

- Capitolo 8 -
DISCUSSIONE

Si stima attualmente che circa il 15% dei tumori umani noti abbia un' eziologia virale (Parkin *et al.*,1999), con un' incidenza decisamente superiore nei Paesi in via di sviluppo, nei quali, a causa delle pessime condizioni igienico-sanitarie, è più elevata la possibilità di trasmissione dei virus tumorigenici.

E' opinione comune che i virus non siano cancerogeni completi, ma piuttosto agiscano come fattori promuoventi la tumorigenesi, che necessitano comunque della cooperazione con altri cofattori di tipo ambientale o con i prodotti di proto-oncogeni cellulari, tra i quali i recettori dotati di attività enzimatica di tipo tirosina chinasi (RTKs) implicati nella stimolazione della crescita, della motilità o del differenziamento e pertanto provvisti di potenzialità oncogeniche (Aaronson,1991).

Tra gli eventi che portano alla deregolazione dell' attività chinasica e all' iperattivazione degli RTKs vi è l' innesco all' interno dei tessuti di circuiti autocrini, caratterizzati dall' espressione contemporanea di un recettore e del suo ligando. I nostri risultati, condotti sul modello del Mesotelioma Maligno Pleurico, una neoplasia multifattoriale correlata ad infezione virale, mostrano che in linee cellulari SV40/Tag - positive ottenute da pazienti, il recettore tirosina chinasi Met è costitutivamente attivato/fosforilato proprio grazie all' instaurarsi di un **circuito autocrino HGF/Met indotto da Tag**. Questo è stato dimostrato sia attraverso *attività scatter* rinvenuta nel terreno condizionato delle cellule di MM Tag-positive, segno di espressione di HGF da parte di queste ultime, sia mediante inibizione della fosforilazione di Met e parziale reversione del fenotipo fibroblastoide conseguente all' instaurarsi dell' autocrinia, osservati in seguito a trattamento con il detergente suramina e con i più specifici anticorpi bloccanti anti-HGF.

Inoltre, esperimenti di co-coltura tra cellule mesoteliali trasfettate con SV40 (SV40-HMC) e altre cellule bersaglio di diversa origine hanno permesso di confermare che il virus SV40 si replica in cellule mesoteliali umane, in accordo con altri dati simili pubblicati recentemente (Bocchetta *et al.*, 2000). Il virus si propaga da cellule che fungono da “serbatoio di infezione” a cellule adiacenti permissive o semipermissive, che a loro volta vanno incontro alle stesse modificazioni, ossia fosforilazione in tirosina di Met, rilascio di HGF, rapida progressione attraverso le fasi del ciclo cellulare, acquisizione di fenotipo fibroblastoide e trasformazione a loro volta da cellule bersaglio a cellule serbatoio di infezione. In esse si instaura infatti un nuovo ciclo replicativo, che porta al propagarsi all’intera popolazione cellulare circostante dell’infezione virale e degli effetti conseguenti.

Questo spiegherebbe il motivo per cui un iniziale numero limitato di cellule SV40 positive, come quello che spesso si osserva in campioni di MM sottoposti a marcatura con anticorpi anti-Tag, sia sufficiente per guidare le cellule mesoteliali non infettate verso la trasformazione maligna, innescando un processo a catena, che potrebbe concorrere, insieme all’asbesto, all’induzione della tumorigenesi.

La trasfezione del genoma completo di SV40 o delle sole sequenze codificanti Tag ha indotto alterazioni nel ritmo di crescita e nella morfologia delle cellule HMC, confermando l’importanza della *early region* virale ai fini dell’acquisizione di proprietà tipiche delle cellule invasive. In particolare abbiamo dimostrato che la sequenza codificante Tag rappresenta la parte della *early region* virale essenziale perché si osservi la sintesi e il rilascio di HGF. HGF secreto può stimolare le cellule mesoteliali umane non solo in modo *autocrino* ma anche in modo *paracrino*, agendo su cellule vicine Met positive. Un simile meccanismo è stato riportato nel caso del Mieloma causato dal virus HHV-8 associato al Sarcoma di Kaposi, in cui il rilascio

di IL-6 da parte delle cellule infettate induce trasformazione maligna delle vicine plasmacellule (Rettig *et al.*, 1997).

