

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

Workshop Nazionale  
**Meccanismi di farmacoresistenza  
e radioresistenza delle cellule tumorali**

Istituto Superiore di Sanità  
Roma, 5-7 dicembre 2005

**RIASSUNTI**

A cura di  
Maria Cristina Quattrini e Annarica Calcabrini  
*Dipartimento di Tecnologie e Salute*

ISSN 0393-5620  
**ISTISAN Congressi**  
**05/C11**

Istituto Superiore di Sanità

**Workshop Nazionale. Meccanismi di farmacoresistenza e radioresistenza delle cellule tumorali. Istituto Superiore di Sanità. Roma, 5-7 dicembre 2005. Riassunti.**

A cura di Maria Cristina Quattrini e Annarica Calcabrini  
2005, xi, 69 p. ISTISAN Congressi 05/C11 (in italiano e inglese)

La capacità delle cellule tumorali di attivare efficaci meccanismi di difesa nei confronti degli agenti citotossici, sia chimici che fisici, costituisce un serio ostacolo al successo della chemio e della radioterapia. Il Workshop intende fornire i più recenti aggiornamenti sulle ricerche tendenti a chiarire i meccanismi subcellulari e molecolari alla base del fenomeno della resistenza delle cellule tumorali ai trattamenti chemio e radioterapici, al fine di fornire utili informazioni per l'ottimizzazione dei protocolli terapeutici. Il Workshop è rivolto sia ai ricercatori che agli operatori sanitari che svolgono la propria attività nel settore oncologico ed è articolato in quattro sessioni. La prima sessione prende in considerazione gli aspetti biologici e i problemi clinici connessi alla farmacoresistenza e alla radioresistenza. Le due sessioni centrali sono dedicate ai meccanismi, a livello cellulare e molecolare, responsabili dell'acquisizione del fenotipo resistente. Infine, nella quarta sessione vengono illustrati i nuovi approcci metodologici atti al superamento delle resistenze e vengono discusse le prospettive future che sta offrendo la ricerca in questo settore.

*Parole chiave:* Terapia antitumorale, Farmacoresistenza, Radioresistenza.

Istituto Superiore di Sanità

**National Workshop. Mechanisms of drug- and radio-resistance of tumor cells. Istituto Superiore di Sanità. Rome, 5-7 December 2005. Abstract book.**

Edited by Maria Cristina Quattrini and Annarica Calcabrini  
2005, xi, 69 p. ISTISAN Congressi 05/C11 (In Italian and English)

The capability of tumor cells of activating effective mechanisms of defence against both chemical and physical cytotoxic agents represents a serious obstacle to the successful therapy of human tumors. This Workshop intends to provide an update on the researches aimed to clarify the subcellular and molecular mechanisms underlying the resistance phenomenon of the tumor cells to chemo and radiotherapeutic treatments in order to improve therapeutic protocols. The Workshop, devoted to the researchers and health workers operating in the oncological field, is subdivided into four sessions. The first one deals with the biological aspects and the clinical problems related to both drug- and radio-resistance of tumor cells. Two sessions are dedicated to the cellular mechanisms responsible for the resistant phenotype against both radio and chemotherapy. The fourth session presents the new methodological approaches aimed to overcome the resistance and discusses the future perspectives offered in this field by scientific research.

*Key words:* Anticancer therapy, Drug-resistance, Radio-resistance.

Per informazioni su questo documento scrivere a: [arancia@iss.it](mailto:arancia@iss.it)

Il rapporto è disponibile on line sul sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it)

---

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Egiziana Colletta e Patrizia Mochi*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© 2005 Istituto Superiore di Sanità (Viale Regina Elena, 299 - 00161 Roma)

Il Workshop è stato organizzato da:

Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità (ISS) (<http://www.iss.it>)

Associazione Italiana di Colture Cellulari (ONLUS-AICC) (<http://www.onlus-aicc.org>)

Società Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni (SIRR) (<http://www.sirr.unina.it>)

Federazione Italiana Ricerche sulle Radiazioni (FIRR) (<http://biotec.casaccia.enea.it/firr>)

***Consiglio Direttivo Associazione Italiana di Colture Cellulari (ONLUS-AICC)***

G. Arancia (Presidente)

A. Pessina

C. Leonetti

R. Tiozzo

K. Scotlandi

R. Supino

***Consiglio Direttivo Società Italiana per le Ricerche sulle Radiazioni (SIRR)***

O. Sapora (Presidente)

R. De Vita

L. Guidoni

A. Ottolenghi

S. Pazzaglia

A. Saran

S. Squarcia

M. Venturi

C. Vidali

***Comitato Scientifico***

G. Arancia (Istituto Superiore di Sanità)

M. Belli (Istituto Superiore di Sanità)

A. Calcabrini (Istituto Superiore di Sanità)

R. De Vita (ENEA Centro Ricerche Casaccia)

C. Leonetti (Istituto Regina Elena)

A. Molinari (Istituto Superiore di Sanità)

O. Sapora (Istituto Superiore di Sanità)

D. Tirindelli Danesi (ENEA Centro Ricerche Casaccia)

***Segreteria Tecnica***

M.C. Quattrini (Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma)

P. Crateri (Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma)

***Relatori e Moderatori***

G. Arancia	(Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma)
G. Arcangeli	(Radioterapia Oncologica, Istituto Regina Elena, Roma)
M. Belli	(Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma)
M. Caraglia	(Farmacologia Sperimentale, Istituto Nazionale dei Tumori “Fondazione G. Pascale”, Napoli)
M. Cianfriglia	(Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma)
M. D’Incalci	(Dipartimento di Oncologia, Istituto Mario Negri, Milano)
A.R. Filippi	(SCDU Radioterapia, Università degli Studi di Torino, Torino)
G. Giaccone	(Division of Medical Oncology, Vrije Universiteit medical center, Amsterdam)
P. Marchetti	(Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi dell’Aquila)
E. Monti	(Dipartimento di Biologia Funzionale e Strutturale, Università degli Studi dell’Insubria, Varese)
R. Orecchia	(Divisione di Radioterapia, Istituto Europeo di Oncologia, Milano)
S. Pazzaglia	(Sezione di Tossicologia e Scienze Biomediche, ENEA, Casaccia, Roma)
P. Pichierri	(Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma)
U. Ricardi	(Radioterapia, Università degli Studi di Torino, Torino)
P.G. Righetti	(Dipartimento di Biotecnologie Industriali e Agroculturali, Università degli Studi di Verona, Verona)
O. Sapora	(Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma)
A. Saran	(Sezione di Tossicologia e Scienze Biomediche, ENEA, Casaccia, Roma)
D. Tirindelli Danesi	(Sezione di Tossicologia e Scienze Biomediche, ENEA, Casaccia, Roma)
A. Vecchione	(II Facoltà di Medicina e Chirurgia, Ospedale S. Andrea, Università degli Studi “La Sapienza”, Roma)
F. Zunino	(Istituto Nazionale Tumori, Milano)
G. Zupi	(Laboratorio di Chemioterapia Sperimentale e Preclinica, Istituto Regina Elena, Roma)

# INDICE

<b>Programma</b> .....	v
<b>Prima sessione</b>	
Farmacoresistenza e radioresistenza: aspetti biologici e clinici .....	1
<b>Seconda sessione</b>	
Meccanismi cellulari e molecolari della farmacoresistenza .....	13
<b>Terza sessione</b>	
Meccanismi cellulari e molecolari della radioresistenza.....	25
<b>Quarta sessione</b>	
Nuovi approcci metodologici e prospettive future .....	35
<b>Poster</b> .....	47
<b>Indice degli autori</b> .....	67



## PROGRAMMA

### Lunedì 5 dicembre 2005

- 13.00 Registrazione dei partecipanti
- 14.00 Introduzione al Workshop  
**Giuseppe Arancia, Orazio Sapora**

### Prima sessione

#### **FARMACORESISTENZA E RADIORESISTENZA: ASPETTI BIOLOGICI E CLINICI**

*Moderatori:* **Donatella Tirindelli Danesi, Aldo Vecchione**

- 14.30 *Aspetti biologici e clinici della radioresistenza*  
**Umberto Ricardi**
- 15.00 *Aspetti cellulari e farmacologici della farmacoresistenza*  
**Franco Zunino**
- 15.30 *Aspetti biologici e clinici delle combinazioni chemioradioterapiche*  
**Giorgio Arcangeli**
- 16.00 Discussione
- 16.30 Intervallo
- 17.00 *Ruolo della P-glicoproteina nei meccanismi di invasività delle cellule di melanoma umano*  
**Agnese Molinari, Marisa Colone, Massimo Gentile, Laura Toccaceli, Annarica Calcabrini, Annarita Stringaro, Giuseppina Bozzuto, Maurizio Cianfriglia, Giuseppe Arancia**
- 17.15 *Ruolo dello Insulin-like Growth Factor Receptor I (IGF-IR) nella resistenza ai farmaci*  
**Maria Cristina Manara, Stefania Benini, Massimo Serra, Piero Picci, Katia Scotlandi**
- 17.30 *Alimta e radioterapia in linee cellulari tumorali pancreatiche*  
**Maurizio Marangolo, Francesca Fanini, Livia Turci, Ermanno Emiliani**

17.45 *Modulazione delle comunicazioni giunzionali da parte dei raggi X e resveratrolo in cellule di glioblastoma umano*  
**Stefano Leone, Samanta Pino, Tommaso Cornetta, Giuliana Maria Lauro, Renata Cozzi**

18.00 Assemblee dei Soci AICC e SIRR

## **Martedì 6 dicembre 2005**

### **Seconda sessione**

#### **MECCANISMI CELLULARI E MOLECOLARI DELLA FARMACORESISTENZA**

*Moderatori: Giuseppe Arancia, Gabriella Zupi*

9.00 *Ruolo delle molecole di trasporto nei meccanismi di farmacoresistenza*  
**Maurizio Cianfriglia**

9.30 *Determinanti biochimici della farmacoresistenza e ruolo dell'ipossia*  
**Elena Monti**

10.00 *Meccanismo di azione di agenti chemiosensibilizzanti*  
**Maurizio D'Incalci**

10.30 Discussione

11.00 Intervallo

11.30 *L'ezrina è coinvolta nella farmacoresistenza mediata dalla P-glicoproteina negli osteosarcomi*  
**Francesco Lozupone, Silvia Zamboni, Angelo De Milito, Cristina Federici, Mariantonia Logozzi, Elisabetta Iessi, Maurizio Cianfriglia, Katia Scotlandi, Massimo Serra, Stefano Fais**

11.45 *P-glicoproteina (P-gp) media la resistenza alla doxorubicina in cellule di sarcoma di Kaposi*  
**Mothanje Barbara Lucia, Elisabetta Straface, Paola Matarrese, Rosa Vona, Barbara Ascione, Sergio Rutella, Walter Malorni, Roberto Cuda**

12.00 *Combinazione di inibitori della poli(ADP-riboso) polimerasi e di agenti antineoplastici in cellule "cancer prone" di atassia telangiectasia*  
**Raffaella Elli, Chiara Gabellini, Anna Antonelli, Paola Petrinelli, Liana Marcucci, Annamaria Biroccio, Nicolanna Tanzi, Gabriella Zupi**

12.15 *Effetto del nitrossido Tempol sulla resistenza di cellule di adenocarcinoma mammario con fenotipo MDR alla doxorubicina*



**Marzia B. Gariboldi, Francesca Terni, Raffaella Ravizza, Stefania Meschini,  
Manuela Marra, Maria Condello, Giuseppe Arancia, Elena Monti**

- 12.30 Cerimonia di assegnazione dei premi AICC e SIRR e relazioni dei vincitori
- 13.30 Colazione di lavoro - Visione e discussione dei poster

### **Terza sessione**

#### **MECCANISMI CELLULARI E MOLECOLARI DELLA RADIORESISTENZA**

*Moderatori: Simonetta Pazzaglia, Orazio Sapora*

- 15.00 *Possibili nuovi approcci nell'ambito dei test predittivi di radiosensibilità  
in radioterapia oncologica*  
**Andrea Riccardo Filippi**
- 15.30 *Background genetico e radioresistenza*  
**Anna Saran**
- 16.00 *Crosstalk tra intra-S checkpoint e riparazione del DNA*  
**Pietro Pichierri**
- 16.30 Discussione
- 17.00 Intervallo
- 17.30.1 *Analisi della fosforilazione dell'istone H2AX in fibroblasti umani esposti  
a radiazioni di diversa qualità*  
**Francesca Antonelli, Mauro Belli, Giacomo Cuttone, Valentina Dini, Giuseppe  
Esposito, Giustina Simone, Eugenio Sorrentino, Maria Antonella Tabocchini**
- 17.45 *Ruolo della p53 nella radiosensibilità di linee cellulari di medulloblastoma*  
**Roberta Salaroli, Tiziano Di Tomaso, Giovanna Farruggia, Silvia  
Cammelli, Maria Alessandra Santucci, Enza Barbieri, Giuseppe Nicola  
Martinelli, Giovanna Cenacchi**
- 18.00 *Ruolo della poli(ADP-ribosio)polimerasi-1 nella modulazione del danno al DNA  
indotto da radiazioni ionizzanti in cellule germinali e nell'embrione pre-impianto*  
**Eugenia Cordelli, Anna Maria Fresega, Francesca Pacchierotti, Roberto  
Ranaldi, Paola Villani**

- 18.15 *Applicazioni della <sup>1</sup>H MRS allo studio degli effetti delle radiazioni in cellule tumorali in coltura: segnali lipidici*  
**Laura Guidoni, Claudio Giovannini, Sveva Grande, Anna Maria Luciani, Alessandra Palma, Antonella Rosi, Orazio Sapora, Vincenza Viti**

**Mercoledì 7 dicembre 2005**

**Quarta sessione**

**NUOVI APPROCCI METODOLOGICI E PROSPETTIVE FUTURE**

*Moderatori: Mauro Belli, Paolo Marchetti*

- 9.00 *Targeted therapies nei tumori solidi*  
**Giuseppe Giaccone**
- 9.30 *Proteomica ed oncologia: recenti conoscenze sulla chemioresistenza delle cellule tumorali*  
**Pier Giorgio Righetti**
- 10.00 *Nuove combinazioni terapeutiche per la radiosensibilizzazione di cellule tumorali umane*  
**Michele Caraglia**
- 10.30 Intervallo
- 11.00 *Nuovi trattamenti radioterapici*  
**Roberto Orecchia**
- 11.30 Discussione
- 12.00 *L'inibizione di TRF2 induce apoptosi e sensibilizza cellule di melanoma umano al trattamento con l'*RHPS4*, un ligando del G-quadruplex telomerico*  
**Angela Rizzo, Carlo Leonetti, Eric Gilson, Gabriella Zupi, Annamaria Biroccio**
- 12.15 *Analisi dell'efficacia preclinica del PNU-159548 (ladirubicina) su cellule farmacoresistenti di osteosarcoma umano*  
**Michela Pasello, Claudia Maria Hattinger, Giuseppina Stoico, Maria Cristina Manara, Stefania Benini, Cristina Geroni, Mario Mercuri, Katia Scotlandi, Piero Picci, Massimo Serra**

- 12.30 *Possibile ruolo degli inibitori delle pompe protoniche (PPI) nel sovvertire la farmacoresistenza dei tumori umani*  
**Angelo De Milito, Massimo Spada, Agnese Molinari, Elisabetta Iessi, Licia Rivoltini, Annalisa Montinaro, Manuela Marra, Luana Lugini, Mariantonio Logozzi, Francesco Lozupone, Cristina Federici, Giorgio Parmiani, Giuseppe Arancia, Filippo Belardelli, Stefano Fais**
- 12.45 *Efficacia di protoni e ioni carbonio monoenergetici per l'inattivazione di cellule umane normali e tumorali*  
**Mauro Belli, Daniela Bettega, Paola Calzolari, Roberto Cherubini, Giacomo Cuttone, Marco Durante, Giuseppe Esposito, Yoshiya Furusawa, Silvia Gerardi, Giancarlo Gialanella, Gianfranco Grossi, Lorenzo Manti, Maria Gabriella Pugliese, Paola Scampoli, Giustina Simone, Eugenio Sorrentino, Maria Antonella Tabocchini, Lucia Tallone**
- 13.00 Discussione conclusiva
- 13.15 Verifica dell'apprendimento e valutazione del Workshop
- 13.30 Chiusura del Workshop

