dà un suo contributo alla riduzione di apoptosi, legando e inattivando la fosfatasi PP2A, con conseguente mantenimento prolungato della fosforilazione di **Akt** (Rundell and Parakati, 2001), molecola coinvolta nell' inattivazione del fattore pro-apoptotico **BAD**.

In base ai nostri dati sembrerebbe che oltre a questi meccanismi già noti, un altro meccanismo responsabile di protezione da tossicità nelle linee Tag positive sia l'espressione di HGF indotta da Tag, da noi precedentemente dimostrata (Cacciotti *et al.*, 2001).

5.2 La resistenza all' apoptosi HGF-dipendente è mediata dalla via di PI3K/Akt.

In letteratura, la protezione da apoptosi dovuta ad HGF è stata associata ad un aumento di attivazione/fosforilazione di Akt/PKB e/o di Erk1 e Erk2 (MAPK), molecole coinvolte nella trasduzione del segnale (Xiao *et al.*, 2001). In seguito a stimolazione di HMC e di cellule di mesotelioma SV40-negative (MMB) con VEGF o HGF o Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1), fattori indotti nei MM da SV40 (Cacciotti *et al.*, 2001; Cacciotti *et al.*, 2002; Pass *et al.*, 1998), abbiamo osservato una forte attivazione di Akt ed Erk1/2 solo dopo trattamento con HGF, mentre VEGF (**Fig. 29A-B**) e IGF-1 (non mostrato) hanno prodotto scarsi effetti.

Nelle Tag-HMC e in cellule di MM SV40-positive (MMCa), Akt e Erk1/2 sono apparsi significativamente fosforilati anche in assenza di stimolazione con HGF e questa fosforilazione si è ridotta dopo il trattamento con i rispettivi inibitori (Wortmannina per la via di PI3K/Akt e PD98059 per la via delle MAPK) (**Fig. 29C -D**).

Successivamente, il trattamento con fibre di amosite è stato abbinato a stimolazione con i medesimi inibitori, allo scopo di stabilire quali trasduttori siano effettivamente implicati nel survival.

L'effetto degli inibitori è apparso poco apprezzabile nelle linee Tag negative, mentre nelle linee Tag positive è stato decisamente significativo ($P < 0.001$) l'aumento di tossicità dopo la stimolazione con Wortmannina (**Fig. 29E**).

PD98059 non ha invece avuto effetto, nonostante quest'ultimo inibitore sia risultato in immunofluorescenza funzionante, in quanto capace di bloccare la traslocazione al nucleo di Erk1/2 (non mostrato).