In modo del tutto analogo, è stata osservata autocrinia HGF/Met dipendente da Tag in cellule di rene canino MDCK. In questo modello è stato dimostrato che **alla base dell' autocrinia vi è il legame di Rb con l' antigene virale Tag** e la conseguente inattivazione dell'oncosoppressore (Martel *et al.*, 1997). In base ai risultati da noi ottenuti con il mutante di Tag incapace di legare Rb, possiamo concludere che anche nel modello mesoteliale vale lo stesso meccanismo osservato nelle cellule di rene canino e che esiste in linee cellulari di diversa origine un meccanismo comune Tag-dipendente che induce attivazione di Met.

Un dato interessante e ancora da chiarire è stato il costante aumento di espressione di Met osservato in cellule mesoteliali Tag o SV40 positive. Questo effetto non può essere semplicemente spiegato dall' attivazione di Met, capace di aumentare l' espressione del recettore (Boccaccio *et al.*, 1994).

Altri meccanismi possono essere coinvolti in questa regolazione trascrizionale e/o post-trascrizionale Tag-dipendente e in ogni caso, tale aumento di espressione non sembra essere essenziale ai fini degli effetti biologici osservati. Infatti, questo aumento di espressione non è sufficiente a indurre attivazione costitutiva di Met, come dimostrato nel caso delle cellule TagM-HMC, nelle quali Met è più espresso rispetto alle cellule mesoteliali di origine, ma non è fosforilato a causa della mutazione inattivante di Tag e la conseguente mancata sintesi di HGF. Inoltre i trattamenti con suramina e anticorpi anti-HGF bloccanti hanno inequivocabilmente dimostrato che l' attivazione del recettore e i cambiamenti morfologici osservati dipendono dalla stimolazione con HGF

Abbiamo anche dimostrato che la presenza dell'intera *early region* di SV40 (Tag e tag) si associa nel modello mesoteliale e nei MM ad aumentata espressione di VEGF (Cacciotti *et al.*, 2002), fattore angiogenico implicato nella ridotta sopravvivenza dei pazienti di MM, in seguito all'instaurarsi di un **circuito autocrino *flt-1/VEGF*** (Strizzi *et al.*, 2001).

E' stato dimostrato che l'inattivazione di p53 in cellule di carcinoma della mammella è associata a ridotta espressione della trombospondina-1, una proteina di matrice che regola la crescita endoteliale antagonizzando gli effetti pro-angiogenici di VEGF (Roberts, 1996). Questo meccanismo potrebbe spiegare gli alti livelli di VEGF in cellule di MM SV40 positive, in quanto Tag è in grado di legare e inattivare p53 (Carbone *et al.*, 1997). In alternativa, HGF stesso espresso in modo Tag-dipendente potrebbe indurre aumentata espressione di VEGF e del suo recettore, come dimostrato da alcune osservazioni su altri tumori (Wojta *et al.*, 1999), anche se questa ipotesi deve ancora essere verificata nel modello mesoteliale. La terza possibilità è che il meccanismo sia dipendente non solo da Tag ma anche da small t antigen, visto che l'aumento di secrezione di VEGF è sensibilmente maggiore dopo trasfezione con l'intero genoma virale rispetto a quella con il solo cDNA di Tag.

La curva di crescita ottenuta stimolando cellule HUVEC con il terreno condizionato di cellule SV40-HMC è risultata comparabile a quella generata dopo stimolazione con rh-VEGF, il fattore purificato disponibile commercialmente. L'aggiunta di anticorpi bloccanti anti-VEGF non ha invece ridotto in modo statisticamente significativo la crescita, suggerendo che altri fattori di crescita presenti nel terreno come b-FGF, PDGF, IL-8 e HGF (Gralepp e Leong., 1995; Xin *et al.*, 2001) possano stimolare la proliferazione mesoteliale e vicariare VEGF in sua assenza.