## POSTER

1. *La perdita della subunità integrinica beta4 riduce la tumorigenicità di cellule MCF7 e causa apoptosi in assenza di ormoni*  
**Giulia Bon, Valentina Folgiero, Laura Felicioni, Antonio Marchetti, Ada Sacchi, Rita Falcioni**
2. *Ruolo di Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3 (IGFBP-3) nel sarcoma di Ewing*  
**Stefania Benini, Monia Zuntini, Maria Cristina Manara, Pinchas Cohen, Giordano Nicoletti, Patrizia Nanni, Youngman Oh, Piero Picci, Katia Scotlandi**
3. *L'aumento di espressione di p27<sup>kip1</sup> promuove l'apoptosi indotta da paclitaxel*  
**Chiara Gabellini, Valeria Masciullo, Bruna Pucci, Paola Valdivieso, Giuseppina D'Andrilli, Marco Tafani, Giovanni Scambia, Gabriella Zupi, Antonio Giordano**
4. *Gli inibitori della poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP) per superare la chemioresistenza a metilanti e inibitori di topoisomerasi I*  
**Lucio Tentori, Carlo Leonetti, Marco Scarsella, Matteo Vergati, Alessia Muzi, Olindo Forini, Weizheng Xu, Jie Zhang, Grazia Graziani**
5. *Studi in vitro sul meccanismo di azione del lauril gallato in linee tumorali farmacosensibili e farmacoresistenti*  
**Annarica Calcabrini, Giuseppe Arancia, Pasqualina Crateri, José Manuel García-Martínez, Lorena González, Pedro González-Porqué, Daniela Trisciunglio, Jorge Martín-Pérez**
6. *Akt come promotore di sopravvivenza in cellule di sarcoma di Kaposi resistenti all'Indinavir ed alla Doxorubicina*  
**Rosa Vona, Lucrezia Gambardella, Barbara Ascione, Paola Matarrese, Mothanje Barbara Lucia, Sergio Rutella, Sabrina Basciani, Lucio Gnassi, Roberto Cauda, Walter Malorni, Elisabetta Straface**
7. *L'inibizione di IGF-IR modula l'espressione e l'attività di HIF-1alfa e aumenta la tossicità della temozolomide in cellule di glioblastoma*  
**Marzia B. Gariboldi, Francesca Mettifogo, Michela Banfi, Francesca Terni, Raffaella Ravizza, Elena Monti**
8. *Promielociti umani come sistema modello per lo studio del danno radioindotto in funzione dello stato proliferativo, differenziativo e dell'invecchiamento*  
**Beatrice Di Carlo, Arianna Cesetti, Antonella Maggi, Orazio Saporà**
9. *Frammentazione del DNA prodotta da radiazioni di diversa qualità: risultati sperimentali e teorici*  
**Giuseppe Esposito, Francesca Antonelli, Mauro Belli, Alessandro Campa, Valentina Dini, Giustina Simone, Eugenio Sorrentino, Maria Antonella Tabocchini**

10. *Induzione e riparazione del danno al DNA prodotto da raggi gamma e ioni azoto in cellule K562 attivamente proliferanti e differenziate*  
**Valentina Dini, Francesca Antonelli, Mauro Belli, Giuseppe Esposito, Orazio Sapora, Giustina Simone, Eugenio Sorrentino, Bo Stenerlow, Maria Antonella Tabocchini**
11. *Ruolo del glutatione nell'apoptosi indotta da radiazioni analizzato mediante <sup>1</sup>H MRS di cellule tumorali in coltura*  
**Anna Maria Luciani, Sveva Grande, Alessandra Palma, Claudio Giovannini, Antonella Rosi, Laura Guidoni, Orazio Sapora, Vincenza Viti**
12. *Ipossia e radiazioni ionizzanti: effetti sulle proprietà adesive e sull'espressione delle molecole di adesione in sferoidi di cellule di osteosarcoma umano MG-63*  
**Paola Indovina, Antonella Ferrante, Gabriella Rainaldi, Maria Teresa Santini**
13. *Il danno mitocondriale e il blocco del ciclo cellulare in fase G1 sono gli eventi primari di apoptosi indotta dalla PUVA in cheratinociti umani*  
**Elena Fortunato, Laura Del Giudice, Silvia Disarò, Laura Ceconet, Giuseppe Basso, Giampietro Viola**
14. *L'olio essenziale estratto dalla Malaleuca alternifolia induce apoptosi nelle cellule resistenti di melanoma umano*  
**Annarita Stringaro, Annarica Calcabrini, Marisa Colone, Laura Toccaceli, Manuela Marra, Cristiano Giordani, Marco Diociaiuti, Giuseppe Arancia, Agnese Molinari**
15. *L'estratto vegetale voacamina potenzia l'effetto citotossico della doxorubicina su cellule tumorali farmcoresistenti*  
**Stefania Meschini, Manuela Marra, Maria Condello, Annarica Calcabrini, Elena Federici, Maria Luisa Dupuis, Maurizio Cianfriglia, Giuseppe Arancia**
16. *Veicolazione di farmaci antiblastici mediante impulsi bifasici come "rescue" in neoplasie localizzate: primi risultati in animali d'affezione con neoplasie spontanee*  
**Enrico Pierluigi Spugnini**
17. *I prodotti di ossidazione enzimatica della spermina inducono citotossicità su linee tumorali umane farmcoresistenti*  
**Manuela Marra, Giuseppe Arancia, Agnese Molinari, Annarica Calcabrini, Maria Condello, Laura Toccaceli, Laura Dalla Vedova, Francesca Belli, Paola Palmigiani, Giampiero Tempera, Ludovica Marcellini, Enzo Agostinelli**
18. *L'efficacia antitumorale di retinoidi in linee cellulari umane di carcinoma del colon (LoVo MDR) e di leucemia (HL-60 MDR) polifarmcoresistenti*  
**Giovanna Bartolini, Anna Maria Ferreri, Paola Rocchi, Alessio Papi, Marina Orlandi**



**Prima sessione**

**Farmacoresistenza e radioresistenza:  
aspetti biologici e clinici**

*Moderatori*

Donatella Tirindelli Danesi, Aldo Vecchione





## ASPETTI BIOLOGICI E CLINICI DELLA RADIORESISTENZA

Umberto Ricardi, Pierfrancesco Franco, Andrea Riccardo Filippi  
*SCDU Radioterapia, Università degli Studi di Torino*

In radioterapia oncologica la radiosensibilità/radioreistenza delle neoplasie e dei tessuti sani rappresenta un problema clinico essenziale ed è fin dagli esordi oggetto di ricerca in campo radiobiologico. Nel corso del tempo, in particolare sui tessuti neoplastici, sono stati studiati differenti aspetti relativi a questo fenomeno, che oggi appare più chiaro ma non ancora per intero. Tradizionali distinzioni in categorie di radioreistenza/radiosensibilità legate all'istotipo neoplastico vengono oggi superate da considerazioni maggiormente approfondite legate ai genotipi/fenotipi cellulari e al microambiente tumorale. Inoltre la capacità tecnica di aumentare le dosi somministrabili al tumore con risparmio dei tessuti sani adiacenti fino a valori prima difficilmente raggiungibili amplia il problema della definizione di radioreistenza.

Condizioni alla base della resistenza tumorale quali l'ipossia sono state nel tempo ben descritte, con a disposizione molti dati clinici e sperimentali a supporto, mentre altri aspetti chiave, come la cosiddetta radiosensibilità intrinseca caratteristica di ogni singola cellula neoplastica, costituiscono capitoli più difficilmente esplorabili sperimentalmente. Alcune acquisizioni sono recenti: le conoscenze relative all'ipossia tumorale sono state ampliate e meglio definite. L'ossigenazione tumorale è determinata dal flusso ematico, dall'architettura capillare e dal bilancio tra apporto e consumo di ossigeno, e a causa dell'alterazione di questi parametri, virtualmente all'interno di tutte le lesioni neoplastiche di un certo volume sono presenti frazioni di cellule ipossiche. L'alterazione del flusso può causare fenomeni di ipossia "acuta", transitoria, in prevalenza sostenuti da vasocostrizione (*perfusion induced hypoxia*). Il meccanismo alla base dell'ipossia tumorale cronica (*diffusion induced hypoxia*) è legato alla complessità della struttura vascolare, con aumento delle distanze di diffusione dal capillare centrale, secondo il modello classico di Thomlinson e Gray. Aree di bassa pressione parziale di ossigeno sono state documentate attraverso l'impiego di microelettrodi sia in neoplasie sperimentali sia umane. È comunque probabile che il meccanismo alla base dell'ipossia tumorale sia in realtà più complesso, fondato anche su fattori propri delle singole neoplasie. L'importanza dell'ipossia nel modificare la risposta alle radiazioni ionizzanti è nota da molto tempo. Le cellule irradiate in presenza di ossigeno sono circa 2,5-3 volte più sensibili delle cellule irradiate in condizioni di ipossia severa (<5 mmHg).

Il meccanismo alla base dell'aumento di sensibilità dovuto alla presenza di ossigeno è in genere attribuito alla *oxygen fixation hypothesis*. Ad oggi vi è una considerevole mole di dati sperimentali e di osservazioni cliniche che confermano le prime dimostrazioni di radioreistenza dovuta a ipossia tumorale. L'ipossia cronica e le modificazioni del microambiente ad essa legate agiscono con pressione selettiva sulle cellule tumorali, caratterizzate da instabilità genetica ed eterogeneità clonale. Varianti cellulari con caratteristiche tali da sopravvivere e proliferare in ambiente ipossico possono essere selezionate attraverso espansione clonale e divenire responsabili dell'instaurarsi del circolo

vizioso che porta ad una maggiore aggressività biologica. Ciò può condurre allo sviluppo di fenotipi aggressivi e conseguente aumento della capacità invasiva e metastatica, con maggiore probabilità di diffusione di malattia sia localmente sia a distanza.

Nel campo della radiosensibilità intrinseca, negli ultimi anni le scoperte in campo genetico-molecolare, attraverso la definizione di molte delle *pathways* responsabili degli effetti cellulari del danno da radiazioni (ex apoptosi, regolazione del ciclo cellulare, proliferazione, espressione genica, riparo del danno al DNA), hanno consentito di poter affrontare il problema da molteplici punti di vista. Sono state riconosciute probabili cause di radioresistenza cellulare, quali ad esempio l'over-espressione di alcuni recettori di membrana (ex EGFR), una maggior capacità di identificazione e riparo del danno al DNA, lo stato mutazionale di alcune proteine chiave nella regolazione del ciclo cellulare e dell'apoptosi. Per quanto riguarda i recettori di membrana, la famiglia Erb e in particolare EGFR e le sue *downstream pathways* appaiono non solo avere un ruolo chiave nei meccanismi di radioresistenza, ma anche possibili target per terapie mirate. La funzione di EGFR può essere alterata per over-espressione del recettore, per over-espressione del ligando, per amplificazione, per mutazione. L'attivazione del recettore esita nel complesso in un segnale pro-mitotico e proliferativo. L'over-espressione è stata da tempo correlata con resistenza a radio-chemioterapia in tumori del polmone e del distretto cervico-cefalico. Dati preclinici dimostrano che EGFR viene attivato dopo irradiazione e che vi è una relazione inversa tra over-espressione e induzione di apoptosi *in vitro*. Dati preliminari *in vitro* con l'associazione di inibitori dell'attività tirosino-chinasica (piccole molecole o anticorpi monoclonali) di EGFR mostrano un'effetto radiosensibilizzante. Emerge un probabile ruolo di EGFR nel ripopolamento, evento chiave della radioresistenza tumorale. Le *pathway* "a valle" sembrano determinanti, in particolare quelle mediate da RAS, con interessanti dati sulla via RAF-MEK-ERK, probabilmente non essenziale, e su PI3-AkT e PKC. L'insieme dei dati disponibili è comunque ancora da "dipanare", con interessanti dati contraddittori che rendono più difficili da comprendere e più complessi tutti i fenomeni studiati. Inoltre eventi quali la neo-angiogenesi, l'apoptosi o il controllo del ciclo cellulare, studiati sempre più in dettaglio, aggiungono ulteriori elementi in tal senso.

## ASPETTI CELLULARI E FARMACOLOGICI DELLA FARMACORESISTENZA

Franco Zunino

*Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano*

La farmacoresistenza intrinseca o acquisita delle cellule tumorali è la principale causa responsabile dell'insuccesso terapeutico all'inizio del trattamento o dopo una iniziale risposta alla chemioterapia. La resistenza cellulare è una tipica caratteristica della maggior parte dei tumori, soprattutto dei tumori solidi, e riflette la capacità della cellula tumorale di sopravvivere e proliferare in condizioni di stress.

Sebbene fattori fisiologici e farmacologici, quali la concentrazione e l'esposizione/retenzione del farmaco nella sede del tumore, possano condizionare sostanzialmente l'efficacia terapeutica dei farmaci antitumorali (non solo citotossici) a livello clinico, è tuttavia evidente che la resistenza cellulare ha un ruolo critico nella mancanza di risposta del tumore alla chemioterapia. In entrambe le manifestazioni di farmacoresistenza (intrinseca o acquisita), la cellula tumorale è caratterizzata da uno stato di resistenza ad una varietà di agenti chemioterapici con differente struttura e meccanismo di azione. In generale, la farmacoresistenza cellulare è un fenomeno complesso e multifattoriale che coinvolge una varietà di meccanismi.

L'espressione dei fattori di resistenza è piuttosto eterogenea anche nell'ambito dei vari tumori dello stesso istotipo e talora nella popolazione cellulare dello stesso tumore. Questo comportamento è più evidente nello stadio avanzato della malattia e presumibilmente riflette la progressione tumorale. I meccanismi che contribuiscono allo stato di resistenza comprendono:

- *fattori di difesa cellulare*. Questi meccanismi hanno la funzione di limitare la concentrazione intracellulare del farmaco e la sua interazione con il primario bersaglio intracellulare. Questo fenomeno è alla base del fenotipo MDR (multidrug resistance) ed è attribuito alla iperespressione di sistemi di trasporto (glicoproteina P, MRP, BCRP), che sono proteine transmembrana appartenenti alla superfamiglia ABC (ATP-binding cassette). Molti agenti chemioterapici convenzionali (antracicline, camptotecine, tassani, alcaloidi della vinca, intercalanti sintetici) sono potenziali substrati per questi trasportatori, che funzionano quali pompe di efflusso mirate a rimuovere dalla cellula tossine esogene o metaboliti tossici. I trasportatori sono anche implicati in meccanismi di sequestro subcellulare del farmaco. È importante sottolineare che questi trasportatori hanno un rilevante ruolo fisiologico (barriera emato-encefalica, assorbimento intestinale, ecc.) e pertanto condizionano il comportamento farmacologico *in vivo*. Questi trasportatori, in particolare BCRP, sono espressi nelle cellule tumorali staminali, di cui rappresentano un importante meccanismo protettivo;
- *alterazioni quantitative o qualitative del bersaglio intracellulare*. Una sostanziale modificazione dell'espressione della proteina bersaglio o una sua mutazione, che causa una ridotta interazione con il farmaco, possono essere responsabili di insensibilità a farmaci bersaglio-specifici, tra cui gli inibitori di enzimi del

- metabolismo e di altre funzioni del DNA (per esempio, DNA topoisomerasi);
- *alterazioni nella risposta al danno citotossico*. Il tipo della lesione citotossica e l'entità del danno condizionano in maniera critica la risposta cellulare al trattamento farmacologico. Tuttavia anche quando il farmaco raggiunge il bersaglio intracellulare, il risultato terapeutico può dipendere dalla efficienza di riparazione del danno e/o dalla capacità di tollerare condizioni di stress. Inoltre, varie alterazioni nella segnalazione del danno e nei processi regolatori che controllano l'attivazione dell'apoptosi possono determinare insensibilità a numerosi farmaci. L'insensibilità a stimoli proapoptotici (quali il danno genetossico) può essere dovuta a specifiche alterazioni (quali, mutazioni del gene oncosoppressore p53) o ad aumentata espressione di fattori antiapoptotici. Inoltre, in presenza di danno citotossico, la cellula tumorale attiva segnali di stress che possono avere funzioni proapoptotiche o funzioni protettive rivolte alla riparazione del danno e alla sopravvivenza. Pertanto, vari difetti nei meccanismi che controllano il processo di morte cellulare riducono la suscettibilità cellulare all'apoptosi e rappresentano presumibilmente la base cellulare della resistenza intrinseca di molti tipi tumorali.

La comprensione dei meccanismi di resistenza ha fornito le basi razionali per nuovi approcci di potenziale interesse terapeutico nel tentativo di migliorare l'efficacia delle terapie convenzionali (chemio- e radioterapia).

## **ASPETTI BIOLOGICI E CLINICI DELLE COMBINAZIONI CHEMIORADIOTERAPICHE**

Giorgio Arcangeli  
*Istituto Tumori Regina Elena, Roma*

La chemioterapia può essere associata alla radioterapia per perseguire due obiettivi fondamentali, la cooperazione locale, per potenziare l'effetto della radioterapia, e la cooperazione spaziale per una attività al di fuori dei campi di trattamento radioterapici, senza esaltare le relative tossicità.

Per tale motivo sono state proposte varie sequenze, come la chemioterapia di induzione, concomitante, e adiuvante, e varie modalità di somministrazione come la somministrazione a *bolus*, mediante infusione venosa continua o protratta, o mediante infusione arteriosa.

Le varie combinazioni radioterapiche hanno contribuito in questi ultimi anni a migliorare i risultati in vari siti tumorali.

## **RUOLO DELLA P-GLICOPROTEINA NEI MECCANISMI DI INVASIVITÀ DELLE CELLULE DI MELANOMA UMANO**

Agnese Molinari (a), Marisa Colone (a), Massimo Gentile (b), Laura Toccaceli (a), Annarica Calcabrini (a), Annarita Stringaro (a), Giuseppina Bozzuto (a), Maurizio Cianfriglia (c), Giuseppe Arancia (a)

(a) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università degli Studi La Sapienza, Roma*

(c) *Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Molteplici dati di letteratura suggeriscono l'esistenza di un legame tra resistenza ai farmaci e motilità cellulare e invasività. In questo studio è stata analizzata la possibile associazione strutturale e funzionale tra la P-glicoproteina (Pgp), noto trasportatore di farmaci antitumorali, responsabile della resistenza clinica ai trattamenti chemioterapici di varie neoplasie, e la molecola di adesione multifunzionale CD44, che riveste un ruolo importante nei processi di invasività e sopravvivenza tumorale. Come modello di studio sono state utilizzate cellule in coltura di melanoma umano, le M14 WT (Pgp negative), e le loro varianti resistenti, le M14 ADR (Pgp positive).