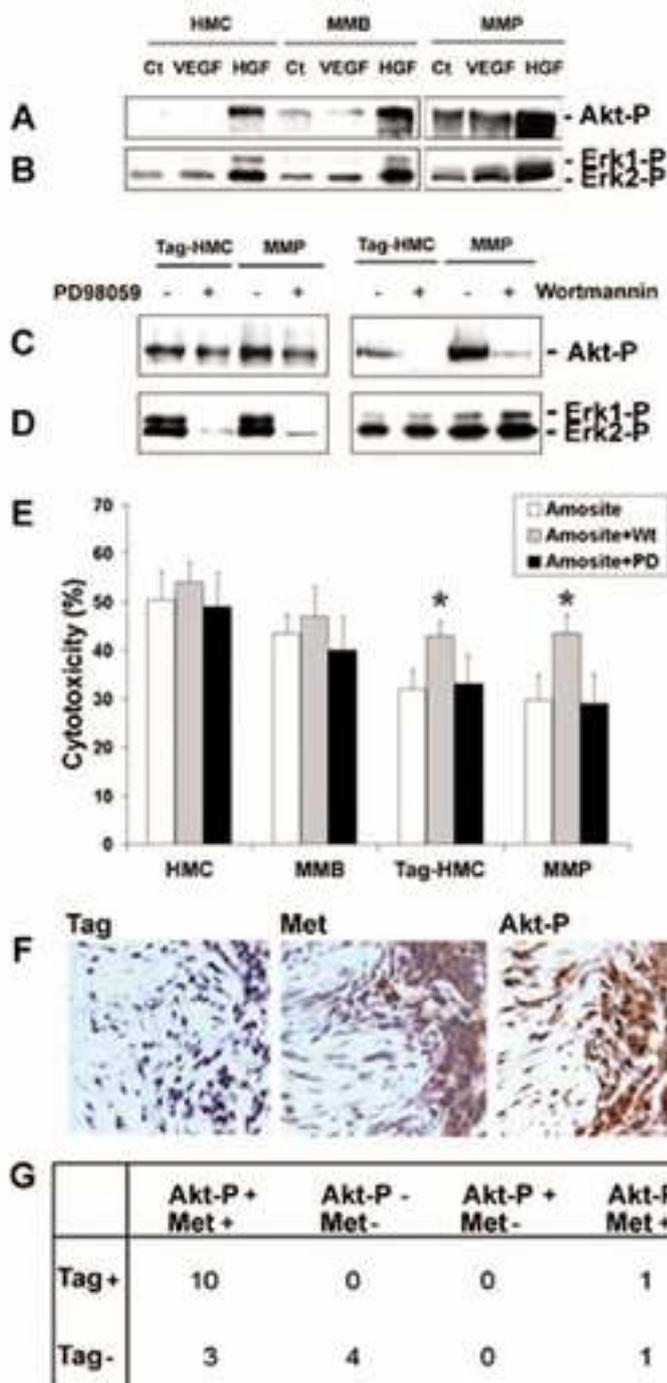


Fig. 29. Dipendenza della protezione da apoptosi dal pathway di PI3K/Akt. Immunoblotting su lisati totali di cellule Tag-negative (HMC, MMB) e Tag-positive (MMP) esposte ad HGF o VEGF (A-B), di cellule Tag-positive trattate con l' inibitore di Erk1/2 o con quello di PI3K (C-D), condotto con anticorpi anti-fosfoAkt (Ser473) (A-C) e fosfoErk1-2 (B-D). (E) Saggio MTT su cellule esposte ad amosite in presenza o meno di Wortmannina e di PD98059. I dati sono medie su tre esperimenti \pm SD. * = significativamente diverso rispetto all'esposizione a fibre senza inibitori ($P < 0.001$). (F) Analisi immunoistochimica di cellule tumorali di MM con anticorpi anti-Tag, Met e fosfo-Akt. Da notare lo stroma (sinistra) e la parte tumorale (destra) in ogni foto, con una forte positività per tutte e tre le molecole nella parte tumorale. Ingrandimento: 400x. (G) Risultati dell' analisi immunoistochimica condotta su un microarriv di tessuto di MM con i medesimi anticorpi.

Pertanto, nel modello mesoteliale e nei mesoteliomi, sembra essere importante ai fini della protezione HGF-dipendente da apoptosi la via della PI3K/Akt, mentre quelle delle MAPK/Erk1/2 non pare essere coinvolta in modo significativo.

L'analisi immunohistochimica (condotta in collaborazione con il Dr. Testa, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA) su un *microarray* di tessuto di MM ha ulteriormente contribuito a rafforzare l'ipotesi che il Tag di SV40 possa contribuire alla attivazione di Akt attraverso Met. Infatti l'espressione di Met è risultata evidente in 15 (79%) su 19 MM. Inoltre 11 (58%) su 19 campioni presentavano marcatura nucleare di Tag, mentre questa non è stata osservata nel tessuto normale. La presenza di fosfo-Akt è stata invece rilevata in 10 (91%) su 11 campioni positivi sia per Tag sia per Met (**Fig. 29F**).

L'analisi statistica ha mostrato che sia la positività per Tag sia quella per Met sono correlate significativamente a quella per fosfo-Akt ($P=0.0408$ e $P=0.0039$ rispettivamente) e che la positività per Tag si associa significativamente a quella per Met ($P=0.0181$) (**Fig. 29G**).

5.3 PI3K/Akt protegge il mesotelio da apoptosi attraverso la mancata up-regulation di CD95/Fas.

Per confermare ulteriormente il ruolo giocato da HGF nella protezione da apoptosi, abbiamo confrontato mediante citofluorimetria a flusso, le cellule della linea Tag-HMC con quelle della linea mutante TagM-HMC, che non esprimono HGF. Abbiamo osservato che queste ultime hanno una maggior tendenza ad andare in apoptosi e che, bloccando l'attività di HGF espresso da Tag-HMC con anticorpi bloccanti specifici, l'apoptosi cresce fino a valori confrontabili a quelli misurati nelle cellule della linea mutante (**Fig. 30A**).

Per comprendere i meccanismi alla base della ridotta citotossicità mediata dalla via di Akt, abbiamo esaminato tipici marcatori di apoptosi, quali l'attività caspatica, l'espressione di Bcl-2, di Bax e di CD95 (Ashkenazi, 2002).