Coerentemente con risultati precedenti (Waheed *et al.*, 1999), il livello di espressione di Tag richiesto per indurre gli effetti biologici osservati in cellule di MM è stato molto basso, tanto che l'espressione di questo antigene è stata dimostrabile solo mediante RT-PCR ma non in

immunoblotting, a differenza delle cellule trasfettate stabilmente che esprimono molta più proteina. Una spiegazione plausibile è che nelle cellule di MM, Tag non sia il solo meccanismo necessario per trasformare la cellula ma che si verifichino contemporaneamente altri danni a carico di molecole implicate nel ciclo cellulare, come le proteine ARF (Chao *et al.*, 2000), la cui ridotta espressione rende le cellule incapaci di riparare qualunque danno a carico del DNA, favorendo pertanto la sovrersione dei normali meccanismi di controllo cellulari.

Nell'insieme i nostri dati confermano che SV40, presente negli U.S.A. e in Europa in almeno il 60% dei MM umani (Carbone *et al.*, 1999), gioca un ruolo importante nello sviluppo di questa neoplasia. SV40 agirebbe come un cocarcinogeno, come dimostrato nel saggio di trasformazione dopo esposizione prolungata a fibre di asbesto, non solo inattivando proteine coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare (Carbone *et al.*, 1997; De Luca *et al.*, 1997) ma anche inducendo l'espressione di specifici fattori di crescita tra cui HGF (Cacciotti *et al.*, 2001) e VEGF (Cacciotti *et al.*, 2002).

Inoltre, in considerazione del fatto che il nostro studio è stato condotto su cellule ottenute dall'essudato pleurico di pazienti e non solo su trasfettanti prodotti *in vitro*, è ragionevole pensare che i meccanismi descritti si verifichino in modo analogo *in vivo*.

I clinici dovrebbero tener conto di questi risultati in caso di osservazione di placche pleuriche nei pazienti, in quanto spesso SV40 infetta cellule HMC iperplastiche (Shivapurkar *et al.*, 1999), che potrebbero essere, alla luce dei nostri dati, ad alto rischio di trasformazione. Inoltre, vista l'importanza di HGF e VEGF nel MM, la ricerca farmacologica dovrebbe svolgere specifici *trials clinici* a base di farmaci anti-angiogenici, che potrebbero rivelarsi utili nella terapia del MM.

Un altro scopo di questo lavoro è stato quello di scoprire i meccanismi alla base della aumentata resistenza ad apoptosi delle cellule di MM e di chiarire se HGF potesse essere

implicato in questo processo. Il nostro studio ci ha portato ad evidenziare **due vie di traduzione del segnale responsabili di tale resistenza**, quella di **PI3K/Akt** e quella di **I κ B/NF- κ B**, **che potrebbero contribuire in cooperazione con SV40 alla carcinogenesi del MM conseguente all'esposizione ad asbesto**.

Abbiamo dimostrato che la via di PI3K/Akt è attivata in modo Tag-dipendente e conferisce progressiva resistenza all'apoptosi impedendo l'aumentata espressione in membrana del recettore di morte CD95/Fas. Al contrario, l'inibizione dell'attivazione di Erk1/2 non ha effetti sulla citotossicità delle HMC, nonostante la traslocazione al nucleo delle MAPK sia stata totalmente abrogata dall'inibitore specifico.

Un livello di apoptosi significativamente più elevato è stato osservato in cellule TagM-HMC rispetto alle Tag-HMC, a riprova del ruolo anti-apoptotico di HGF. Questi risultati sono di supporto a recenti dati che mostrano che l'iperespressione di Rb è in grado di ripristinare la sensibilità alle radiazioni di cellule di glioblastoma (Pucci *et al.*, 2002). L'effetto di protezione di HGF in cellule mesoteliali è stato anche confermato dalla aumentata resistenza all'apoptosi dopo l'aggiunta di rh-HGF a cellule Tag-negative e dalla reversione del *survival* di cellule Tag-positive incubate con anticorpi anti-HGF bloccanti.