Mediante esperimenti di doppia marcatura in microscopia confocale a scansione laser (LSCM) è stata confermata nelle cellule di melanoma l'associazione del CD44 e della Pgp con le proteine ERM. Esperimenti di co-immunoprecipitazione hanno dimostrato la stretta associazione strutturale della Pgp con il CD44 nelle membrane delle cellule M14 ADR. La doppia marcatura sequenziale, in LSCM, ha rilevato la co-localizzazione della Pgp e del CD44 nelle ruffles della membrana plasmatica e nelle vescicole intracitoplasmatiche delle cellule M14 ADR. La doppia marcatura sequenziale su criosezioni ha documentato che il CD44 e la Pgp utilizzano nell'ultima fase del trasporto intracellulare le stesse vescicole citoplasmatiche, suggerendo un comune "destino finale" sulla membrana plasmatica. Esperimenti *in vitro*, utilizzando le *transwell chamber* in presenza e in assenza di matrigel, hanno dimostrato che le cellule di melanoma con aumentata espressione di Pgp (M14 ADR) presentano maggiore motilità (circa una volta e mezzo) e invasività (circa due volte) rispetto alle cellule parentali ( $P < 0,01$ , calcolato mediante Test di Mann-Whitney). Le osservazioni di microscopia elettronica a scansione hanno confermato tali risultati. Infine, mediante l'impiego di anticorpi monoclonali specifici, è stato evidenziato il ruolo della Pgp e del CD44 nel potenziale invasivo delle cellule di melanoma. Gli anticorpi anti-CD44 e anti-Pgp inducono, infatti, un aumento della motilità e dell'invasività delle cellule resistenti di melanoma, connesso con l'aumento dell'RNA-m di alcune MMPs e con l'attivazione di ERK.

In conclusione, nelle cellule di melanoma la sovraespressione della Pgp appare associata ad un fenotipo maggiormente invasivo. La Pgp e il CD44 costituiscono un complesso molecolare sulla membrana plasmatica delle cellule resistenti, apparentemente collegato alla via MAPK/ERK. La possibilità che il trattamento chemioterapeutico possa indurre resistenza e, così, promuovere l'invasione e la metastasi tumorale, suggerisce una maggiore attenzione considerata la rilevanza clinica di tale fenomeno.

## **RUOLO DELLO *INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR RECEPTOR 1* (IGF-IR) NELLA RESISTENZA AI FARMACI**

Maria Cristina Manara, Stefania Benini, Massimo Serra, Piero Picci, Katia Scotlandi  
*Laboratorio di Ricerca Oncologica, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna*

IGF-IR è un recettore tirosinchinasico attivato da IGF-I noto avere un ruolo chiave nella trasformazione neoplastica. Diversi studi ne hanno evidenziato l'importanza anche nel sarcoma di Ewing dove risulta uno dei più promettenti bersagli terapeutici. Accanto alla sue funzioni filogeniche e di regolazione della adesione e motilità cellulare, IGF-IR protegge le cellule da una varietà di stimoli apoptotici. In particolare è noto proteggere le cellule dai danni provocati da radiazioni e farmaci chemioterapici. Studi di profilo genico hanno evidenziato una modulazione di IGF-IR e del suo principale mediatore IRS-1 in cellule di sarcoma di Ewing esprimenti MDR1 e resistenti a chemioterapici convenzionali oltre che all'ET-743, un nuovo farmaco citotossico di derivazione marina. Il blocco delle funzioni di IGF-IR, in associazione con inibitori della glicoproteina-1, è in grado di ripristinare completamente la sensibilità delle cellule. Inoltre il recettore è risultato proteggere le cellule anche dall'azione di farmaci bersaglio specifici, quali l'Herceptin, indicando quindi un coinvolgimento generale di questa molecola nel modulare la sensibilità ai trattamenti farmacologici. L'inibizione di IGF-IR ha inoltre mostrato effetto sinergico con la doxorubicina e la vincristina, permettendo quindi un abbassamento sostanziale del dosaggio di questi farmaci, con conseguente riduzione degli effetti tossici. Nel complesso, l'inibizione di IGF-IR risulta quindi importante nell'aumentare la sensibilità delle cellule di Ewing ai diversi trattamenti. Il recente sviluppo di piccole molecole inibenti in modo specifico il dominio tirosinichinasico di IGF-IR e somministrabili oralmente offre un valido strumento per l'introduzione di questo approccio molecolare nel trattamento dei pazienti con questo tumore.

## ALIMTA AND RADIOTHERAPY IN PANCREATIC CANCER CELL LINES

Maurizio Marangolo, Francesca Fanini, Livia Turci, Ermanno Emiliani  
*Dipartimento di Oncologia ed Ematologia e Istituto Oncologico Romagnolo, Ravenna*

Pancreatic cancer is one of the leading causes of cancer death in Italy; the high mortality rate results from high incidence of metastatic stage at diagnosis, a lack of adequate systemic therapy and a failure of local disease control. The combination of radiotherapy and chemotherapy, generally antimetabolites 5FU or Gemcitabine, is considered a standard treatment for inoperable disease and has been employed in adjuvant setting. Despite these efforts this therapeutic approach has resulted in very modest improvements in median survival and rare long-term survival. In recent years new drugs became available and Alimta represents a very promising new antimetabolite because by targeting different enzymes like thymidilate synthase, dihydrofolate reductase and glycinamide ribonucleotide formyl transferase, affects the synthesis of substrates necessary for cell growth and division and causes cell-cycle arrest by accumulation of cells in the S phase. Aim of this study is to investigate the combined treatment of Alimta and radiotherapy in pancreatic cancer cell lines to evaluate the potential anti-tumor activity, the correct schedules and sequences and to detect a possible synergistic or additive action. We have used three doses of radiation therapy (160, 200 and 240 centigray) and three concentrations of Alimta (100, 1000 and 10000 nanomolar) and we have determined cells viability using the Sulforhodamine-B assay performed according to the method of Skehan. Previous experiments had demonstrated the absolute refractory to radiotherapy; in the first experiment the radiotherapy was given concomitantly with the start of chemotherapy; after three doubling times the medium was changed and the cells were maintained for three additional doubling times in medium drug free. In the second experiment the radiotherapy was given sequentially to chemotherapy; after three doubling times the medium containing the drug was changed, cells were exposed to the radiotherapy and maintained for six doubling times in medium drug free. Our feeling from these preliminary data is that all cell lines tested are very radio-resistant and that Alimta seems to be active starting from doses which are lower than those employed in clinical setting. There exists a strong variation in sensitivity among pancreatic cancer cell lines, the *concomitant* addition of radiotherapy and Alimta doesn't seem to enhance radiosensitivity and in the cell line *PaCa 44* the combination is antagonistic. The *sequential* combination of Alimta and radiotherapy seems to be more effective, in particular in *PaCa 44* cell line it seems to overcome radioresistance. Of some help will be the ongoing studies on cell cycle variations and apoptosis.



## **MODULATION OF JUNCTIONAL COMMUNICATIONS BY X RAYS AND RESVERATROL IN HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS**

Stefano Leone, Samanta Pino, Tommaso Cornetta, Giuliana Maria Lauro, Renata Cozzi  
*Dipartimento di Biologia, Università degli Studi Roma Tre, Roma*

Resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) has recently been the focus of a lot of attention due to its involvement in the modulation of several biological processes, including the regulation of carcinogenesis. However the molecular mechanisms underlying this antitumorigenic activity are still not defined. A known cellular event associated with tumour promotion is the modulation of gap junction intercellular communication (GJIC) and the ability in modulating the connections may be a useful tool for the screening and the assay of chemopreventive natural products.

Gap Junctions (GJs) are collections of channels constituted by proteins encoded by the "connexins" gene family, that directly connect neighbouring cells providing cell-to-cell diffusion of small molecules. It has been proposed that GJs play a critical role in carcinogenesis and more generally in growth control, so that the loss of homologous and/or heterologous GJs occurs during the promotion/progression steps of carcinogenic *pathway*, during neuropathy and teratogenesis. Transient changes in GJs have been observed during normal cell cycles, cell communications being moderate during G1/S, increased through S and dramatically decreased during G2/M.

We investigated the effect of Resveratrol on GJICs in relation to its ability to modulate cell cycle progression, in a human glioblastoma cell line. Furthermore, because radiotherapy is the most frequently used in the management of human glial tumors, we analysed the effect of X ray treatment alone or in combination with resveratrol, in order to verify the ability of the compound to act as a radiosensitizer. A modified two-dye cytofluorimetric assay has been performed to measure GJICs in relation to cell cycle phases, and the expression of Connexin 43 and related kinases has been assayed by western blotting. Our data show that both X rays and Resveratrol increase GJICs and both agents are able to modify cell cycle progression.



**Seconda sessione**

**Meccanismi cellulari e molecolari  
della farmacoresistenza**

*Moderatori*

Giuseppe Arancia, Gabriella Zupi



## RUOLO DELLE MOLECOLE DI TRASPORTO NEI MECCANISMI DI FARMACORESISTENZA

Maurizio Cianfriglia

Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma

*Introduzione.* La farmaco resistenza multipla o MDR costituisce il maggiore ostacolo ad un esito positivo del trattamento farmacologico di tumori metastatici e malattie infettive generate da batteri o unicellulari patogeni. L'interesse verso questa emergente disciplina è dovuto al suo rilevante impatto clinico ma anche alla possibilità di riprodurre un fenomeno estremamente complesso in ben definiti sistemi cellulari *in vitro*. Ciò consente di studiare e decifrare geni e proteine funzionalmente associate con il manifestarsi del fenotipo MDR analizzando e comparando la loro differenziale espressione e funzione in cellule parentali farmaco sensibili e nelle derivate varianti farmaco resistenti. L'impegno di un gran numero di ricercatori e istituzioni sia pubbliche che private, combinato ad uno straordinario corredo di reagenti cellulari, genici e immunologici ha originato un così gran numero di conoscenze che il fenomeno MDR può essere considerato come uno dei meglio studiati e caratterizzati argomenti della oncologia sperimentale e biologia cellulare.

*P-glicoproteina.* Nell'ambito della farmacoresistenza le molecole di trasporto comunemente conosciute come *ABC transporters* svolgono una doppia funzione. Da una parte sono coinvolte nell'assorbimento e metabolismo dei farmaci, dall'altra impediscono ad una vasta gamma di composti antitumorali di esercitare la loro azione curativa. La P-glicoproteina, agendo come sistema di efflusso è capace di espellere, contro un gradiente di concentrazione e al costo di energia generata dall'idrolisi di due molecole di ATP, farmaci citotossici che flottano nello strato bi-lipidico e che vengono catturati dal cavo/i formati dall'inserzione dei 12 segmenti transmembrana che formano la struttura funzionale portante della di questo *ABC transporter*. La P-glicoproteina (ABCB1) ha focalizzato fin dalla sua identificazione una notevole attenzione per una serie di motivi che includono:

- facilità di riprodurre in sistemi cellulari *in vitro* i meccanismi genici che portano alla sua modulazione;
- semplicità tecnica con cui può essere determinata espressione e funzione;
- capacità di conferire in modo simultaneo resistenza anche nei confronti di farmaci diversi da quelli utilizzati per la sua induzione.

In particolare quest'ultimo fenomeno noto come *multidrug resistance* o MDR sebbene semplifichi in sistemi cellulari *in vitro* la complessità degli eventi che permettono alla cellula tumorale di eludere l'azione dei farmaci è stato utilizzato e con successo per ottenere un gran mole di osservazioni sui meccanismo d'azione degli *ABC transporters*.

*Altre molecole di trasporto dei farmaci.* Risultato evidente che non tutte le cellule tumorali refrattarie al trattamento con chemioterapici esprimevano la P-glicoproteina furono intrapresi studi per verificare se e in che misura altri sistemi di efflusso fossero funzionalmente associati con il fenotipo MDR. Queste ricerche portarono alla identificazione della MRP1 (*multidrug resistance associated protein 1*). MRP1 a livello strutturale è simile alla P-glicoproteina con l'eccezione di una estensione amino-terminale che contiene ulteriori 5 segmenti transmembrana. MRP1 riconosce ed è capace di

trasportare al di fuori della cellula MDR prodotti naturali neutri e idrofobici, il glutatione e suoi coniugati, ma anche una discreta gamma di substrati della P-glicoproteina che includono vincristina e doxorubicina. La scoperta di MRP1 è stata successivamente accompagnata dalla identificazione di altre molecole della stessa famiglia genica (MRP1-9) implicate a vario titolo con l'insorgenza del fenotipo MDR o l'escrezione di xenobiotici da vari tessuti dell'organismo.

*Breast Cancer Resistance Protein (BCRP).* Alcuni chemioterapici e fra questi il mitoxantrone (MXR) risultano essere dei deboli substrati sia della P-glicoproteina che di MRP1. Nondimeno il trattamento di cellule tumorali con questo farmaco (in particolare quelle derivate da carcinomi mammari) seleziona varianti resistenti che agiscono con modalità simili a quelle che over-esprimono P-glicoproteina o MRP1. Tuttavia, l'analisi genica, strutturale e funzionale di questo ulteriore meccanismo cellulare di resistenza ha evidenziato che si trattava di un nuovo *ABC transporter* (ABCG2) noto anche come *Breast Cancer Resistant Protein* (BCRP), mitoxantrone-resistance-gene (MXR) o *ABC transporter* della placenta (ABC-P). ABCG2 presenta caratteristiche peculiari (omodimero corrispondente a metà Pgp che ricava energia dall'idrolisi un solo ATP) che lo pongono filogeneticamente distante dalla P-glicoproteina e MRP ma al pari di queste due *ABC transporters* svolge un ruolo di primo piano nell'ambito della MDR.

*Considerazioni conclusive e prospettive.* Sebbene altre molecole appartenenti alla famiglia degli ABC transporters e non (LRP per esempio) siano state identificate in tempi più o meno recenti, P-glicoproteina, MRP1 e BCRP alla luce dei dati derivanti da studi clinici sono quelle che sembrano svolgere un ruolo di primo piano nella mancata risposta dei tumori all'azione dei chemioterapici. Resta comunque da mettere in evidenza che i risultati delle sperimentazioni cliniche che avevano come obiettivo la ri-sensibilizzazione dei tumori MDR mediante inibizione degli ABC transporters e della P-glicoproteina in particolare restano largamente insoddisfacenti. Questi fallimenti possono avere avuto diverse cause e non ultima la multifattorialità della MDR. Nondimeno una estrema semplificazione della P-glicoproteina che viene considerata una molecola omogenea in termini strutturali e funzionali ha certamente contribuito alla pochezza dei risultati ottenuti nei *trials* clini che avevano come razionale l'utilizzazione di inibitori di questo sistema di trasporto di farmaci per ripristinare l'azione dei chemioterapici. Per contro, come illustreremo nella presentazione, solo tenendo in considerazione la eterogenità strutturale e funzionale della P-glicoproteina e l'estrema complessità del fenomeno MDR è possibile immaginare di risolvere il problema della naturale o acquisita refrattarietà dei tumori al trattamento chemioterapico.

## DETERMINANTI BIOCHIMICI DELLA FARMACORESISTENZA E RUOLO DELL'IPOSSIA

Elena Monti

*Dipartimento di Biologia Strutturale e Funzionale, Università degli Studi dell'Insubria,  
Varese*

Per molti tumori umani la farmacoresistenza rappresenta la causa principale del fallimento del trattamento chemioterapico. Il fenomeno si può manifestare già all'inizio del trattamento (resistenza intrinseca) o insorgere successivamente (resistenza acquisita); in entrambi i casi, uno degli aspetti più preoccupanti riguarda il coinvolgimento di molteplici classi di farmaci che differiscono sia per la struttura sia per il meccanismo d'azione. Tra i fattori cellulari che contribuiscono al fenotipo resistente, una posizione di rilievo spetta ai meccanismi in grado di ridurre la concentrazione di farmaco disponibile per l'interazione con il bersaglio, primo tra tutti la sovraespressione di proteine di trasporto multispecifiche; un ruolo importante in quest'ambito è svolto anche dai sistemi di detossificazione che dipendono dal glutatione (GSH). L'aumento dei livelli intracellulari di GSH e/o dell'attività di enzimi GSH-dipendenti risulta implicato nella chemioresistenza attraverso diversi meccanismi:

- la coniugazione con il GSH, ad opera degli enzimi appartenenti alla famiglia delle glutatione-S-transferasi (GST), favorisce l'eliminazione di farmaci antitumorali di natura elettrofila, come gli agenti alchilanti;
- in passato, il ruolo di *scavenger* di specie reattive dell'ossigeno svolto dal GSH, direttamente o quale cofattore di enzimi GSH-perossidasi, è stato implicato nella resistenza tumorale alle antracicline;
- più recentemente, è emerso il legame tra livelli di GSH, con o senza il concorso delle GST, e attività di trasportatori appartenenti alla famiglia MRP (*multidrug resistance-related proteins*), implicati della resistenza a diverse classi di farmaci antitumorali, incluse le antracicline;
- infine, si è osservato che alterazioni dei livelli mitocondriali di GSH possono controllare l'innescamento della fase effettrice del processo apoptotico, modulando così la citotossicità di moltissimi agenti antineoplastici.