In seguito a trattamento con etoposide (VP16), abbiamo osservato mediante analisi citofluorimetrica un significativo incremento di attività pan-caspatica in cellule mesoteliali (HMC) e di mesotelioma SV40 negative (MMB), mentre questo effetto non è stato praticamente osservato in cellule SV40-HMC e nel mesotelioma SV40-positivo MMP. L'aggiunta di HGF in simultanea al VP16 ha inoltre indotto una cospicua riduzione dell' **attività caspatica** nelle HMC e nelle MMB.

Consistentemente con l'attivazione di Akt conseguente alla stimolazione con HGF, l'aggiunta di Wortmannina, inibitore della PI3K, ha portato ad un grosso incremento dell'attività caspatica in cellule SV40-HMC e MMP, entrambe esprimenti HGF. Infine, il trattamento combinato con HGF e Wortmannina ha innalzato nuovamente l'attività caspatica in cellule HMC e MMB (**Fig. 30B-istogrammi neri**).

Mediante esperimenti analoghi, abbiamo esaminato mediante citofluorimetria l'espressione del "**death-receptor**" **CD95**, noto per il suo importante ruolo nel processo apoptotico. Il razionale si fonda su dati recenti ottenuti nella linea MCF-7, che hanno mostrato come la infezione da SV40 sia correlata ad una mancanza di up-regulation di CD95 conseguente all'esposizione a stimoli apoptotici (Sheard *et al.*, 2002).

In seguito a trattamento con VP16, l'espressione di CD95 è salita in cellule HMC e MMB a livelli significativamente superiori rispetto a quelli osservati in cellule SV40-HMC e MMCa. L'aggiunta di HGF ha invece indotto una forte riduzione dell'espressione di CD95 nelle cellule SV40-negative, benché in misura diversa nelle HMC e nelle MMB.

Infine, il trattamento con Wortmannina di cellule SV40-positive ha indotto un cospicuo aumento di espressione di CD95, che è stato ripristinato in cellule SV40-negative mediante aggiunta in simultanea di HGF e Wortmannina (**Fig. 30B-istogrammi neri**).