Esistono numerose prove che l'*early region* di SV40 conferisca resistenza all'apoptosi in diversi tipi cellulari (Gillet *et al.*, 2001; Sheard e Vojtesek, 2002; Slinsky *et al.*, 1999; Yu e Alwine, 2002). L'espressione di Tag ricombinante in cellule di MM esercita effetto anti-apoptotico, revertito da RNA antisense a Tag (Waheed *et al.*, 1999). D'altro canto, è stata osservata apoptosi Tag-dipendente in cellule mesoteliali di ratto esposte a crocidolite (Levrèse *et al.*, 1998). Queste discrepanze potrebbero essere dovute alla differente origine delle cellule mesoteliali o a differenze nel livello di espressione di Tag (Foddis *et al.*, 2002).

Diverse osservazioni sono a supporto all' effetto anti-apoptotico di HGF da noi descritto (Bowers *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002; Xiao *et al.*, 2001). Inoltre i nostri risultati forniscono la prima dimostrazione che il *survival* si verifica in cellule in cui SV40 è stato identificato prima ancora dello stabilirsi della coltura cellulare. E' assolutamente probabile che i nostri modelli rispecchino la effettiva attivazione costitutiva di Akt che si verifica *in vivo* in cellule pleuriche SV40-positive, durante l'insorgenza e la progressione della neoplasia.

Un collegamento tra SV40, Akt e il recettore CD95/Fas è stato dimostrato in diversi lavori (Gillet *et al.*, 2001; Sheard e Vojtesek, 2002; Soini *et al.*, 1999; Yu e Alwine, 2002). I nostri dati mostrano che l' attivazione di Akt inibisce l' aumento di espressione di CD95 conseguente all'esposizione a tossici e in tal modo risulta spiegabile l' effetto anti-apoptotico osservato nelle linee SV40-positive.

Bcl-2 e Bax non sono invece risultati condizionati dall' attivazione di Akt, a conferma del loro ruolo secondario nella regolazione dell' apoptosi nei MM (Narasimhan *et al.*, 1998; Soini *et al.*, 1999).

Infine, abbiamo mostrato che un' esposizione prolungata delle SV40-HMC all' asbesto induce progressiva resistenza ad apoptosi e trasformazione cellulare. In particolare, da questi esperimenti è emerso che l' intera *early region* di SV40 è necessaria per esercitare tutti gli effetti biologici di cui il virus è capace, inclusa la trasformazione, a conferma di precedenti osservazioni (Bocchetta *et al.*, 2000; Cacciotti *et al.*, 2001; Foddis *et al.*, 2002).

Nell' insieme i nostri dati rivelano che ***l' attivazione di PI3K/Akt è HGF-dipendente solo nelle prime fasi del processo di trasformazione***, finché i sistemi di controllo del ciclo cellulare sono ancora efficienti, mentre a trasformazione avvenuta e in cellule di MM SV40-positive, tale attivazione è HGF-indipendente, benché HGF possa ancora attivare tale pathway in cellule

SV40-negative. Non si può escludere che l'attivazione di Akt osservata nelle cellule pienamente trasformate sia dovuta ad amplificazione o selettiva iperespressione di specifiche isoforme della PI3K, come descritto di recente in svariati tipi di tumore (Arcaro *et al.*, 2002; Stein, 2001).

L'analisi immunohistochemica di campioni di MM offre l'evidenza di un collegamento esistente *in vivo* tra attivazione di Akt e Tag. L'attivazione di Akt potrebbe essere anche conseguenza di una stimolazione paracrina da parte di HGF o altri fattori di crescita.