Interventi chemiosensibilizzanti basati sull'inibizione della biosintesi del GSH hanno mostrato qualche efficacia *in vitro*, ma il trasferimento di questo approccio alla pratica clinica si scontra con il rischio di aumentare indebitamente gli effetti tossici dei chemioterapici. Più recentemente, l'osservazione che molti tumori solidi e cellule tumorali resistenti presentano una iperattivazione del sistema GSH/GST è stata sfruttata per lo sviluppo di composti attivati selettivamente da questo sistema, che potrebbero quindi essere utilmente combinati con agenti in grado di indurre resistenza attraverso questo meccanismo. L'aumentata espressione di trasportatori di membrana, così come l'aumento dell'attività dei sistemi di detossificazione o l'espressione di forme alterate dei bersagli farmacologici, rappresentano solo alcune delle possibili manifestazioni della straordinaria capacità delle cellule di alterare il proprio genoma e/o proteoma al variare delle strategie

impiegate per combatterle, il che rende ragione dell'insorgenza di resistenza acquisita. La stessa capacità di "adattamento attivo" a condizioni di stress può spiegare anche l'esistenza di un fenotipo resistente intrinseco in cellule tumorali che non abbiano avuto precedenti esposizioni a chemioterapici. Una condizione cui le cellule che costituiscono i tumori solidi si trovano frequentemente esposte, e che può determinare profonde modificazioni adattative, è l'ipossia.

Infatti, con l'accrescimento della massa tumorale, l'inadeguata diffusione dell'ossigeno alle regioni centrali del tumore causa la formazione di foci necrotici e induce alterazioni del *pattern* di espressione genica in modo da favorire la sopravvivenza delle cellule circostanti attraverso il passaggio a un metabolismo energetico di tipo anaerobico, l'acquisizione di proprietà invasive e l'induzione della formazione di nuovi vasi. Come è ovvio, l'attivazione di vie di sopravvivenza cellulare tende a ripercuotersi in modo negativo sull'esito della chemioterapia.

Il complesso quadro di modificazioni indotte dall'ipossia è controllato principalmente dal fattore di trascrizione HIF-1 (*hypoxia-inducible factor-1*), costituito da una subunità beta espressa in modo costitutivo e da una subunità alfa, i cui livelli di espressione dipendono da meccanismi di regolazione O<sub>2</sub>-dipendenti e -indipendenti. In condizioni di normossia, HIF-1 alfa viene rapidamente degradato in seguito alla idrossilazione O<sub>2</sub>-dipendente di residui critici di prolina e alla conseguente interazione con un complesso ubiquitina-ligasico che lo indirizza alla degradazione dal parte del proteasoma; in presenza di bassi livelli di O<sub>2</sub>, HIF-1 alfa viene stabilizzato e può quindi traslocare al nucleo, dimerizzare con la subunità beta e attivare la trascrizione dei geni bersaglio. Meccanismi O<sub>2</sub>-indipendenti modulano invece prevalentemente la sintesi di HIF-1 alfa e fanno capo alla via PI3K/Akt/mTOR, su cui convergono diverse vie di trasduzione di segnali oncogenici, o al sistema p53/mdm2, la cui funzione è spesso alterata nei tumori.

Entrambe queste modalità di regolazione possono intervenire in misura variabile in diversi tipi di tumore solido, nei quali perciò l'accumulo di HIF-1 alfa e l'iperattivazione trascrizionale del dimero rappresentano eventi frequenti. Tra i prodotti dei geni bersaglio dell'azione di HIF-1, oltre a proteine implicate nel trasporto e nel metabolismo del glucosio, figurano fattori di crescita come TGF alfa e IGF-2 e i relativi recettori EGFR e IGF-IR, fattori pro-angiogenici come VEGF e pro-invasivi come la metalloproteinasi della matrice MMP2. L'alterata espressione genica indotta da HIF-1 conferisce al tumore un carattere particolarmente aggressivo, identificando questo fattore come un possibile bersaglio molecolare per lo sviluppo di nuovi chemioterapici.

Alcuni aspetti dell'azione di HIF-1 suggeriscono che un'inibizione della sua attività potrebbe aiutare a superare alcune forme di farmacoresistenza: numerosi autori hanno infatti riportato che HIF-1 è in grado di modulare i livelli di espressione/attività di trasportatori di membrana come la P-glicoproteina, di fattori pro- e antiapoptotici come Bid, Bax e Bcl-2, e di sistemi di riparazione del DNA. Per quanto riguarda il tentativo di interferire farmacologicamente con questo sistema, l'utilizzo di oligonucleotidi antisense o siRNA offre la garanzia di ottenere un'inibizione selettiva di HIF-1, ma presenta tuttora notevoli difficoltà operative. Inoltre, sono stati identificati diversi composti a basso molecolare, dotati di caratteristiche più favorevoli all'impiego *in vivo* ed eventualmente clinico, in grado di ridurre i livelli di espressione di HIF-1 alfa in modo più o meno specifico e diretto (topotecano, 2-metossiestradiolo, YC-1). Entrambi questi approcci indicano l'inibizione di HIF-1 come una possibile strategia per il controllo della crescita di



tumori che presentano iperattività di questo fattore, per il prevalere di condizioni di ipossia e/o per l'attivazione costitutiva di vie di traduzione oncogeniche. Sulla base di queste osservazioni, sembra ragionevole ipotizzare che questo tipo di intervento possa anche migliorare la risposta degli stessi tumori alla chemioterapia. A questo proposito, verranno brevemente illustrati alcuni dati preliminari ottenuti attraverso la modulazione farmacologica indiretta di HIF-1 mediante l'uso di un inibitore del recettore IGF-1R in linee cellulari di glioblastoma umano.

## **MECCANISMO DI AZIONE DI AGENTI CHEMIOSENSIBILIZZANTI**

Maurizio D'Incalci, Dario Brunelli, Tina Colombo, Giovanna Damia, Eugenio Erba,  
Cristiano Falcioni, Matteo Simone, Michele Tavecchio

*Dipartimento di Oncologia, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano*

Uno degli aspetti più studiati da molti laboratori è quello dei meccanismi di sensibilità e resistenza ai farmaci antitumorali. La conoscenza dettagliata della funzione di proteine specifiche o *pathway* che regolano il trasporto di farmaci nelle cellule tumorali e la risposta cellulare (conseguenti all'interazione del farmaco e target critici) rende possibile individuare delle nuove strategie terapeutiche basate su combinazioni tra farmaci antitumorali e sostanze che agiscono potenziando il loro effetto e/o riducendo la loro tossicità. Il tentativo di inibire i meccanismi di resistenza dovuti ad una diminuita ritenzione di farmaci nelle cellule tumorali, ad esempio per iperespressione di proteine coinvolte nell'*uptake* e nell'efflusso dei farmaci stessi, non ha avuto un successo significativo a livello clinico. Si discuterà rapidamente sulle ragioni di questo insuccesso, che comunque ha prodotto delle conoscenze importanti e aperto la strada per altre potenziali applicazioni farmacologiche relative alla biodisponibilità dei farmaci somministrati per via orale.

Si discuteranno alcune linee di ricerca in corso per modulare l'azione di farmaci utilizzando degli inibitori degli enzimi che riparano il DNA, *checkpoint* del ciclo cellulare e induttori di apoptosi. Infine si faranno degli esempi che riguardano la possibilità di inibire specificamente la tossicità di un farmaco (la epatotossicità del composto naturale di origine marina ET-743) attraverso combinazioni farmacologiche studiate a livello preclinico e successivamente applicate in sperimentazioni cliniche.

## **EZRIN IS INVOLVED IN MDR-1 MEDIATED DRUG RESISTANCE OF P-GLYCOPROTEIN OVEREXPRESSING OSTEOSARCOMA CELLS**

Francesco Lozupone (a), Silvia Zamboni (a), Angelo De Milito (a), Cristina Federici (a), Mariantonia Logozzi (a), Elisabetta Iessi (a), Maurizio Cianfriglia (a), Katia Scotlandi (b), Massimo Serra (b), Stefano Fais (a)

(a) *Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Laboratorio di Ricerca Oncologica, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna*

Overexpression of P-glycoprotein (Pgp, p170) encoded by the MDR1 gene is one of the major obstacles to successful cancer chemotherapy. However, the mechanisms underlying the regulation of Pgp functions remain unclear. Some evidences have suggested an important role of the actin cytoskeleton in Pgp-mediated multidrug resistance. Actin-filament association with a variety of cell membrane molecules is mediated by a class of highly specialized proteins, ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins. These proteins link actin filaments with several plasma membrane proteins, such as membrane receptors, and are involved in determining cell polarization. Notably, ion pumps, together with other membrane proteins, are mostly localized in well-established polarized sites of epithelial cells.

The polarization of these pumps may change depending on the distribution and composition of the cytoskeleton, as well as on the association of the pump-associated proteins with the actin cytoskeleton through the ERM. In a previous study we have shown a key role of ERM proteins to Pgp in conferring the Pgp mediated resistant phenotype. This study is aimed to characterize the role of ezrin in the P-glycoprotein mediated multi-drug resistance in osteosarcoma cells. Experiments were performed utilizing a Pgp over-expressing osteosarcoma cell line (Saos-2 DX580) stably transfected with a deletion mutant of ezrin ( $\Delta$ 146) lacking of the C-terminal actin-binding domain. In efflux assay experiments the efflux pump activity was measured and the intracellular drug (Doxorubicin) accumulation was strongly increased in the  $\Delta$ 146 transfected cells, while no effect was detected on wild type ezrin transfected cells, that behaved as the untransfected Saos-2 DX580 cells.

Therefore, on the same cells, a measurement of Doxorubicin cytotoxicity was performed. Incubation with increasing doses of Doxorubicin (0.5-500 ng/ml) induced a dose dependent susceptibility of transfected cells to the cytotoxic effect of doxorubicin, while no effect was verified on SAOS-2 DX580 cells. These preliminary results indicate a crucial role of ezrin in the MDR-1 phenotype of human osteosarcoma cells and indicate the possibility of ezrin mutants as MDR reverting agents.

## **P-GLICOPROTEINA (P-gp) MEDIA LA RESISTENZA ALLA DOXORUBICINA IN CELLULE DI SARCOMA DI KAPOSI**

Mothanje Barbara Lucia (a), Elisabetta Straface (c), Paola Matarrese (c), Rosa Vona (c), Barbara Ascione (c), Sergio Rutella (b), Walter Malorni (c), Roberto Cauda (a)

(a) *Istituto di Malattie Infettive, Università Cattolica S. Cuore, Roma*

(b) *Istituto di Ematologia, Università Cattolica S. Cuore, Roma*

(c) *Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Il Sarcoma di Kaposi (SK) rappresenta una delle patologie neoplastiche di più frequente riscontro nell'ambito della infezione/malattia da HIV sebbene la terapia antiretrovirale (*highly active antiretroviral therapy*, HAART) ha determinato una riduzione della sua incidenza. Le forme avanzate di AIDS-SK con coinvolgimento viscerale richiedono, comunque, un trattamento che attualmente prevede l'associazione della HAART con chemioterapici tra i quali le antracicline. Per quanto attiene queste ultime è nota la possibilità dello sviluppo del fenomeno di resistenza poli-farmacologica (multidrug resistance, MDR) che vede coinvolte proteine di membrana del sistema ABC tra le quali la P-glicoproteina (P-gp/MDR1) e la *multidrug resistance-associated protein 1* (MRP1). Queste ultime agiscono estrudendo dalla cellula farmaci chemioterapici substrati riducendone la concentrazione intracellulare e conseguentemente l'effetto citotossico. Le *spindle cells* del SK esprimono le suddette proteine di trasporto. Nello studio presentato abbiamo valutato la possibilità di ottenere *in vitro* una resistenza di tipo MDR in cellule SLK, linea SK-relata, mediante prolungata esposizione a concentrazioni crescenti della antraciclina, doxorubicina (DOX). Inoltre, vista la natura di substrati del sistema ABC dei farmaci antiretrovirali inibitori della proteasi (IP) unitamente al riconosciuto effetto antitumorale di questa classe di molecole, abbiamo valutato l'effetto sul fenotipo e funzione di P-gp e MRP1 dell'IP indinavir (IDV). Il fenotipo di P-gp e della MRP1 è stato valutato mediante l'utilizzo di anticorpi monoclonali specifici in citometria a flusso e statica, funzionalmente le stesse sono state analizzate utilizzando substrati naturalmente fluorescenti. La resistenza all'effetto citotossico della doxorubicina e dell'alcaloide della Vinca, vincristina (VCR) è stata valutata mediante MTT. Le linee ottenute sono state valutate per quanto attiene le caratteristiche del citoscheletro, la funzionalità del proteasoma, il ciclo cellulare e l'espressione della p53. Abbiamo ottenuto linee cellulari con espressione e funzione P-gp-relata crescente e proporzionale alla concentrazione di doxorubicina (SLK-D2→D10). Concentrazioni maggiori di DOX e di VCR risultano necessarie per ottenere un effetto citotossico significativo. Risultati simili sono stati ottenuti analizzando le linee esposte a concentrazioni di IDV tra i 30 e i 50 $\mu$ M (SLK-IDV3→IDV5). La funzionalità del proteasoma appare integra mentre le caratteristiche del citoscheletro sembrano supportare il fenotipo MDR. I risultati ottenuti suggeriscono che cellule SLK sono in grado di sviluppare un fenotipo MDR.

## **COMBINAZIONE DI INIBITORI DELLA POLI(ADP-RIBOSO)POLIMERASI E DI AGENTI ANTINEOPLASTICI IN CELLULE *CANCER PRONE* DI ATASSIA TELANGIECTASIA**

Raffaella Elli (a), Chiara Gabellini (b), Anna Antonelli (a), Paola Petrinelli (a), Liana Marcucci (a), Annamaria Biroccio (b), Nicolanna Tanzi (a), Gabriella Zupi (b)

(a) *Dipartimento di Biotecnologie Cellulari ed Ematologia, Università degli Studi La Sapienza, Roma*

(b) *Laboratorio di Chemioterapia Sperimentale, Istituto Tumori Regina Elena, Roma*

Le poli(ADP-riboso)polimerasi (PARP) costituiscono una famiglia di enzimi coinvolti nella regolazione di molti processi cellulari, tra cui il mantenimento della stabilità del genoma, compresa quella dei telomeri. In particolare la presenza di rotture a doppia elica del DNA (DSB) porta a una rapida attivazione di PARP che ha un ruolo come sensore di questo tipo di danno. Al fine di ridurre la resistenza ai farmaci delle cellule tumorali sono stati effettuati numerosi studi riguardanti gli effetti degli inibitori di PARP usati in combinazione con antineoplastici che specificamente inducono un tipo di danno al DNA che richiede PARP per la sua riparazione. Buoni risultati si sono ottenuti con la combinazione dell'agente metilante, temozolomide, con inibitori di PARP che determinano interruzione del *base excision repair*. Per contro, i dati riportati in letteratura riguardo alle interazioni fra PARP e i classici inibitori della topoisomerasi II sono controversi. Precedentemente noi abbiamo dimostrato che l'inibizione di PARP con 3-ABA protegge i linfoblasti umani normali dai danni indotti da vepesid (VP16) diminuendo sia l'apoptosi sia il danno cromosomico. In questo lavoro valutiamo l'azione dell'inibitore di PARP, 3-ABA, in associazione con gli inibitori della topoisomerasi II adriamicina (ADR) e VP16 o con il radiomimetico bleomicina (BLM) in linfociti difettivi per la proteina ATM (ATM-), derivati da individui affetti da Atassia teleangiectasia; in particolare sono stati utilizzati linfociti ATM- dove l'espressione dell'oncogene TCL1 comporta aumentata instabilità del genoma soprattutto in termini di associazioni telomeriche. La scelta delle cellule *cancer prone* ATM- è basata su evidenze che indicano costante attivazione di PARP1 in queste cellule. I parametri analizzati sono: il danno cromosomico, l'apoptosi, la lunghezza dei telomeri e l'attività telomerasica. I risultati dimostrano che:

- PARP è coinvolto nei processi di riparazione per ricombinazione omologa (HR); infatti la sua inibizione determina un aumento delle rotture cromosomiche indotte da BLM nella fase G2 del ciclo cellulare indicativo di DSB riparati essenzialmente attraverso HR; per contro, la combinazione di 3-ABA con ADR o con VP16 determina ridotti livelli sia dell'apoptosi sia del danno cromosomico (soprattutto di figure di scambio, indicative di *DSB misrejoining*). Questi dati sono in accordo con la resistenza al trattamento VP16/ADR osservata in linee cellulari murine difettive per PARP;
- in cellule ATM- non trattate con gli antineoplastici, i processi di poli(ADP)ribosilazione non sembrano coinvolti né nel mantenimento della lunghezza dei telomeri né nella funzione della telomerasi; tuttavia la loro inibizione determina un aumento di associazioni telomeriche e di instabilità cromosomica.