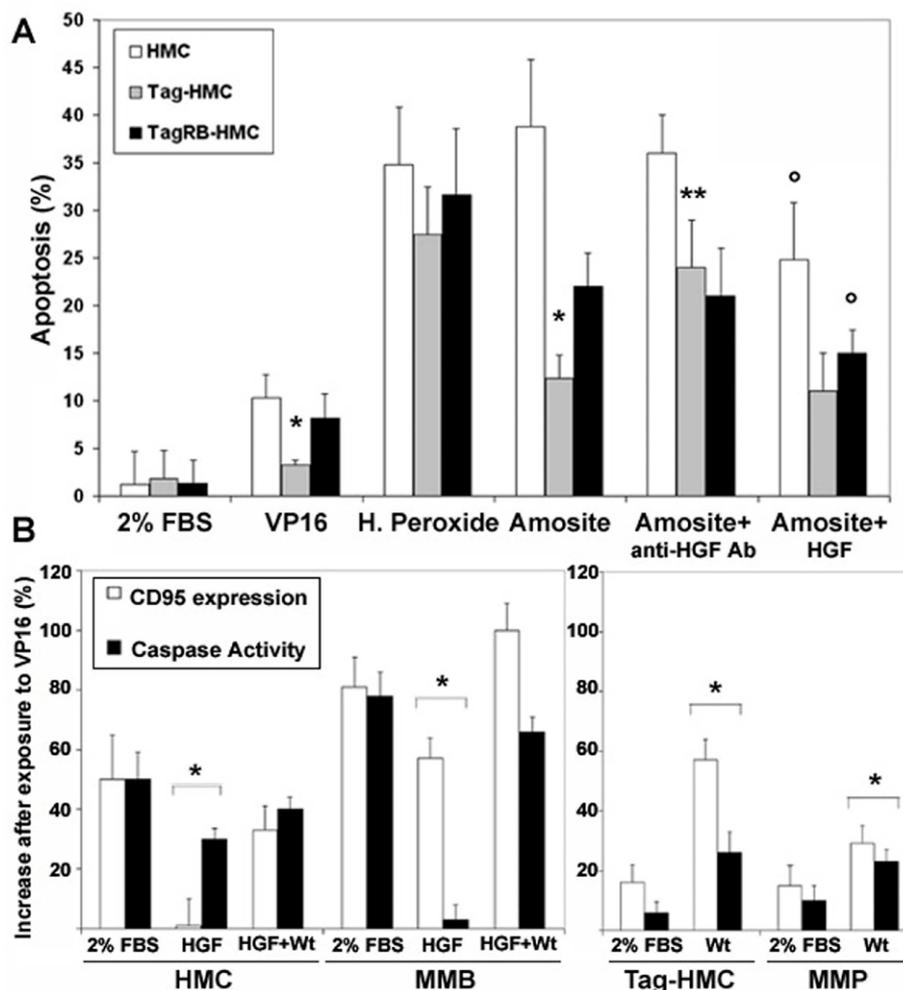


Fig.30. Mancata up-regulation di CD95 e dell'attività caspatica in cellule Tag-positive. (A)

Analisi citofluorimetrica di cellule esposte a terreno di controllo (2% FBS), VP16, H₂O₂, Amosite, in presenza o meno di anticorpi anti-HGF bloccanti o di rhHGF. I dati sono percentuali medie di cellule apoptotiche \pm SD. * = signif. diverso rispetto a HMC ($P < 0.01$); ** = signif. diverso rispetto a cellule non esposte ad anticorpi anti-HGF bloccanti ($P < 0.01$); ° = signif. diverso rispetto a cellule non esposte a HGF ($P < 0.01$). (B) Analisi di espressione di CD95 e dell'attività caspatica. I dati sono medi incrementi di fluorescenza dopo trattamento con VP16 \pm SD. Le cellule sono state trattate con terreno di controllo e in presenza di HGF, Wt, HGF+Wt. * = signif. diverso rispetto al trattamento in 2% FBS ($P < 0.01$).

L' espressione di **Bcl-2** e **Bax** non ha invece subito modifiche sostanziali nelle stesse condizioni sperimentali (non mostrato), a conferma di studi precedenti che hanno mostrato come Bcl-2 abbia un ruolo secondario nella regolazione dell' apoptosi nei mesoteliomi (Soini *et al.*, 1999).

Complessivamente quindi questi risultati dimostrano che la via di PI3K/Akt inibisce l'aumento di espressione di CD95 conseguente all' esposizione ad agenti tossici e forniscono una prima spiegazione dei meccanismi alla base dell'effetto anti-apoptotico da noi osservato.

5.4 L' attivazione di NF- κ B promuove protezione da apoptosi delle cellule di MM.

Ci è parso interessante valutare anche il ruolo del fattore trascrizionale NF- κ B nella protezione da apoptosi nel MM, dato che molte linee tumorali presentano un aumento di questa proteina a livello nucleare o una sua maggior attività trascrizionale (Dhawan *et al.*, 2002; Orłowski e Baldwin, 2002).

NF- κ B è un eterodimero composto dalle subunità **p50** (NF κ B 1) e **p65** (**RelA**), in grado di legare elementi di risposta (responsive elements, RE) sul DNA (Bours *et al.*, 1990).

NF- κ B risiede nel citoplasma sequestrato da una classe di proteine (**I κ Bs – Inhibitory κ B proteins**) le quali, se fosforilate da specifiche chinasi (IKKs), sono poliubiquitinate e successivamente degradate dal complesso multicatalitico del proteasoma 26S: NF- κ B è quindi libero di traslocare nel nucleo (Okazaki *et al.*, 2003) e legarsi a specifiche sequenze sul DNA (κ B sequences - T GGGGACTTCC GC).

L'attività anti-apoptotica di NF- κ B dipende prevalentemente dall' induzione dei geni che codificano proteine implicate nell'inibizione del processo apoptotico quali c-IAPs, caspasi-8-c-Flip (FLICE inhibitory protein) e AP1.

L' analisi mediante EMSA ha mostrato un' attività trascrizionale basale di NF- κ B presente in cellule di MM, indipendentemente dall' espressione di Tag, mentre non è stato osservato il legame al DNA di NF- κ B in cellule mesoteliali, né esso è aumentato dopo stimolazione con HGF, in contrasto a quanto osservato nella linea epiteliale murina MLP29, usata come controllo (Muller *et al.*, 2002). Inoltre l' attività trascrizionale nelle cellule di MM è stata inibita da Bay 11-7082, noto inibitore della fosforilazione di I κ B- α , mentre l' inibitore della PI3K Wortmannin (**Fig. 31A**), l' inibitore delle tirosina chinasi Genisteina, di Src (PP2), di Erk2 (PD98059) e di p38 (SB203580) non hanno prodotto alcun effetto (non mostrato).