I nostri dati dimostrano che **la via di PI3K/Akt è un ottimo bersaglio farmacologico in vivo** che potrebbe essere antagonizzato per contrastare la co-carcinogenesi di SV40 ed asbesto e la progressiva resistenza alla citotossicità di cellule SV40-positivo. In altri tumori umani (tumore dell'ovaio, della cervice, della mammella e del colon), è stata osservata amplificazione e/o iperespressione di PI3K, suggerendo che l'abrogazione di questa via renderebbe più sensibili tali tumori alla chemioterapia. Data l'alta resistenza alla chemioterapia dei MM (Zellos e Sugarbaker, 2002) e l'ampia casistica di MM SV40-positivi, potrebbe essere prioritaria la ricerca e l'identificazione delle sequenze di SV40 e dell'attivazione di PI3K/Akt per eseguire una terapia mirata.

Abbiamo anche dimostrato che la via di I κ B- α /NF- κ B è a sua volta implicata nella trasformazione mesoteliale e nella resistenza alla citotossicità. NF- κ B conferisce resistenza alla morte cellulare ai MM indipendentemente dalla presenza o meno di SV40, così come in cellule HMC esposte ad asbesto o in cellule SV40-HMC F derivate dai foci di trasformazione. L'esposizione ad asbesto induce NF- κ B, mentre il trattamento con l'inibitore specifico Bay11-7082 riduce drasticamente la citotossicità da asbesto.

Questi risultati indicano che NF-kB gioca un ruolo autonomo nella resistenza da citotossicità. Comunque, nei nostri esperimenti l'attivazione di Akt SV40-dipendente sembra essere sempre richiesta per ottenere un fenotipo completamente trasformato, a conferma del suo ruolo critico nella progressione della tumorigenesi (Hutchinson *et al.*, 2001).

Abbiamo confermato che HGF può indurre attivazione di NF-kB in cellule epiteliali MLP-29, benché né correlata a *survival* né ad attivazione di PI3K/Akt (Muller *et al.*, 2002). NF-kB non è invece risultato attivabile da HGF in cellule HMC e di MM, mentre è costitutivamente attivato nelle stesse cellule completamente trasformate e inibibile con Bay11-7082.

Diversi fattori di crescita tra cui il Platelet Derived Growth Factor (PDGF) e l'Epidermal Growth Factor (EGF) sono candidati per l'attivazione di NF-kB. I nostri dati dimostrano che né l'inibitore generico delle tirosina chinasi, Genisteina, né i più specifici inibitori di Src (PP2), delle MAPK (PD169316 e PD98059) e di PI3K (Wortmannin) agiscono sull'attivazione di NF-kB, pertanto il meccanismo di attivazione di NF-kB è ancora al momento ignoto.

I dati ottenuti hanno chiaramente dimostrato l'esistenza nel modello del MM di una cooperazione tra fattori virali e cellulari nella trasformazione maligna e in particolare come il Tag di SV40 possa agire indirettamente sulla fosforilazione di chinasi come Met, Akt e NF-kB. Small t antigen a sua volta può influire sullo stato di fosforilazione delle proteine cellulari, grazie alla sua capacità di inattivare la fosfatasi PP2A (Rundell e Parkati, 2001).

In tal modo l'*early region* di SV40 può condizionare l'attivazione di importanti trasduttori del segnale. Pertanto, abbiamo voluto studiare, mediante l'uso di tecniche di *proteomica*, le ***diversità nel profilo di fosforilazione in tirosina osservabile in cellule mesoteliali e di mesotelioma SV40 positive e SV40 negative.***

Nonostante si sia riscontrato un problema di esigua quantità di fosfoproteine nelle preparazioni derivate dagli immunoprecipitati, che ha reso impossibile l'analisi vera e propria in spettrometria di massa, è comunque stata confermata dall'esame comparato della separazione elettroforetica l'esistenza di numerose differenze nei profili di fosforilazione in tirosina di cellule di mesotelioma SV40 negative e positive, la cui natura dovrà esser meglio chiarita in seguito.