## **EFFETTO DEL NITROSSIDO TEMPOL SULLA RESISTENZA DI CELLULE DI ADENOCARCINOMA MAMMARIO CON FENOTIPO MDR ALLA DOXORUBICINA**

Marzia B. Gariboldi (a), Francesca Terni (a), Raffaella Ravizza (a), Stefania Meschini (b), Manuela Marra (b), Maria Condello (b), Giuseppe Arancia (b), Elena Monti (a)  
(a) *DBSF, Sezione di Farmacologia, Università degli Studi dell'Insubria, Varese*  
(b) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Lo sviluppo di un fenotipo multidrug-resistant (MDR) rappresenta uno dei principali ostacoli al successo del trattamento di numerose neoplasie con un ampio spettro di agenti chemioterapici non correlati strutturalmente, incluse le antracicline. Sono stati identificati diversi possibili meccanismi alla base della MDR, tra cui:

- ridotto accumulo del farmaco, dovuto alla sovraespressione della P-glicoproteina (P-gp) e della proteina associata alla MDR MRP-1;
- aumentata attività degli enzimi glutatione (GSH)-dipendenti;
- alterazioni del principale bersaglio del farmaco, la DNA-Topoisomerasi II;
- aumento dell'efficienza dei sistemi di riparazione del DNA;
- alterazioni nell'espressione di geni coinvolti nel processo apoptotico.

Il presente studio è stato realizzato allo scopo di valutare gli effetti del Tempol, un nitrossido piperidinico in grado di inibire la crescita di diverse linee cellulari tumorali, incluse alcune varianti MDR, su una serie di meccanismi molecolari coinvolti nella resistenza di linee cellulari di adenocarcinoma della mammella alla doxorubicina (DOX).

Gli studi di citotossicità sono stati effettuati mediante test MTT sulle cellule MCF7/WT e sulla loro variante MDR, le cellule MCF7/ADR<sup>R</sup>. L'analisi dei risultati mediante il metodo di Chou ha evidenziato un effetto sinergico tra TPL e DOX, più evidente nelle cellule MCF7/ADR<sup>R</sup>, quando l'esposizione al TPL precedeva o era concomitante a quella con DOX. Questo effetto del TPL sembra essere dovuto in parte alla sua capacità di depletare il GSH e di aumentare i livelli di perossidi intracellulari. Inoltre, il trattamento per 24 ore con il TPL è in grado di aumentare l'accumulo della DOX nelle cellule MCF7/ADR<sup>R</sup> mediante competizione con la DOX per il legame alla P-glicoproteina, come evidenziato usando uno specifico anticorpo diretto verso la forma attiva della proteina; invece MRP non sembra essere coinvolta nell'effetto del nitrossido su queste cellule. Il TPL è anche in grado di alterare l'espressione di proteine coinvolte nella risposta apoptotica al trattamento farmacologico (ad esempio p53, bcl-2, bax, p21).

Nel loro complesso, i nostri risultati indicano il TPL come un potenziale nuovo agente che potrebbe migliorare gli effetti clinici della DOX in tumori che mostrano un fenotipo resistente.

**Terza sessione**

**Meccanismi cellulari e molecolari  
della radioresistenza**

*Moderatori*

Simonetta Pazzaglia, Orazio Sapora





## POSSIBILI NUOVI APPROCCI NELL'AMBITO DEI TEST PREDITTIVI DI RADIOSENSIBILITÀ IN RADIOTERAPIA ONCOLOGICA

Andrea Riccardo Filippi, Pierfrancesco Franco, Umberto Ricardi  
*SCDU Radioterapia, Università degli Studi di Torino*

Nuovi approcci di ricerca conseguenti alle conoscenze acquisite in campo genetico-molecolare in radiobiologia clinica potrebbero consentire lo sviluppo di innovativi test predittivi di radiosensibilità dei tumori e dei tessuti sani, con conseguente maggiore individualizzazione dei trattamenti radioterapici. Nel passato recente diversi studi sperimentali sono stati disegnati in tal senso: la frazione di sopravvivenza cellulare *in vitro* dopo 2 Gy, gli studi di cinetica cellulare, la valutazione dell'ipossia tumorale, lo studio dell'apoptosi radioindotta.

Altri esempi sono la valutazione del danno cromosomale o la valutazione di singole correlazioni tra alterazioni di alcuni geni noti (p53, BRCA1) e radiosensibilità o l'eterozigosi per ATM. Nel complesso fino ad ora nessuno di questi test predittivi di correlazione, offrendo risultati contraddittori e spesso non riproducibili, è entrato nella pratica clinica. Si è inoltre compreso nel tempo che probabilmente siamo di fronte a fenomeni biologici complessi di difficile interpretazione. I dati relativi allo studio di rare malattie genetiche, la grande variabilità inter-individuale in termini di risposta alle radiazioni e le differenti risposte nello stesso individuo in diversi tessuti pongono come centrale l'ipotesi della radiosensibilità clinica quale fenomeno geneticamente controllato in modo complesso. Accettando tale ipotesi, gli studi volti ad approfondire le conoscenze e stabilire le relazioni tra il genoma e gli effetti cellulari prodotti dalle radiazioni costituiscono un valido campo di ricerca e potrebbero offrirci strumenti utili dal punto di vista predittivo.

Le possibilità sono molteplici: i dati preliminari finora disponibili indicano che l'analisi dell'espressione genica è in grado di fornirci molti dati, tuttora da interpretare e correlare con i dati clinici. Alcuni studi iniziali nell'ambito della radiosensibilità dei tumori indicano che è possibile ottenere correlazioni significative tra profili specifici di espressione e risposte tumorali. Altro capitolo importante è lo studio dei polimorfismi in geni candidati, in particolare alcuni geni-chiave delle *pathway* del riparo del danno al DNA. Dati preliminari in campo farmacogenomico indicano che è una via che può essere percorsa e primi dati in campo radiobiologico mostrano che, ad esempio, l'entità della fibrosi post-attinica in un singolo paziente è verosimilmente correlata alla presenza di alcuni polimorfismi e la presenza di più alleli "a rischio" nello stesso individuo impatta sulla comparsa e sulla gravità dell'effetto. Altro approccio è lo studio dei meccanismi di riparo del danno al DNA da un punto di vista funzionale, valutando la capacità delle cellule di riconoscere e riparare le rotture della doppia elica con un test di recente introduzione e molto sensibile quale la valutazione della fosforilazione dell'istone H2AX dopo irradiazione *in vitro*.

Nelle cellule eucariote superiori, e in particolare in quelle di origine mammifera, la cosiddetta *non-homologous end-joining recombination*, sembra essere il meccanismo più

importante nel riparo del danno del DNA, in termini di *double-strand breaks* (DSB). Tale processo coinvolge un complesso ad attività proteino-cinasi DNA-mediata, costituito da tre subunità, di cui una ad attività catalitica (DNA-PK) e due con capacità di legare le estremità del DNA, ovvero KU70 e KU80. Una quarta proteina, XRCC4, si comporta come fattore accessorio per la DNA Ligasi IV.

Mentre le conoscenze riguardo i meccanismi di riparo delle DSBs sono più cospicue e consolidate, ancora in fase di espansione sono quelle riguardanti il riconoscimento iniziale del danno al DNA. È comunemente accettato che ATM (*Ataxia Teleangiectasia Mutated protein*) abbia il ruolo di sensore nei confronti delle DSBs e che in risposta ad essi fosforili in modo immediato e sostanziale l'istone H2AX. Tale fosforilazione avviene a carico di un residuo di Serina in posizione 139 dell'estremo C-terminale dell'istone, portando alla formazione di una forma modificata dello stesso chiamata  $\gamma$ H2AX (*phosphorylated H2AX*). Tale reazione ha una rapida cinetica (*half-maximal amount* raggiunto entro 1-3 minuti) e una alta capacità di amplificazione stechiometrica (10-30 minuti dopo l'irradiazione si formano diverse migliaia di foci fosforilati per una singola DSB). Il significato funzionale di questa modificazione post-traduzionale è il reclutamento a livello del sito di rottura del DNA del complesso di riparo. Vi è, infatti, una stretta correlazione tra il *pattern* di formazione di  $\gamma$ H2AX e quello (più differito nel tempo) di reclutamento del complesso enzimatico Mre11/Rad 50/Nbs1 (detto anche *M/R/N complex*), coinvolto nel cosiddetto *DNA damage recovery*, e di altri fattori come BRCA1, aventi ruolo di *check-point protein*. Tale reperto è altresì indice di una modificazione sterica della struttura della cromatina che si accompagna alla formazione delle DSBs. La quantificazione dei foci di  $\gamma$ H2AX rappresenta un metodo sensibile per misurare il danno al DNA in termini di DSBs, all'interno di un *range* di dosi rilevanti da un punto di vista clinico. Il tasso di scomparsa della forma fosforilata dell'istone H2AX e il correlato danno residuo relativo, dopo esposizione a radiazioni ionizzanti, possono essere considerati utili indicatori di radiosensibilità o radioresistenza cellulare.

## BACKGROUND GENETICO E RADIORESISTENZA

Simonetta Pazzaglia, Maria Teresa Mancuso, Mirella Tanori, Simonetta Rebessi, Vincenzo Di Majo, Vincenzo Covelli, Anna Saran  
*ENEA, Centro Ricerche Casaccia, Roma*

La rara malattia ereditaria conosciuta come sindrome di Gorlin, è caratterizzata da una varietà di problemi clinici, tra cui anomalie di sviluppo e una predisposizione allo sviluppo di tumori cutanei a cellule basali (BCC) ed extracutanei (medulloblastoma e rabdomiosarcoma).

Mutazioni ereditarie nei pazienti affetti da tale sindrome sono state identificate nell'omologo umano del gene *patched* (*Ptc1*) di *Drosophila*. Topi knockout eterozigoti per il gene *Ptc1* (*Ptc1*<sup>+/-</sup>), che rappresentano una copia fenotipica della sindrome di Gorlin, sviluppano spontaneamente medulloblastomi e rabdomiosarcomi. Topi *Ptc1*<sup>+/-</sup> allevati su background CD1 sono inoltre predisposti all'induzione di tumori come medulloblastoma e BCC dopo esposizione a radiazioni ionizzanti.

Per valutare l'effetto di geni specifici (*tumor modifiers*) appartenenti ad un diverso background genetico, topi CD1*Ptc1*<sup>+/-</sup> sono stati accoppiati con topi altamente suscettibili (Car-S) o resistenti (Car-R) alla tumorigenesi chimica cutanea, ottenendo generazioni ibride F1S e F1R che sono state esposte a raggi X.

I risultati di questi esperimenti mostrano un effetto rilevante del background genetico sull'induzione di BCC da parte delle radiazioni, confermando che i geni multipli di suscettibilità/resistenza alla tumorigenesi cutanea segregati nelle due linee possono modulare l'induzione di BCC da parte delle radiazioni in topi *Ptc1*<sup>+/-</sup>. Questi risultati sono di rilevanza per l'uomo in vista delle possibili applicazioni di questo modello per lo studio dei geni che influenzano la radiosensibilità individuale.

*Parzialmente finanziato dal contratto ENEA-UE FI6R-CT-2003-508842 -RISC-RAD.*

## CROSSTALK TRA INTRA-S CHECKPOINT E RIPARAZIONE DEL DNA

Pietro Pichierri

*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Il DNA può essere danneggiato in vario modo da agenti esogeni ed endogeni in tutte le fasi del ciclo cellulare, tuttavia le cellule che si trovano durante la fase di replicazione del DNA sono le più suscettibili agli effetti di stress genotossici. Infatti, il danno indotto al DNA durante la fase S del ciclo cellulare può determinare, se non riparato o risolto correttamente, accumulo di riarrangiamenti cromosomici. Inoltre, il danno indotto durante la fase di replicazione può facilmente innescare il programma apoptotico, determinando una riduzione della capacità proliferativa dei tessuti. Al fine di assicurare sia il mantenimento della stabilità del genoma che la sopravvivenza cellulare, il *checkpoint* attivo nella fase S, l'*intra-S checkpoint*, coordina la replicazione del DNA con le attività riparative, la progressione del ciclo cellulare e i sistemi che controllano l'innescamento del programma apoptotico. La centralità dell'*intra-S checkpoint* nel mantenimento della stabilità del genoma, e nella riparazione delle lesioni indotte al DNA durante la replicazione, è evidenziata dal fatto che molte delle proteine che partecipano a questo *pathway*, quando mutate, sono responsabili di malattie genetiche caratterizzate da fragilità cromosomica e predisposizione al cancro. Tra queste sindromi, la sindrome di Werner, la sindrome di Bloom, l'anemia di Fanconi e le sindromi di Nijmegen e Ataxia telangiectasia-like.

In questa relazione verranno presentati dei dati a sostegno dell'ipotesi che proteine coinvolte nella risposta al danno al DNA, in particolare quello indotto da agenti che introducono *crosslink intra-strand* nel DNA, causando il collasso della forca di replicazione e l'induzione di rotture a doppio filamento, correlano funzionalmente e fisicamente con elementi del *checkpoint* *intra-S*, cooperando con essi al fine di garantire il corretto arresto del ciclo cellulare, il mantenimento dell'integrità cromosomica e la sopravvivenza cellulare. In particolare, verranno mostrati dati circa il *cross-talk* tra le proteine del *pathway* Fanconi/BRCA e il *checkpoint*. Le proteine Fanconi sono mutate nella sindrome genetica anemia di Fanconi e formano un complesso multiproteico che sembra essenziale al riparo di *crosslink* nel DNA e rotture create durante la replicazione. Recentemente, il complesso Fanconi e le due proteine associate all'insorgenza di tumori al seno ereditari, BRCA1 e BRCA2, sono state accumulate in un'unica via chiamata *pathway* FANConi/BRCA.

I dati accumulati in questi ultimi anni dal nostro gruppo hanno dimostrato che le proteine Fanconi sono essenziali anche alla corretta attivazione di altre proteine coinvolte nel *signalling* del danno indotto al DNA e nella riparazione delle rotture prodotte durante la replicazione del DNA, come il complesso MRE11 e la proteina BLM. Inoltre, usando cellule mutate in diverse componenti del complesso Fanconi abbiamo contribuito a dimostrare come proteine coinvolte nella risposta a rotture al DNA in fase S, siano richieste per garantire un efficiente arresto del ciclo cellulare, probabilmente al fine di permettere alla cellula di coordinare riparazione e recupero della replicazione. Alla fine di questa relazione, verrà presentato un modello che, a partire dai dati sperimentali, suggerisca come proteine coinvolte, a diverso titolo, nel mantenimento della stabilità del genoma, lavorino in un unico network per coordinare arresto del ciclo cellulare, riparazione e *recovery* della replicazione.

## **ANALISI DELLA FOSFORILAZIONE DELL'ISTONE H2AX IN FIBROBLASTI UMANI ESPOSTI A RADIAZIONI DI DIVERSA QUALITÀ**

Francesca Antonelli (a), Mauro Belli (a,b), Giacomo Cuttone (c), Valentina Dini (a,b), Giuseppe Esposito (a,b), Giustina Simone (a,b), Eugenio Sorrentino (a,b), Maria Antonella Tabocchini (a,b)

(a) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *INFN, Gruppo Collegato Sanità, Sezione di Roma1, Roma*

(c) *INFN, Laboratori Nazionali del Sud, Catania*

Una delle più interessanti modificazioni epigenetiche della cromatina che avvengono a seguito dell'induzione di una doppia rottura (DSB, *double strand break*) nel DNA degli organismi superiori è la fosforilazione della serina-139 presente nel motivo SQ della variante istonica H2AX. *Cluster* di istoni H2AX fosforilati ( $\gamma$ -H2AX) possono essere visualizzati mediante immunofluorescenza utilizzando anticorpi specifici. Questa tecnica consente, in linea di principio, di rilevare una singola DSB per cellula ed è quindi di estremo interesse per lo studio dell'induzione e della riparazione delle DSB a seguito di esposizione a dosi di radiazione  $\leq 1$  Gy. In particolare, la cinetica di fosforilazione-defosforilazione dell'istone  $\gamma$ -H2AX dopo esposizione a radiazioni ionizzanti può dare informazioni sulla radiosensibilità cellulare.

Le cinetiche di fosforilazione-defosforilazione dell'istone  $\gamma$ -H2AX dopo irradiazione di fibroblasti umani con una dose di 1 Gy di raggi gamma, ioni carbonio e particelle alfa, sono state analizzate per avere informazioni sull'induzione e sulla riparazione delle DSB in funzione della qualità della radiazione. I risultati ottenuti hanno mostrato diversi andamenti a seconda del tipo di radiazione considerata. In particolare, per tempi di riparazione più lunghi di 2 ore, si osserva la presenza di un maggior numero di foci residui in cellule irradiate con ioni carbonio rispetto a raggi gamma e questo numero è ancora più elevato nel caso di irradiazione con particelle alfa. Questo risultato indica che la persistenza dei foci dipende dalla qualità della radiazione. Inoltre, il numero massimo di foci è confrontabile con il numero calcolato di attraversamenti di particelle cariche in grado di produrre almeno 1 DSB. Complessivamente questi risultati sono coerenti con la presenza di un danno più complesso e raggruppato indotto da particelle cariche che risulta più difficile da riparare e quindi più severo per la cellula rispetto a quello indotto da raggi gamma.