In accordo con dati precedentemente pubblicati (Mossman *et al.*, 1997), l' esposizione ad asbesto ha indotto attività trascrizionale di NF- κ B. Pertanto abbiamo esaminato la risposta citotossica alle fibre di amosite in seguito al trattamento con Bay 11-7082. La sensibilità all'asbesto è risultata sensibilmente accresciuta dopo trattamento con Bay 11-7082 in cellule mesoteliali (P=0.0001). Inoltre, il trattamento con il solo Bay 11-7082 ha prodotto un aumento della citotossicità delle cellule di MM, suggerendo che in queste cellule il blocco di NF- κ B si traduce in un' abrogazione del *survival*. In HMC trattate in modo analogo non si sono osservati effetti, poiché, come precedentemente detto, NF- κ B non è attivo in queste cellule (**Fig. 31B**).

Nell' insieme, questi dati suggeriscono che anche NF- κ B così come Akt può indurre resistenza alla citotossicità di cellule di MM. Il meccanismo di attivazione, in base ai nostri risultati è sicuramente indipendente dalla presenza di Tag e dalle vie di PI3K/Akt e di MAPK, ma dovrà sicuramente essere meglio studiato successivamente.

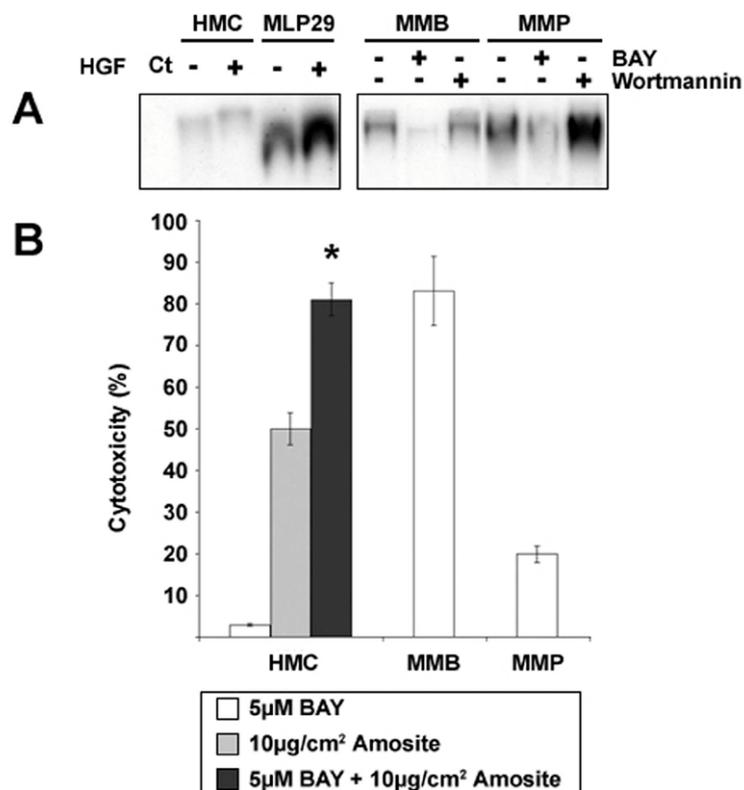


Fig. 31. La forma attivata di NF-kB induce survival. (A) Saggio EMSA per valutare l'attività trascrizionale di NF-kB in cellule cresciute in 2% FBS e trattate come indicato (B) Saggio MTT su cellule esposte a Bay11-7082 in presenza o meno di Amosite. I dati sono medie di tre esperimenti \pm SD. * = significativamente diverso rispetto all' esposizione senza Bay11-7082 (P=0.0001).

5.5 L' esposizione cronica delle SV40-HMC alle fibre d'asbesto promuove trasformazione cellulare.

E' noto che l' esposizione ad asbesto può indurre una sorta di *selezione clonale* all' interno della popolazione cellulare mesoteliale esposta, capace di portare alla comparsa di cloni a maggiore resistenza nei confronti di stimoli apoptotici e sopravvivenza prolungata in coltura (Xu *et al.*, 1999). Questo spiegherebbe tra l' altro il motivo per cui le cellule di mesotelioma derivate

da pazienti presumibilmente esposti in passato ad asbesto siano generalmente più resistenti alla tossicità da asbesto rispetto alle cellule mesoteliali sane.