SV40 resta comunque solo un co-carcinogeno del MM mentre il principale fattore di rischio è inequivocabilmente costituito dall'esposizione alle fibre d'asbesto, capaci di indurre danno ossidativo sul mesotelio. I nostri risultati hanno dimostrato che accanto alle fibre note da tempo per la loro cancerogenicità, ve ne sono altre (erionite-Karain e erionite-Oregon) simili per morfologia e comportamento, e pertanto dette *asbestiformi*, che hanno potenzialità cancerogena grazie alla bassa citotossicità, presumibilmente dovuta al basso contenuto in ferro, (Eborn *et al.*, 1995) e all'elevato stimolo proliferativo nei confronti del mesotelio umano.

Inoltre, mentre l'aumento di neosintesi di DNA osservato dopo esposizione a breve termine (24 h) a fibre di erionite è risultato correlato ad un reale aumento di proliferazione, la neosintesi di DNA conseguente ad analogo trattamento con le fibre d'asbesto è parsa essere utile esclusivamente a compensare i danni al DNA provocati dalle fibre, piuttosto che a sostenere la crescita cellulare. Questo dato conferma che le fibre di erionite, a differenza delle altre, sono capaci già in tempi estremamente brevi di indurre i primi danni a carico di molecole implicate nella regolazione del ciclo cellulare, gettando così le basi per la successiva trasformazione.

Le fibre di erionite inducono trasformazione delle HMC in cellule altamente proliferanti, resistenti ad apoptosi, dotate di attivazione di molecole segnale cruciali come NF-kB, Akt ed Erk2 e di iperespressione dei recettori tirosina chinasi Met, EGFR e PDGFR β , che potrebbe aumentare la sensibilità nei confronti dei rispettivi ligandi.

La caratterizzazione dimensionale delle fibre usate ha inoltre portato ad osservare che il numero di fibre per unità di peso appartenente alla categoria dimensionale più pericolosa ai fini della tumorigenesi del MM (Lunghezza > 8 μM e Diametro $\leq 0.5 \mu\text{M}$ - Stanton *et al.*, 1977) è sensibilmente minore nel campione di erionite-Karain (26.4 %) rispetto a quelli di asbesto UICC, quasi interamente composti da fibre lunghe e sottili. Il campione di erionite-Oregon contiene invece solo una piccola percentuale di materiale non fibroso e la percentuale di fibre ad alto rischio è risultata superiore (41.8%) rispetto al campione turco.

Sulla base di questi dati possiamo ipotizzare che, nonostante sia basso il numero di fibre di erionite con caratteristiche morfologiche tipiche delle fibre ad alto rischio, tale numero è comunque sufficiente per indurre trasformazione. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che, nella frazione di fibre ad alto rischio del campione turco, le fibre sono risultate generalmente molto più corte che negli altri campioni, caratteristica che favorirebbe l'assorbimento per fagocitosi da parte delle HMC e il successivo danno meccanico ai cromosomi.

Abbiamo dimostrato che **le fibre di erionite inducono trasformazione mesoteliale di per sé, anche in assenza di SV40**. Questo potrebbe spiegare come mai in Cappadocia, regione della Turchia, dove il virus SV40 non è mai stato isolato, vi sia comunque un'alta incidenza di MM (Emri *et al.*, 2000).

L'erionite è una Zeolite presente in svariate parti del mondo, inclusi gli U.S.A. (Erionite-Oregon), dove invece il virus SV40 è stato isolato (De Rienzo *et al.*, 2002). Il minor numero di *foci* osservato dopo esposizione prolungata di HMC a questo tipo di erionite rispetto a quella turca, corrispondente al potenziale trasformante delle fibre, suggerisce che l'erionite americana possa essere meno cancerogena anche *in vivo* e che sia richiesta la presenza di SV40 o di altri cofattori per indurre trasformazione maligna, proprio come nel caso delle fibre di amosite come emerso dai nostri risultati.