## THE ROLE OF P53 IN THE MEDULLOBLASTOMA CELL LINE RADIOSENSITIVITY

Roberta Salaroli (a), Tiziano Di Tomaso (a), Giovanna Farruggia (b), Silvia Cammelli (a), Maria Alessandra Santucci (a), Enza Barbieri (a), Giuseppe Nicola Martinelli (a), Giovanna Cenacchi (a)

(a) *Dipartimento Clinico di Scienze Radiologiche e Istopatologiche, Università degli Studi di Bologna*

(b) *Dipartimento di Biochimica G. Moruzzi, Università degli Studi di Bologna*

Radiotherapy is a very effective treatment for medulloblastoma (MB), the most common malignant brain tumor that occur during childhood. However, response to radiations varies by individual tumor and it is often limited by tumor radiation resistance. Several factors are believed to contribute to intrinsic radioresistance of tumor including the altered activity of certain signaling *pathways* and/or the deregulated function of cell-cycle *checkpoint*. We studied two different MB cell lines, DAOY and D283MED, by cytofluorimetric analysis (cell cycle distribution and apoptotic cell fraction) at different times after ionizing radiations on the basis of cell growth curves. Cell lines, under stationary growth conditions, were irradiated with a <sup>60</sup>Co source at low dose (4 Gray) and low dose rate (~ 0,16 Gray/minute). Cell cycle distribution has been assayed by Propidium Iodine uptake between 18th and 24th hour from gamma-irradiation, according to standard techniques. We observed cell cycle arrest only in G2/M *checkpoint* in the DAOY cells while D283MED accumulated especially in G2 but also in G1 phase. The apoptotic death rate was evaluated, 48 hours after irradiation, through a two-color (YO-PRO and Propidium Iodine) assay based on changes in membrane permeability. The apoptotic death rate was greater in the DAOY than in the D283MED cells. The cell line responses to radiotherapy could be partially explained by different functional state of p53, one of the key molecules involved in mammalian cell response to ionizing radiations. The DAOY cells express, indeed, high levels of mutated p53, while the D283MED cells show only low levels of wild-type p53 as revealed by immunofluorescence and Western blot studies. At ultrastructural level DAOY appeared undifferentiated while D283MED shared features of neuronal differentiation such as the presence of few neuroendocrine granules. Our data show that undifferentiated MB cells, DAOY, featuring p53 mutation are more susceptible to genotoxic stress caused by ionizing radiations: what could be a survival advantage, indeed, turns into a disaster under radiation treatment. The more differentiated D283MED cells, harbouring wild type p53, evidence that when apoptosis is opposed, p53 might act as survival factor reducing the rate of mitotic catastrophe by keeping cells in prolonged growth arrest.

## **RUOLO DELLA POLI(ADP-RIBOSIO)POLIMERASI-1 NELLA MODULAZIONE DEL DANNO AL DNA INDOTTO DA RADIAZIONI IONIZZANTI IN CELLULE GERMINALI E NELL'EMBRIONE PRE-IMPIANTO**

Eugenia Cordelli, Anna Maria Fresegna, Francesca Pacchierotti, Roberto Ranaldi, Paola Villani

*Sezione Tossicologia e Scienze Biomediche, ENEA, Centro Ricerche Casaccia, Roma*

La poli(ADP-ribosio)polimerasi-1 (PARP-1) è una proteina nucleare attivata dalle rotture della molecola di DNA per facilitare i processi di riparazione della doppia elica. Studi biochimici con inibitori dell'attività enzimatica e modelli sperimentali *in vitro* e *in vivo* geneticamente difettivi per la funzionalità di PARP-1 hanno messo in evidenza un fenotipo di instabilità genetica e ipermutabilità in risposta alle radiazioni ionizzanti e agli agenti alchilanti. In questo studio abbiamo utilizzato topi *knockout* per la proteina PARP-1 per valutare il ruolo di questo enzima nella risposta di cellule germinali maschili e dell'embrione preimpianto all'irraggiamento con raggi X. I testicoli sono stati irraggiati con 4 Gy e il livello di danno al DNA è stato valutato nelle diverse sottopopolazioni di cellule testicolari utilizzando il test della Cometa. Inoltre, la capacità riparativa delle cellule germinali è stata studiata analizzando le cellule a tempi diversi dall'irraggiamento. Parallelamente, zigoti prodotti dall'accoppiamento di femmine PARP-1 difettive con maschi di genotipo selvatico sono stati irraggiati *in vivo* con 0.5 Gy e il danno radioindotto è stato valutato mediante determinazione immunostochimica delle doppie rotture visualizzate come foci gamma-H2AX e analisi citogenetica delle aberrazioni cromosomiche alla prima divisione di segmentazione. I risultati di questi esperimenti sono stati confrontati con quelli ottenuti nelle stesse condizioni in animali di genotipo selvatico. Il livello di danno spontaneo nelle cellule germinali difettive per PARP-1 non è risultato superiore a quello misurato nelle cellule di genotipo selvatico. Analogamente, l'irraggiamento ha indotto lo stesso livello di danno nei due ceppi di topi. Al contrario, la cinetica della riparazione è risultata rallentata nei topi PARP-1<sup>-/-</sup>. In particolare, questo difetto è risultato più evidente nella sottopopolazione degli spermatozoi immaturi. Queste cellule, caratterizzate da un elevato grado di condensazione della cromatina, probabilmente dipendono più delle altre dalla proteina PARP-1 per l'accesso degli enzimi della riparazione alla doppia elica. Lo studio condotto sugli zigoti ha messo in evidenza un ruolo della proteina PARP-1 nella modulazione della cinetica del primo ciclo di segmentazione embrionale, sia in assenza che dopo irraggiamento. Inoltre, dati preliminari sull'analisi dei foci gamma-H2AX dopo irraggiamento suggeriscono un effetto delle radiazioni maggiore negli zigoti difettivi per la proteina PARP-1. Infine i livelli di aberrazioni cromosomiche spontanee sono risultati significativamente maggiori in assenza di PARP-1, mentre non sono state osservate differenze nella risposta dei due ceppi all'irraggiamento. Questi risultati confermano il ruolo di PARP-1 nella risposta all'irraggiamento e suggeriscono che il suo coinvolgimento funzionale possa dipendere dal tipo cellulare.

## APPLICAZIONI DELLA $^1\text{H}$ MRS ALLO STUDIO DEGLI EFFETTI DELLE RADIAZIONI IN CELLULE TUMORALI IN COLTURA: SEGNALI LIPIDICI

Laura Guidoni (a), Claudio Giovannini (b), Sveva Grande (a), Anna Maria Luciani (a), Alessandra Palma (a), Antonella Rosi (a), Orazio Sapora (c), Vincenza Viti (a)

(a) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma e INFN Gruppo Collegato Sanità, Roma*

(b) *Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

Lo studio della risposta delle cellule tumorali irraggiate può fornire informazioni utili per l'identificazione di trattamenti radioterapeutici adeguati. Sotto questo aspetto, la RMN permette lo studio del metabolismo cellulare mediante l'analisi delle variazioni dei segnali associati a metaboliti selezionati. Fra i segnali caratteristici delle cellule tumorali sono stati studiati i picchi provenienti dalle catene degli acidi grassi di lipidi mobili (ML), identificati come trigliceridi (TG).

Le variazioni di questi segnali sono state frequentemente associate a variazioni nello stato proliferativo o all'instaurarsi di morte cellulare. In un precedente lavoro avevamo osservato una modulazione dei segnali ML durante la crescita in coltura, modulazione che può essere messa in relazione a variazioni nel bilancio fra produzione e consumo dei TG in seguito a variazioni nello stato proliferativo. In questo studio vengono esaminate le variazioni dei segnali  $^1\text{H}$  MRS in seguito alle modificazioni indotte dall'irraggiamento con radiazione gamma in cellule tumorali in coltura. Due linee cellulari HeLa and MCF-7, caratterizzate da diversa radioresistenza, sono state irraggiate con  $^{60}\text{Co}$  a dosi fra 5 e 20 Gy ed esaminate dopo 24, 48 e 72 ore per osservare gli effetti del trattamento sul metabolismo e sulla proliferazione. Sono state effettuate misure di  $^1\text{H}$  MRS in parallelo con misure di ciclo cellulare. In entrambe le linee cellulari il trattamento con le radiazioni ha provocato l'arresto nella fase G2. Nelle cellule MCF-7, meno radiosensibili, la presenza della proteina p53 attiva il *checkpoint* nella fase G1 che risulta aumentata, mentre la fase S è fortemente ridotta.

Nelle cellule HeLa, che non esprimono p53, non vi è accumulazione in G1 mentre la fase S non è ridotta. Parallelamente sono stati misurati i segnali degli ML negli spettri  $^1\text{H}$  MRS delle cellule intatte. Nelle cellule MCF-7 i segnali ML dei campioni irraggiati sono sempre maggiori rispetto ai corrispondenti controlli, mentre nelle cellule HeLa i campioni irraggiati ne mostrano una forte diminuzione. L'osservazione di variazioni simili nei sistemi cellulari intatti (ML) e nei corrispondenti estratti lipidici (TG) indica che i cambi di intensità dei segnali sono dovuti a cambi di concentrazione e non a traslocazione in compartimenti a diversa mobilità. Questi comportamenti non sono associabili alla presenza di apoptosi, che alcuni autori ritengono responsabile dell'aumento dei segnali ML, mentre sembra correlata al bilancio fra sintesi e degradazione lipidica.



**Quarta sessione**

**Nuovi approcci metodologici  
e prospettive future**

*Moderatori*

Mauro Belli, Paolo Marchetti



## TARGETED THERAPIES IN SOLID TUMORS

Giuseppe Giaccone

*Department of Medical Oncology, VU University Medical Center, Amsterdam*

The last 20 years have witnessed an explosion of knowledge in the biology of cancer. This new knowledge has permitted the development of new medicines targeted at specific molecular alterations present in cancer cells. Several of these new agents are being developed for solid tumors, in addition to leukemias and lymphomas, where multiple cellular and molecular defects have been described. Among the most common genetic alterations are p53 mutations and mutations of K-ras. However, so far no medicine has been developed that successfully targets these common genetic alterations. The ErbB family of tyrosine kinase receptors has been successfully targeted by several monoclonal antibodies and small molecules, and some of them are now available for the treatment of refractory non-small cell lung cancer, colon cancer and head and neck squamous cell carcinoma. Two tyrosine kinase inhibitors that target EGFR (erlotinib and gefitinib) have demonstrated a response rate in about 10% of NSCLC patients and erlotinib has also demonstrated greater survival in these patients compared to best supportive care.

The activity of these two drugs has been reproducibly shown to be related to the presence of EGFR mutations in the ATP binding site; other genetic abnormalities, such as amplification, might also help in identifying the patients who benefit from the treatment. Prospective studies testing these drugs in selected patients will be required in order to adequately validate these markers of sensitivity. Cetuximab, a monoclonal antibody to the extracellular domain of EGFR, also has similar activity in lung cancer, but the presence of EGFR mutations would not seem to be important and some degree of non-overlapping activity may be expected between monoclonals and small molecules. Cetuximab has been registered in combination with irinotecan for patients with advanced colorectal cancer refractory to irinotecan. Cetuximab in combination with radiotherapy has also improved survival in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck.

Angiogenesis inhibitors have been investigated in solid tumors. Bevacizumab in combination with chemotherapy has demonstrated increased survival compared to combination chemotherapy alone in patients with non-squamous non-small cell lung cancer, without brain metastases and serious hemoptysis, in advanced colorectal cancer in combination with chemotherapy in first line and in advanced breast cancer in combination with paclitaxel in first line. Development of other angiogenesis inhibitors or multiple targeted agents is underway.

## PROTEOMICS AND ONCOLOGY: SOME NEW INSIGHT ON CHEMORESISTANCE OF TUMOUR CELLS

Pier Giorgio Righetti (a), Annalisa Castagna (a), Paolo Antonioli (a), Daniela Cecconi (a), Natascia Campostrini (a), Sabina Carla Righetti (b), Paola M.C. Perego (b), Franco Zunino (b)  
(a) *Dipartimento di Biotecnologie Industriali e Agroculturali, Università degli Studi di Verona*  
(b) *Istituto Nazionale per lo Studio e la Cura dei Tumori, Milano*

The role of various proteins involved in drug-resistance in tumour cells is here reviewed. Two kinds of studies are covered: those performed in pre- (or early-) proteomics era and those carried out with modern proteomic tools, namely two-dimensional (electrophoretic) maps and two-dimensional chromatography. The latter studies began in 1999 and are presently those highly preferred. Two patterns have clearly emerged: whereas in the pre-proteomic studies in general one protein has been held responsible for a given chemoresistance, by analysis *via* proteomic tools entire sets of proteins have been found to be up- or down-regulated (or switched on/off) in chemoresistant tumour cell lines as compared to parental tumour lines grown in the absence of that particular drug that had induced resistance. It appears thus more realistic to think that exposure of cells to drugs results in the activation of different mechanisms of resistance. We thus favour the hypothesis that a specific drug-resistant phenotype consists of several molecular mechanisms that are simultaneously active, as demonstrated by the proteomic papers here reviewed. The families of proteins involved in chemoresistance can be classified into at least the following groups:

- group of molecular chaperones;
- group of proteins involved in drug detoxification (e.g., thioredoxin system);
- group of proteins in the ubiquitin-proteasome pathway;
- ion-channels and ion-binding proteins;
- apoptosis inhibitors.

We have enucleated, as potential targets for new drugs reversing chemoresistance, the following set of proteins, that appear in most of the studies here reviewed: heat shock protein 27 (HSP27); heat shock protein 60 (HSP60); heat shock cognate 71 kDa; heat shock protein 90 (HSP90); voltage-dependent anion selective channel protein; most members of the anti-apoptotic 14-3-3 family (14-3-3- $\gamma$ , - $\epsilon$ , - $\eta$ , - $\sigma$ , - $\zeta/\delta$ ); proteasome subunits  $\alpha$  (types 2, 5) and  $\beta$ ; stathmin; Peroxiredoxin 1, 2 & 6 and annexin I and V. It is hoped that this review will bring new insight in this field and will stimulate novel and deeper searches with proteomic tools (including pre-fractionation of subcellular organelles, such as nuclei, so as to bring to the surface low-abundance proteins that might be responsible for the onset of drug-resistance).

## **NUOVE COMBINAZIONI TERAPEUTICHE PER LA RADIOSENSIBILIZZAZIONE DI CELLULE TUMORALI UMANE**

Michele Caraglia (a), Stefano Pepe (b), Alfredo Budillon (a), Maria Chianese (b), Monica Marra (c), Francesco Sabbatino (b), Gianluca Laus (b), Alberto Abbruzzese (c), Roberto Pacelli (d)

(a) *Farmacologia Sperimentale, INT Fondazione G. Pascale, Napoli*

(b) *Dipartimento di Oncologia ed Endocrinologia Molecolare e Clinica, Università degli Studi Federico II, Napoli*

(c) *Dipartimento di Biochimica e Biofisica, SUN, Napoli*

(d) *Dipartimento Biostrutture e Bioimmagini, Università degli Studi Federico II, Napoli*

Saranno descritti i concetti generali della radioresistenza delle cellule tumorali e i più noti meccanismi molecolari alla base di essa. In maggior dettaglio verrà descritto il ruolo delle *small G proteins* come ras e rhoB nella determinazione della resistenza alle radiazioni. Inoltre verranno illustrati nostri recenti dati che suggeriscono l'esistenza di un importante *pathway* anti-apoptotico EGF-ras-dipendente nelle cellule di carcinoma squamoso testa/collo (HNSCC) esposte ad una citochina, l'interferone alfa. Sulla base di questi presupposti abbiamo ipotizzato che l'attivazione di ras è necessaria per la sopravvivenza delle cellule HNSCC sottoposte a stress di tipo farmacologico. Abbiamo quindi verificato se tali effetti si verificassero anche in seguito a stress di tipo fisico come l'esposizione a radiazioni. Nel nostro studio abbiamo quindi utilizzato l'inibitore della farnesiltransferasi (e dell'attività di ras) R115777 (Zarnestra) in combinazione con radiazioni ionizzanti e ne abbiamo valutato gli effetti sulla proliferazione e sul ciclo cellulare nelle linee cellulari KB (p53 wt) e Cal-27 (p53 mut) (HNSCC).

Allo scopo di valutare le migliori condizioni sperimentali che inducevano effetti sinergici sull'arresto della proliferazione cellulare abbiamo effettuato l'analisi degli isobogrammi ottenuti tramite uno specifico software (Calculusyn, Biosoft) basato sull'effetto mediano (by Chou and Talaly). Con questo modello matematico le condizioni di sinergismo si ottengono quando l'indice di combinazione (CI) è minore di 1,0. Quando l'indice CI è minore di 0,5 la combinazione risulta fortemente sinergica. Nel nostro sistema sperimentale, i rapporti citotossici 1:2 e 1:4 tra R115777 e radiazioni registravano un significativo sinergismo sulla inibizione proliferativa dopo 72 h di esposizione agli agenti delle cellule KB e Cal-27. Infatti, nella combinazione che risultava sinergica l'indice di combinazione  $CI_{50}$  (indice di combinazione calcolato per il 50% di sopravvivenza cellulare dall'analisi dell'isobogramma) era 0,68 e 0,60 per i rapporti 1:2 e 1:4, rispettivamente, nelle KB e 0,57 e 0,61 nelle Cal-27. Inoltre, l'indice di riduzione della dose 50 ( $DRI_{50}$ ), che rappresenta il grado di riduzione della dose ottenuta per il 50% di inibizione della crescita della combinazione raffrontata a ciascun agente da solo, risultava 5,6 (per R115777) e 2,0 (per le radiazioni) nel rapporto 1:2 e 10,9 (per R115777) e 1,9 (per le radiazioni) nel rapporto 1:4.