E' stato inoltre dimostrato che l' esposizione prolungata all' asbesto delle cellule mesoteliali SV40-positive può indurre trasformazione cellulare (Bocchetta *et al.*, 2000). Abbiamo voluto verificare se l' autocrinia HGF/Met potesse influenzare tale trasformazione.

Pertanto, abbiamo riprodotto una situazione di esposizione cronica, simile a quella che potrebbe indurre *in vivo* una graduale trasformazione maligna del mesotelio, trattando le HMC, le SV40-HMC e le Tag-HMC, seguendo un protocollo di esposizione a lungo termine descritto nel capitolo *Materiali e Metodi*.

Dopo trenta giorni dall'inizio del trattamento con amosite, le cellule SV40-HMC hanno cominciato ad acquisire una nuova morfologia, divenendo più larghe e piene di vacuoli (**Fig. 32A, pannello intermedio**), rispetto alle stesse cellule osservate 7 giorni dalla fine del trattamento con amosite (**Fig. 32A, pannello sinistro**). Dopo 60 giorni, hanno perso l' inibizione da contatto e hanno generato **foci di trasformazione** (**Fig. 32A, pannello destro**).

Le HMC di controllo e le Tag-HMC esposte all' amosite non sono sopravvissute a sufficienza per completare l' esperimento, a conferma della necessità dell' intera *early region* virale per ottenere piena trasformazione.

L' analisi del ciclo cellulare dopo 30 giorni di trattamento ha rivelato che la maggior parte delle cellule si è arrestata nella fase G₂/M, offrendo una spiegazione alle numerose cellule polipoidi osservabili in microscopia. Le cellule derivate dai *foci* (SV40-HMC F) invece sono divenute capaci di crescere in assenza di siero e hanno mostrato un significativo incremento della fase S (**Fig. 32B**). E' inoltre interessante osservare come queste cellule, benché siano risultate dotate di attivazione costitutiva di Met, di NF-kB e del trasduttore Akt (**Fig. 32A**), si siano progressivamente rese indipendenti da HGF per quanto riguarda il *survival*, come

dimostrato dall' assenza di differenze significative di citotossicità tra cellule trattate o meno con anticorpi bloccanti anti-HGF (**Fig. 32C**).