Questi dati *in vitro* ossia su modelli cellulari andranno ovviamente confermati da risultati *in vivo* su modelli animali, per verificare se le cellule trasformate dalle fibre portino alla formazione di masse tumorali analoghe ai mesoteliomi.

Infine, ***le fibre di fluoroedenite si sono rivelate dotate di proprietà del tutto analoghe agli altri anfiboli***, tra cui alta citotossicità come l' amosite. Non è escluso che anche in questo caso il potenziale trasformante di queste nuove fibre isolate a Biancavilla (CT) si manifesti solo in presenza di altri fattori di rischio quali l' infezione da parte del virus SV40, così come non possiamo escludere che le stesse fibre di erionite subiscano un potenziamento della propria cancerogenicità in presenza del virus SV40..

In conclusione, tutti i dati raccolti dimostrano nel caso del MM pleurico l' esistenza di una cooperazione, che si esplica con svariate modalità, tra fattori ambientali (fibre d'asbesto/asbestiformi), virali (SV40) e cellulari (attivazione di proto-oncogeni).

Abbiamo inoltre individuato e chiarito il significato funzionale di alcuni *bersagli molecolari*, che dovranno essere *centrati* dalla successiva *ricerca di trasferimento* con farmaci appropriati, aggredendo in modo specifico e selettivo solo le cellule tumorali di MM, lasciando intatte le cellule normali.

I risultati di queste attività di ricerca di base daranno indicazioni alla *ricerca clinica* che, mediante l' impiego dei nuovi farmaci selettivi, permetterà di limitare il più possibile gli effetti collaterali delle terapie tradizionali, migliorando nel contempo sia la qualità di vita dei pazienti, sia i risultati terapeutici.

Al momento, sembrano essere molto incoraggianti dati preliminari ottenuti nel nostro laboratorio dopo trattamento di cellule di MM con *Taurolidina*, un antisettico utilizzato da anni con successo nella pratica clinica e chirurgica (Billing *et al.*, 1992). Questo farmaco si è rivelato

selettivamente tossico sulle cellule di mesotelioma, mentre è risultato praticamente del tutto innocuo sulle cellule sane mesoteliali. Il seguito di questa ricerca sarà indirizzato a chiarire il meccanismo d'azione di questo farmaco "vecchio e nuovo" nello stesso tempo, che si presenta molto promettente per la terapia del mesotelioma.

Stiamo anche iniziando a valutare l'efficacia di una serie di trattamenti combinati a base di più farmaci, alcuni già noti da tempo, come la *Gemcitabina (Gemzar®)* (Kindler e van Meerbeeck, 2002), altri più nuovi come *l' Imatinib mesilato o STI571 (Gleevec®)* (Manley *et al.*, 2002).

Quest'ultimo è un inibitore selettivo delle tirosina chinasi bcr-abl, c-kit e PDGFR- β (George, 2001). Dai nostri dati è emerso che il recettore del PDGF (PDGFR) è espresso frequentemente dalle cellule di MM e potrebbe essere un bersaglio di STI571, farmaco già stato sperimentato con successo su pazienti affetti da leucemia mieloide cronica e tuttora in corso di studio per il trattamento di alcune neoplasie solide come il tumore stromale gastrointestinale, il dermatofibrosarcoma, il glioblastoma e il tumore del polmone a piccole cellule (SCLC) (Krystal *et al.*, 2000). In base ai nostri dati preliminari, STI571 sembrerebbe essere un farmaco molto promettente vista la capacità di indurre selettivamente apoptosi sui mesoteliomi PDGFR β positivi, attraverso il blocco della sua attivazione e del pathway di PI3K/Akt, che abbiamo chiaramente dimostrato essere fondamentale ai fini del *survival*.

Inoltre STI571 è risultato capace di agire in sinergia con il chemioterapico Gemcitabina potenziandone gli effetti e consentendo presumibilmente *in vivo* l'impiego di questa coppia di farmaci a dosaggi terapeutici senza indurre eccessivi effetti collaterali sul paziente.