Sulla base dei dati derivati dal Calculusyn abbiamo valutato gli effetti di dosi crescenti di radiazioni ionizzanti (da 1 a 6 Gy) in combinazione con 0,05 e 0.1  $\mu$ M di R115777 per una

settimana sulla formazione di colonie delle cellule KB attraverso un saggio clonogenico. Abbiamo riscontrato un potenziamento dell'effetto anti-clonogenico quando radiazioni di 2 o 4 Gy erano combinate con 0,1 o 0,05  $\mu\text{M}$  di R115777. Abbiamo, inoltre, valutato gli effetti di tali combinazioni sulla distribuzione del ciclo cellulare mediante analisi citofluorimetrica al FACS dopo marcatura con ioduro di propidio.

Abbiamo riscontrato che il trattamento delle cellule KB per 72 ore con 4 Gy di radiazioni e 0,1  $\mu\text{M}$  di R115777 causava un accumulo di cellule in fase S (41% vs. 26,5 delle cellule controllo) mentre i due agenti da soli non determinavano significative variazioni nella distribuzione della fase S. D'altra parte, R115777 e radiazioni da soli causavano un incremento del numero di cellule in fase  $G_2/M$  (circa 21% vs. 13% delle cellule controllo) che non si riscontrava variato nel trattamento combinato. Nelle stesse condizioni sperimentali, l'analisi delle cellule apoptotiche al FACS con tecnica TUNEL mostrava un potenziamento dell'apoptosi nelle cellule sottoposte a trattamento combinato e un incremento della frammentazione della caspasi 3 e del suo substrato PARP nel trattamento combinato. I dati finora ottenuti ci incoraggiano allo studio di nuove strategie integrate basate sull'utilizzo combinato di inibitori della farnesilazione e le radiazioni nel trattamento di carcinomi HNSCC avanzati, anche se ulteriori esperimenti, come l'analisi dei meccanismi biochimici alla base di questi effetti sinergici, sono necessari per stabilire il setting ottimale di combinazioni da utilizzare in terapia.

*Questo lavoro è stato in parte finanziato da AIRC.*

## NUOVI TRATTAMENTI RADIOTERAPICI

Roberto Orecchia  
*Istituto Europeo di Oncologia, Milano*

Negli ultimi 10 anni si è verificato un notevole sviluppo delle tecniche di radioterapia. Oggi è possibile praticare trattamenti caratterizzati da una elevatissima precisione, con incremento delle dose totali e maggior risparmio dei tessuti sani circostanti il bersaglio.

Il ruolo dell'*imaging* è diventato fondamentale a questo scopo. La radioterapia ha abbandonato la vecchia tradizione della pianificazione in 2D, per abbracciare definitivamente l'approccio 3D-conformazionale. Già ora è possibile pensare alla quarta dimensione, vale a dire la possibilità di "vedere" l'organo bersaglio nei suoi movimenti, e di "seguirlo" colpendolo con precisione.

La relazione descriverà le più recenti tecniche di irradiazione, dalla IMRT alla stereotassica, dalla IORT alla terapia con adroni e l'impatto metodologico e clinico che queste comportano. Una parte dell'intervento sarà anche riservata alla definizione del cosiddetto "target biologico".

## **L'INIBIZIONE DI TRF2 INDUCE APOPTOSI E SENSIBILIZZA CELLULE DI MELANOMA UMANO AL TRATTAMENTO CON L'RHPS4, UN LIGANDO DEL G-QUADRUPLEX TELOMERICO**

Angela Rizzo (a), Carlo Leonetti (a), Eric Gilson (b), Gabriella Zupi (a), Annamaria Biroccio (a)  
(a) *Laboratorio di Chemioterapia Sperimentale, Istituto Tumori Regina Elena, Roma*  
(b) *Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule, Ecole Normale Supérieure de Lyon*

TRF2 (*Telomeric Repeat Binding Factor 2*) è una proteina ubiquitaria che lega direttamente l'esanucleotide TAAGGG ripetuto in tandem all'estremità telomeriche. Le multiple funzioni di TRF2 nel mantenimento strutturale e funzionale dei telomeri rendono tale proteina un interessante bersaglio terapeutico.

In questo studio abbiamo valutato gli effetti biologici dell'inibizione di TRF2 su due linee di melanoma umano entrambe positive per la telomerasi (M14 e JR5), mediante iperespressione della forma dominante negativa TRF2<sup>deltaBdeltaC</sup>.

I risultati ottenuti hanno dimostrato che TRF2<sup>deltaBdeltaC</sup> è in grado di indurre apoptosi e ridurre la tumorigenicità *in vivo* esclusivamente nella linea JR5. Lo stato funzionale di p53 e Rb e la capacità di rispondere ad agenti che inducono danno al DNA sono paragonabili nelle due linee cellulari, indicando che la resistenza della linea M14 all'inibizione di TRF2 non è attribuibile a p53/pRB o all'incapacità di attivare il programma apoptotico. Al contrario, l'analisi citogenetica della funzionalità telomerica ha dimostrato che, se paragonata all'M14, la linea JR5 possiede un alto numero di fusioni telomeriche, indicative di instabilità genomica. Lo studio dei livelli di espressione degli mRNAs che codificano per proteine che hanno un ruolo fondamentale nel mantenimento dei telomeri ha evidenziato che la linea M14 presenta una iperespressione di hTERT, TRF2, e del complesso di riparo del DNA, Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN). Infine, l'inibizione di TRF2 è in grado di sensibilizzare la linea M14 al trattamento con un nuovo ligando del G-quadruplex telomerico, l'RHPS4, mediante attivazione del programma apoptotico.

In conclusione, i dati ottenuti in questo studio dimostrano che l'inibizione di TRF2 può ridurre la crescita di cellule tumorali umane sia *in vitro* che *in vivo*. Inoltre suggeriscono che un livello basale di instabilità telomerica può essere predittivo della risposta a molecole che hanno come bersaglio TRF2 e che la combinazione con agenti che danneggiano il telomero può avere un effetto sinergico sull'inibizione della crescita di linee tumorali.



## **ANALISI DELL'EFFICACIA PRECLINICA DEL PNU-159548 (LADIRUBICINA) SU CELLULE FARMACORESISTENTI DI OSTEOSARCOMA UMANO**

Michela Pasello (a), Claudia Maria Hattinger (a), Giuseppina Stoico (a), Maria Cristina Manara (a), Stefania Benini (a), Cristina Geroni (b), Mario Mercuri (c), Katia Scotlandi (a), Piero Picci (a), Massimo Serra (a)

(a) *Laboratorio di Ricerca Oncologica, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna*

(b) *Dipartimento di Biologia, Nerviano Medical Sciences, Milano*

(c) *V Divisione, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna*

L'efficacia dell'alchliciclina 4-demetossi-3'-deamino-3'-aziridinil-4'-metilsulfonil-daunorobicina (PNU-159548, ladirubicina), un nuovo farmaco con elevata attività antitumorale in un'ampia varietà di neoplasie, è stata valutata in un pannello di 32 linee cellulari di osteosarcoma umano, comprendente 22 varianti resistenti alla doxorubicina, methotrexate, o cisplatino. Il PNU-159548 è risultato essere molto efficace in tutte le linee cellulari studiate. Non è stata riscontrata *cross-resistenza* con i farmaci convenzionali, essendo il PNU-159548 attivo anche in cellule resistenti alla doxorubicina (resistenza associata alla sovraespressione del prodotto del gene MDR1, la P-glicoproteina), così come nelle cellule resistenti al methotrexate o al cisplatino. Lo studio delle interazioni tra farmaci evidenzia che il PNU-159548 potrebbe essere somministrato in associazione con i farmaci attualmente impiegati nella terapia dell'osteosarcoma. Infatti, la contemporanea somministrazione del PNU-159548 e doxorubicina, methotrexate o cisplatino produce principalmente effetti additivi o sinergici. L'esposizione sequenziale al PNU-159548 seguito immediatamente da doxorubicina, methotrexate, o cisplatino è la sequenza più efficace di somministrazione, risultante in effetti additivi o sinergici sia nelle linee cellulari di osteosarcoma farmaco-sensibili che in quelle farmaco-resistenti. In conclusione, l'elevata efficacia *in vitro*, l'assenza di *cross-resistenza* con la doxorubicina, methotrexate, o cisplatino e la possibilità di essere somministrato in combinazione con questi farmaci, indicano il PNU-159548 come un candidato promettente da considerare nella pianificazione di nuovi protocolli terapeutici nei pazienti con osteosarcoma che non rispondono alla chemioterapia convenzionale.

## **POSSIBILE RUOLO DEGLI INIBITORI DELLE POMPE PROTONICHE (PPI) NEL SOVVERTIRE LA FARMACORESISTENZA DEI TUMORI UMANI**

Angelo De Milito (a), Massimo Spada (b), Agnese Molinari (c), Elisabetta Iessi (a), Licia Rivoltini (d), Annalisa Montinaro (a), Manuela Marra (c), Luana Lugini (b), Mariantonia Logozzi (a), Francesco Lozupone (a), Cristina Federici (a), Giorgio Parmiani (d), Giuseppe Arancia (c), Filippo Belardelli (b), Stefano Fais (a)

(a) *Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(a) *Dipartimento di Biologia Cellulare e Neuroscienze, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Unità di Immunoterapia dei Tumori Umani, Istituto Nazionale dei Tumori, Milano*

La resistenza ad agenti antitumorali è una delle maggiori cause del fallimento terapeutico in pazienti affetti da tumore. Alcuni meccanismi di farmacoresistenza a farmaci citotossici possono coinvolgere una maggiore acidificazione dell'ambiente extracellulare. Noi abbiamo valutato se gli inibitori delle pompe protoniche (PPI), attualmente usati nel trattamento anti-acido delle patologie peptiche, possono inibire l'acidificazione del microambiente tumorale, migliorando così la sensibilità delle cellule tumorali ad agenti citotossici.

Linee cellulari derivate da melanomi, adenocarcinomi e linfomi umani sono state pretrattate con i PPI omeprazolo, esomeprazolo e pantoprazolo. La risposta delle varie linee ai farmaci antitumorali è stata valutata attraverso analisi della citotossicità. Inoltre, abbiamo valutato gli effetti dei PPI sulle cellule tumorali attraverso l'analisi del pH intra/extracellulare e l'analisi dell'espressione, distribuzione e attività delle pompe protoniche vacuolari ATP-dipendenti. Queste analisi sono state effettuate con Western blot, immunoistochimica, microscopia confocale e saggi in bioluminescenza. Gli effetti del pretrattamento con PPI sono stati anche valutati *in vivo*, analizzando la crescita dei tumori umani in topi *scid/scid* inoculati con cellule di melanoma.

Il pretrattamento con PPI ha indotto la sensibilizzazione di cellule tumorali all'effetto di cisplatino, 5-fluorouracile e vinblastina. Il pretrattamento con PPI è associato all'inibizione dell'attività delle H<sup>+</sup>ATPasi vacuolari e all'aumento sia del pH extracellulare che del pH di vescicole acide intracellulari. Inoltre, il pretrattamento con PPI induce un marcato aumento della ritenzione citoplasmatica dei farmaci, con evidente localizzazione nucleare nel caso della doxorubicina. Negli esperimenti *in vivo*, il pretrattamento con omeprazolo dato per via orale ha indotto la sensibilizzazione di tumori solidi umani a farmaci antitumorali, come il cisplatino.

I nostri risultati aprono nuove prospettive per il trattamento di tumori farmaco-resistenti attraverso strategie combinatorie basate sull'uso di modulatore di pH come i PPI già ben tollerati nell'uomo.

## **EFFICACIA DI PROTONI E IONI CARBONIO MONOENERGETICI PER L'INATTIVAZIONE DI CELLULE UMANE NORMALI E TUMORALI**

Mauro Belli (a), Daniela Bettega (b), Paola Calzolari (b), Roberto Cherubini (c), Giacomo Cuttone (d), Marco Durante (e), Giuseppe Esposito (a), Yoshiya Furusawa (f), Silvia Gerardi (c), Giancarlo Gialanella (e), Gianfranco Grossi (e), Lorenzo Manti (e), Maria Gabriella Pugliese (e), Paola Scampoli (e), Giustina Simone (a), Eugenio Sorrentino (a), Maria Antonella Tabocchini (a), Lucia Tallone (b)

(a) *Istituto Superiore di Sanità e INFN Sezione Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Fisica, Università degli Studi di Milano e INFN Sezione di Milano*

(c) *INFN, Laboratori Nazionali di Legnaro, Padova*

(d) *INFN, Laboratori Nazionali del Sud, Catania*

(e) *Dipartimento di Scienze Fisiche, Università degli Studi Federico II e INFN, Sezione di Napoli*

(f) *National Institute of Radiological Sciences, Chiba*

Negli ultimi anni un crescente interesse è stato rivolto alla radioterapia con particelle cariche (adroterapia). In particolare, protoni e ioni carbonio presentano una maggiore selettività fisica rispetto ai fotoni, e, soprattutto nel caso di ioni carbonio, vantaggi dal punto di vista radiobiologico come un aumento dell'efficacia biologica relativa (RBE) a livello del picco di Bragg. Queste caratteristiche suggeriscono un vantaggio clinico nel trattamento di tumori radioresistenti localizzati in siti difficilmente trattabili con radioterapia convenzionale. In questo lavoro sono presentati i risultati di uno studio effettuato nel corso di diversi anni sull'inattivazione di quattro linee cellulari umane, due derivate da tessuti tumorali (SCC25 e SQ-20B) e due da tessuti sani/normali (HF19 e M/10), irradiate con fasci monoenergetici di protoni e di ioni carbonio. Le irradiazioni sono state effettuate presso diverse *facility*, sia in Italia (Laboratori Nazionali di Legnaro e Laboratori Nazionali del Sud dell'INFN) che in Giappone (National Institute of Radiological Sciences, Chiba), con fasci di particelle di diverso LET incidente (i.e., protoni da 7,7 a 27,5 keV/ $\mu\text{m}$  e ioni carbonio da 10 a 303 keV/ $\mu\text{m}$ ).

I risultati ottenuti hanno mostrato che, in generale, il massimo nell'andamento RBE-LET per ioni carbonio è spostato verso valori di LET più alti rispetto a quello per protoni (93,5 keV/ $\mu\text{m}$  rispetto a 27,5 keV/ $\mu\text{m}$ ) e che l'efficacia biologica relativa (RBE) per l'inattivazione indotta sia da protoni che da ioni carbonio è maggiore nel caso delle linee più radioresistenti. In particolare, la linea SQ-20B che presenta la minore sensibilità ai raggi gamma è anche quella che ha il maggior valore di RBE a seguito di trattamento con particelle cariche, con valori massimi di RBE (calcolati per un livello di inattivazione pari a quello relativo a 2 Gy di raggi gamma) di 3,2 nel caso dei protoni e 5,6 nel caso di ioni carbonio. Questi risultati sono in accordo con quanto riportato in letteratura su altre linee tumorali radioresistenti e suggeriscono che ci possa essere un vantaggio, non solo dal punto di vista fisico ma anche radiobiologico, nel trattare con particelle cariche tumori radioresistenti alla radioterapia convenzionale.



**Poster**



## **P1 LA PERDITA DELLA SUBUNITÀ INTEGRINICA BETA4 RIDUCE LA TUMORIGENICITÀ DI CELLULE MCF7 E CAUSA APOPTOSI IN ASSENZA DI ORMONI**

Giulia Bon (a), Valentina Folgiero (a), Laura Felicioni (b), Antonio Marchetti (b), Ada Sacchi (a), Rita Falcioni (a)

(a) *Laboratorio di Oncogenesi Molecolare, Dipartimento di Oncologia Sperimentale, Istituto Regina Elena, Roma*

(b) *Centro di Ricerca Clinica, Centro di Eccellenza sull'Invecchiamento, Università degli Studi di Chieti*

Un numero sempre crescente di studi vede l'integrina alfa6beta4, recettore per la laminina, fortemente coinvolta nei meccanismi di progressione e invasione tumorale. Abbiamo precedentemente dimostrato che la subunità integrinica beta4 associa con l'oncogene ErbB2 in alcune linee cellulari derivate da tumori mammari e che l'iperespressione della subunità beta4 in cellule trasformate NIH3T3/ErbB2 determina l'attivazione costitutiva di PI3K, modulando fortemente la capacità invasiva di queste cellule.

In questo studio abbiamo analizzato le conseguenze biologiche dell'inattivazione della subunità integrinica beta4 endogena tramite shRNA, in cellule tumorali mammarie.

I risultati indicano che la crescita ancoraggio-indipendente di cellule MCF7 dipende dall'espressione di beta4, confermando la rilevanza dell'espressione di beta4 in cellule tumorali mammarie. Inoltre, l'inattivazione di beta4 riduce significativamente l'attività di PI3K e la fosforilazione di AKT e mTOR endogene. Alla luce di questi risultati, e alla luce del fatto che l'attività di PI3K gioca un ruolo importante nell'ormono-resistenza che caratterizza alcuni tumori mammari ci siamo chiesti se l'espressione di beta4 possa in qualche modo controllare la capacità di risposta agli ormoni di queste cellule. I dati riportati indicano che l'interferenza con l'espressione di beta4 endogena, in seguito a deprivazione da ormoni, induce un processo apoptotico mediato dall'attivazione di caspasi 9 e dal rilascio di citocromo c nel citoplasma, che risulta accentuato in seguito a trattamento con Tamoxifene.

Nel complesso questi risultati confermano la rilevanza dell'espressione di beta4 nei tumori mammari e rendono questa integrina un potenziale bersaglio della terapia dei tumori.