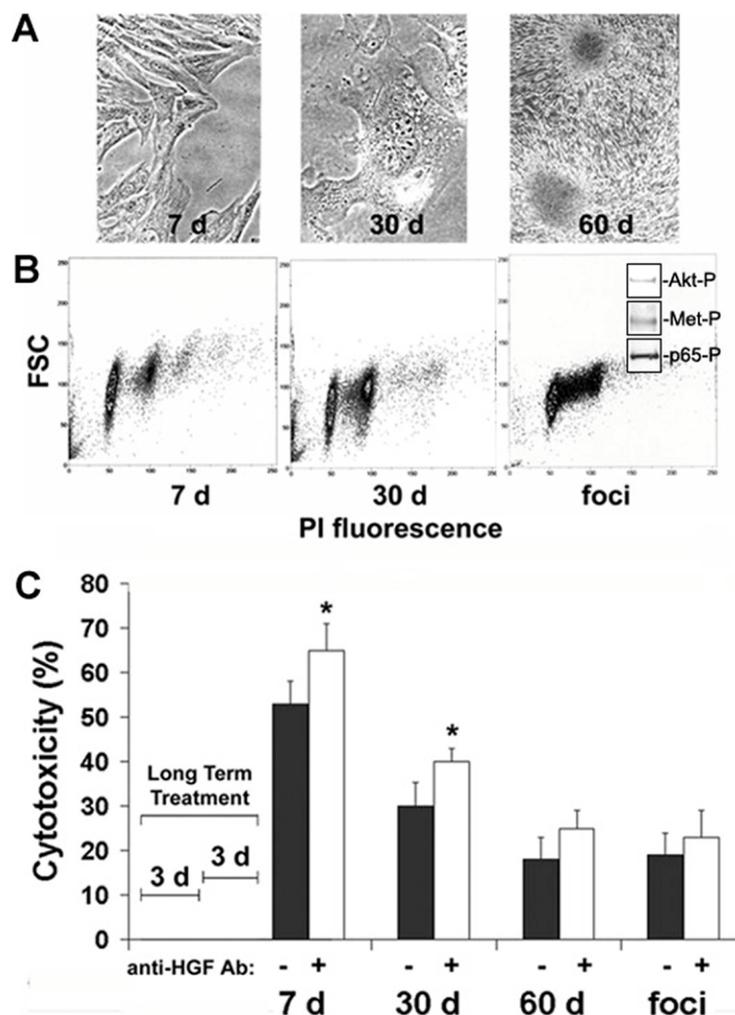


Fig. 32. Asbesto, SV40, PI3K/Akt e NF-kB cooperano alla trasformazione mesoteliale. (A) Morfologia cellulare di SV40-HMC dopo trattamento prolungato con amosite. Ingrandimento originale: x 320. (B) Analisi del ciclo cellulare a 7gg, 30gg e nelle cellule dei *foci*. Gli inserti sono immunoblots con anticorpi anti-fosfoAkt (Ser473), anti-fosfo-p65 (subunità di NF-kB), anti-fosfotirosina su lisati di cellule dei *foci* (SV40-HMC F). (C) Saggio MTT su SV40-HMC sopravvissute al trattamento ed esposte ad amosite, in presenza o meno di anticorpi bloccanti anti-HGF. I dati sono medie di tre esperimenti \pm SD. * = significativamente diverso dall' esposizione in assenza di anticorpi anti-HGF ($P < 0.05$).

bloccanti anti-HGF non è risultato a sua volta in grado di aumentare la sensibilità alla citotossicità da asbesto (non mostrato), suggerisce che HGF giochi un ruolo importante solo nei primi stadi della trasformazione, cioè finché le cellule mesoteliali non vanno incontro a perdita dei normali meccanismi di controllo del ciclo cellulare. In questo stadio più avanzato della

trasformazione, restano invece sempre indispensabili le vie della PI3K/Akt e di I κ B- α /NF- κ B per contrastare la morte cellulare; pertanto queste vie sembrano essere ottimi bersagli per terapie farmacologiche innovative.

Le cellule SV40-HMC F sono state ulteriormente caratterizzate per approfondire lo studio dei meccanismi alla base della loro capacità trasformante. Mediante il saggio dell' incorporazione di BrdU, abbiamo osservato un netto incremento di DNA neosintetizzato nelle SV40-HMC F rispetto a HMC e SV40-HMC non esposte a fibre (**Fig. 33**). Questo dato conferma i risultati dell'analisi del ciclo cellulare precedentemente ottenuta, che mostrava un aumento della fase S nelle cellule derivate dai *foci*. Inoltre, a ulteriore conferma dell' avvenuta trasformazione, le cellule SV40-HMC F si sono rivelate in grado di crescere in basso siero (2%) per più di due settimane, a differenza delle cellule di partenza non esposte alle fibre.

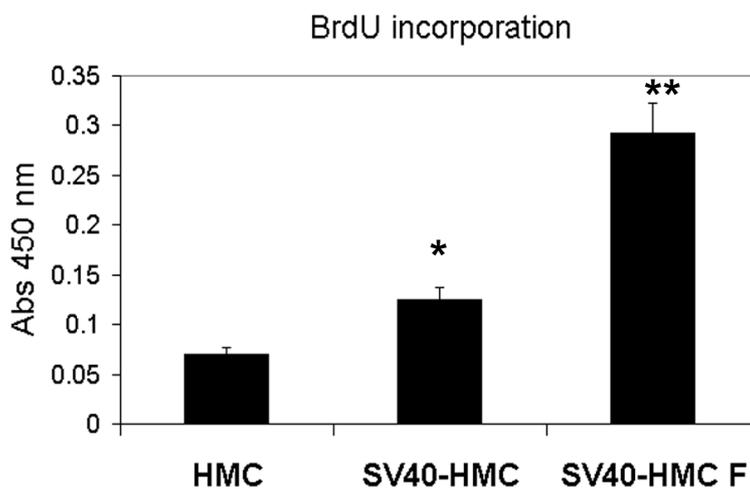


Fig.33. La trasformazione indotta dalle fibre di amosite induce neosintesi di DNA. Le cellule sono state sottoposte a test di incorporazione di BrdU per valutare la quantità di DNA neosintetizzato nelle ultime 24 h. * = diverso significativamente da HMC ($P < 0,001$); ** = diverso significativamente da SV40-HMC ($P < 0,001$).