## **P2** RUOLO DI *INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR BINDING PROTEIN 3 (IGFBP-3)* NEL SARCOMA DI EWING

Stefania Benini (a), Monia Zuntini (a), Maria Cristina Manara (a), Pinchas Cohen (b), Giordano Nicoletti (c), Patrizia Nanni (c), Youngman Oh (d), Piero Picci (a), Katia Scotlandi (a)

(a) *Laboratorio di Ricerca Oncologica, Istituti Ortopedici Rizzoli, Bologna*

(b) *Mattel Children's Hospital at UCLA, David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles*

(c) *Sezione di Cancerologia, Dipartimento di Patologia Sperimentale, Università degli Studi di Bologna*

(d) *Virginia Commonwealth University, Richmond*

Il sistema IGF/IGF-IR svolge un ruolo centrale nella patogenesi e nella progressione del sarcoma di Ewing. In questo studio abbiamo valutato se l'*insulin-like growth factor binding protein-3* (IGFBP-3), una molecola con attività pro-apoptotiche e inibitorie, potrebbe essere impiegata per applicazioni terapeutiche nel trattamento del sarcoma di Ewing (ES).

È stata innanzitutto valutata l'espressione di IGFBP-3 in un pannello di linee ES e nel siero di 29 pazienti; per stabilire il potenziale anti-metastatico *in vitro* di IGFBP-3 esogena sono stati quindi analizzati parametri correlati alla malignità (crescita in condizioni di indipendenza da ancoraggio, migrazione, invasività e proprietà angiogenetiche). L'attività anti-metastatica della molecola è stata valutata utilizzando cloni selezionati in cui la produzione endogena di IGFBP-3 è stata indotta mediante trasfezione genica.

Complessivamente abbiamo osservato una bassa espressione di IGFBP-3 sia nel pannello di linee SE analizzato che nei campioni clinici. La somministrazione esogena di IGFBP-3 inibisce notevolmente la crescita di linee ES sia in monostrato che in condizioni di indipendenza da ancoraggio e riduce significativamente la migrazione cellulare. L'espressione forzata di IGFBP-3 nella linea TC-71 conferma gli effetti sulla crescita e sulla motilità osservati con la proteina esogena, diminuisce la produzione o l'attività della matrixmetalloprotease MMP-9 e del *vascular endothelial factor* (VEGF)-A e annulla la capacità metastatica *in vivo*. IGFBP-3 agisce principalmente tramite meccanismi IGF-dipendenti e potrebbe quindi rappresentare una strategia alternativa per inibire le funzioni di IGF-IR.

I risultati indicano quindi che IGFBP-3 rappresenta una potenziale molecola terapeutica nel trattamento del sarcoma di Ewing che potrebbe essere considerata per futuri studi clinici.



## **P3 L'AUMENTO DI ESPRESSIONE DI p27<sup>kip1</sup> PROMUOVE L'APOPTOSI INDOTTA DA PACLITAXEL**

Chiara Gabellini (a), Valeria Masciullo (b), Bruna Pucci (c), Paola Valdivieso (d), Giuseppina D'Andrilli (b), Marco Tafani (c), Giovanni Scambia (d), Gabriella Zupi (a), Antonio Giordano (b,e)

(a) *Laboratorio di Chemioterapia Sperimentale Preclinica, Istituto Tumori Regina Elena, Roma*

(b) *Sbarro Institute for Cancer Research, Temple University, Philadelphia*

(c) *Dipartimento di Medicina Sperimentale e Patologia, Università degli Studi La Sapienza, Roma*

(d) *Centro di Ricerca e Formazione ad Alta Tecnologia delle Scienze Biomediche, Università Cattolica di Campobasso*

(e) *Dipartimento di Patologia Umana ed Oncologia, Università degli Studi di Siena*

La proteina p27<sup>kip1</sup> è un inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti ed è coinvolta in diversi processi cellulari, fra i quali proliferazione e apoptosi, in stretta collaborazione con la proteina del retinoblastoma pRb/p105. È stato valutato il ruolo della proteina p27<sup>kip1</sup> nella apoptosi indotta da paclitaxel in una linea di osteosarcoma caratterizzata dalla perdita di espressione di pRb/p105 (Saos-2). Dopo 48 ore di trattamento con paclitaxel alla dose 100 nM è stato osservato un aumento dei livelli di espressione della proteina p27<sup>kip1</sup>, causata da una riduzione della attività di degradazione della proteina da parte del proteosoma. Questo incremento non è osservato nelle cellule della linea Saos-2 trattate con l'inibitore delle caspasi Z-VAD-FMK, indicando che l'aumento dei livelli della proteina p27<sup>kip1</sup> è strettamente correlato al processo apoptotico. Inoltre l'incremento dei livelli di espressione di p27<sup>kip1</sup>, ottenuto mediante trasfezione transiente della linea Saos-2 con un vettore d'espressione plasmidico, determina un aumento della sensibilità alla apoptosi indotta da paclitaxel rispetto alla medesima linea trasfettata con il vettore vuoto. Quindi la capacità di p27<sup>kip1</sup> di promuovere l'apoptosi non dipende necessariamente dall'espressione di una forma *wild type* di pRb/p105. Questo risultato suggerisce l'utilizzo, in combinazione con farmaci chemoterapici, di trattamenti il cui scopo è di aumentare l'espressione di p27<sup>kip1</sup>, come ad esempio gli inibitori dell'attività del proteosoma, anche nel trattamento di casi di osteosarcoma in cui sia stata persa l'espressione di pRb/p105.

## **P4 GLI INIBITORI DELLA POLI (ADP-RIBOSIO) POLIMERASI (PARP) PER SUPERARE LA CHEMIORESISTENZA A METILANTI E INIBITORI DI TOPOISOMERASI I**

Lucio Tentori (a), Carlo Leonetti (b), Marco Scarsella (b), Matteo Vergati (a), Alessia Muzi (a), Olindo Forini (a), Weizheng Xu (c), Jie Zhang (c), Grazia Graziani (a)  
(a) *Dipartimento di Neuroscienze, Università degli Studi Tor Vergata, Roma*  
(b) *Istituto Tumori Regina Elena, Roma*  
(c) *Guilford Pharmaceuticals Inc., Baltimore*

Recentemente abbiamo dimostrato che gli inibitori della poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP) sono in grado di potenziare l'attività antitumorale del metilante temozolomide (TMZ), inibendo il riparo delle N-metilpurine da parte del *base excision repair*.

In questo studio è stata valutata l'efficacia di nuovi inibitori della PARP nell'aumentare la chemiosensibilità di tumori resistenti alle camptotecine. Infatti, la PARP, favorendo il ricongiungimento dei filamenti di DNA mediato dalla topoisomerasi I, ostacola l'azione citotossica degli inibitori di tale enzima. In particolare, è stata saggiata la capacità di nuovi potenti inibitori della PARP (in grado di attraversare la barriera emato-encefalica e dotati di elevata biodisponibilità orale) di potenziare l'azione antitumorale dell'irinotecano (CPT-11), un farmaco attualmente utilizzato per il trattamento del carcinoma del colon metastatico. Inoltre, è stato valutato se gli inibitori della PARP possano potenziare l'attività antitumorale della combinazione CPT-11/TMZ, attualmente utilizzata per il trattamento di tumori solidi refrattari alla terapia convenzionale.

Gli esperimenti *in vitro* su colture cellulari di carcinomi del colon umani, caratterizzati da differenti livelli di attività PARP, hanno dimostrato che l'inibitore della PARP GPI 15427 potenzia gli effetti antiproliferativi della 7-etil-10-idrossicamptotecina (SN-38), il metabolita attivo del CPT-11, e della sua associazione con TMZ (indice di combinazione <1) anche in linee tumorali ad alta espressione della PARP.

Gli studi *in vivo* hanno dimostrato che la somministrazione orale di GPI 15427 riduce notevolmente l'attività PARP dei linfociti di sangue periferico dei topi trattati, analizzati dopo un'ora dal trattamento. Inoltre, gli esperimenti in topi portatori di xenotrapianti di carcinoma del colon, con differenti caratteristiche di aggressività, hanno dimostrato che GPI 15427 (40 mg/kg/*per os*) in associazione con CPT-11 (10 mg/kg/*ip*) o con basse dosi di TMZ (10 mg/kg/*ip*) + CPT-11 (4 mg/kg/*ip*) inibisce e ritarda significativamente la crescita tumorale rispetto al trattamento con i singoli farmaci o alla combinazione TMZ + CPT-11.

In conclusione, questi dati suggeriscono che la somministrazione orale degli inibitori della PARP potrebbe rappresentare un'efficace strategia terapeutica per superare la resistenza di carcinomi del colon alla chemioterapia.

*Finanziamenti: FIRB 2001, PRIN 2003 and PRIN 2004 a GG e LT.*

## **P5 STUDI IN VITRO SUL MECCANISMO DI AZIONE DEL LAURIL GALLATO IN LINEE TUMORALI FARMACOSENSIBILI E FARMACORESISTENTI**

Annarica Calcabrini (a), Giuseppe Arancia (a), Pasqualina Crateri (a), José Manuel García-Martínez (b), Lorena González (b), Pedro González-Porqué (b), Daniela Trisciuglio (c), Jorge Martín-Pérez (b)

(a) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Instituto de Investigaciones Biomédicas A. Sols, CSIC, Madrid*

(c) *Istituto Tumori Regina Elena, Roma*

Il lauril gallato è un antiossidante utilizzato come conservante alimentare. In questo studio abbiamo valutato gli effetti di tale composto in differenti linee di carcinoma mammario umano: MCF7 (p53 nativa), MCF7 ADR e MDA-MB-231 (p53 mutata, non funzionale). La linea MCF7 ADR, derivata dalla parentale MCF7, presenta un fenotipo MDR (multidrug resistance) con aumentata espressione di P-glicoproteina, una pompa di efflusso ATP-dipendente, responsabile della diminuita sensibilità nei confronti di vari agenti antitumorali. Il trattamento con lauril gallato è in grado di inibire la proliferazione delle linee sopra descritte. Il test effettuato mediante citofluorimetria con l'anticorpo monoclonale UIC2 ha dimostrato che il lauril gallato non è un substrato della P-glicoproteina in quanto non influenza la reattività dell'UIC2, che riconosce un epitopo la cui espressione è correlata con la funzionalità della pompa. Studi di ciclo cellulare hanno dimostrato che il lauril gallato induce un blocco stabile nella fase G<sub>1</sub> nelle MCF7, mentre causa un rallentamento del ciclo nelle MCF7 resistenti e nelle MDA-MB-231. L'analisi mediante *Western blot* dell'espressione di proteine coinvolte nel controllo del ciclo cellulare ha dimostrato un'aumentata espressione di p53 solo nelle MCF7 farmacosensibili e di p21 in tutte le linee. L'analisi dell'induzione di apoptosi (colorazione con annessina V-FITC, studio dell'espressione di PARP e Bcl-2 e delle alterazioni morfologiche in microscopia elettronica) ha evidenziato una maggiore sensibilità al lauril gallato della linea farmacoresistente e della linea MDA-MB-231 rispetto alla linea parentale sensibile. Poiché le cellule MCF7 esprimono livelli molto maggiori di Bcl-2 e p53 nativa, abbiamo verificato il ruolo di tali proteine nella minore sensibilità al lauril gallato osservata in questa linea. L'impiego del clone MAB25, ottenuto dalle MCF7 ADR trasfettate con Bcl-2, ha dimostrato che dopo trattamento con lauril gallato la percentuale di cellule apoptotiche risulta molto inferiore rispetto al controllo non trasfettato, confermando che Bcl-2 svolge un ruolo protettivo contro l'induzione di apoptosi. Inoltre abbiamo utilizzato cloni derivati da MDA-MB-231, che esprimono una forma mutata di p53 murina temperatura-sensibile (a 37 °C p53 inattiva, a 32 °C p53 attiva). Dopo trattamento la percentuale di cellule apoptotiche risulta simile alle due temperature, suggerendo che la p53 non gioca un ruolo fondamentale nella citotossicità indotta dal lauril gallato. I dati ottenuti dimostrano che il lauril gallato induce maggiore effetto citotossico nella linea farmacoresistente MCF7 ADR rispetto alla sensibile. Studi futuri tenderanno a confermare tali effetti anche su altre linee MDR e con p53 mutata, resistenti ai convenzionali agenti chemioterapici.

## **P6** AKT COME PROMOTORE DI SOPRAVVIVENZA IN CELLULE DI SARCOMA DI KAPOSÌ RESISTENTI ALL'INDINAVIR ED ALLA DOXORUBICINA

Rosa Vona (a), Lucrezia Gambardella (a), Barbara Ascione (a), Paola Matarrese (a), Mothanje Barbara Lucia (b), Sergio Rutella (c), Sabrina Basciani (d), Lucio Gnessi (d) Roberto Cauda (b), Walter Malorni (a), Elisabetta Straface (a)  
(a) *Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*  
(b) *Istituto di Malattie Infettive, Università Cattolica S. Cuore, Roma*  
(c) *Istituto di Ematologia, Università Cattolica S. Cuore, Roma*  
(d) *Dipartimento di Fisiopatologia Medica, Università degli Studi La Sapienza, Roma*

La farmacoresistenza rappresenta una delle maggiori cause di fallimento della terapia anti cancro e oltre ad essere associata ad un'alterata espressione di proteine di membrana responsabili di un aumentato efflusso del farmaco fuori dalla cellula, sembra essere legata ad alterazioni della sopravvivenza cellulare e dei *pathway* apoptotici. Allo scopo di caratterizzare i meccanismi coinvolti in questo fenomeno, abbiamo utilizzato cellule provenienti dal sarcoma di Kaposi (SLK) rese resistenti alla Doxorubicina o all'Indinavir.

Il sarcoma di Kaposi è una neoplasia di origine endoteliale molto frequente nel corso dell'infezione HIV e anche se la sua incidenza sembra ridursi nel corso di una terapia combinata di chemioterapici con antiretrovirali può andare incontro a resistenza. Per verificare se proteine responsabili della sopravvivenza cellulare sono coinvolte nei meccanismi che caratterizzano la farmacoresistenza, abbiamo valutato l'espressione di Bax, Bcl-2, survivina e p66-SHC sia in cellule SLK parentali (SLK*wt*) che resistenti all'Indinavir (SLK-IDV) o alla Doxorubicina (SLK-DOX).

Mediante l'impiego di tecniche di citometria (sia statica che a flusso) e di *western blot*, abbiamo osservato che nelle SLK farmacoresistenti aumentava l'espressione della proteina antiapoptotica Bcl-2, della survivina e di p66-SHC, mentre diminuiva l'espressione della proteina proapoptotica Bax. Considerando che l'espressione di queste proteine è regolata dalla fosforilazione di alcune chinasi, abbiamo controllato, sia nelle parentali che nelle farmacoresistenti, lo stato di fosforilazione di Akt, una serin-treonin-chinasi che inibisce i *pathway* apoptotici fosforilando o disattivando direttamente proteine coinvolte nell'apoptosi.

I risultati ottenuti indicavano che Akt era fosforilato nelle farmacoresistenti e sulla base di questo risultato, per verificare se l'attivazione di questa chinasi fosse correlata con l'iperespressione delle proteine di sopravvivenza, abbiamo utilizzato due inibitori: la Wortmanina che inibisce PI3k, una chinasi che sta a monte di Akt ed è responsabile della sua attivazione; e il Glivec, un inibitore del recettore di crescita PDGF al quale è attribuito il ruolo di iniziatore del *pathway* di sopravvivenza PI3k/Akt. Con entrambi gli inibitori abbiamo osservato che le cellule farmacoresistenti manifestavano segni di sofferenza caratteristici dell'apoptosi. Sulla base dei dati ottenuti possiamo dedurre che Akt svolge un ruolo chiave nella sopravvivenza che caratterizza le cellule farmacoresistenti.

## **P7 L'INIBIZIONE DI IGF-IR MODULA L'ESPRESSIONE E L'ATTIVITÀ DI HIF-1ALFA E AUMENTA LA TOSSICITÀ DELLA TEMOZOLOMIDE IN CELLULE DI GLIOBLASTOMA**

Marzia B. Gariboldi, Francesca Mettifogo, Michela Banfi, Francesca Terni, Raffaella Ravizza, Elena Monti

*DBSF, Sezione di Farmacologia, Università degli Studi dell'Insubria, Varese*

Il glioblastoma multiforme (GBM) rappresenta la forma più aggressiva di neoplasia del sistema nervoso centrale, il cui carattere altamente infiltrante, che ne rende impossibile la completa resezione chirurgica e la cui refrattarietà alla radio e alla chemioterapia determinano una prognosi estremamente sfavorevole. Una delle caratteristiche che rende i glioblastomi così insidiosi e resistenti alle terapie è la frequente presenza di regioni ipossiche all'interno della massa tumorale; l'adattamento all'ipossia è considerato uno dei maggiori determinanti del comportamento aggressivo di questo tipo di tumore e della sua scarsa risposta alla radio e alla chemioterapia.

HIF-1 (*Hypoxia-inducible factor-1*) gioca un ruolo fondamentale nella regolazione delle modificazioni cellulari indotte dall'ipossia; perciò la modulazione della funzione di HIF-1 potrebbe rappresentare una strategia per il controllo di tumori ipossici, quali i glioblastomi, e per la loro sensibilizzazione nei confronti delle terapie convenzionali. La funzione di HIF-1 dipende dalla disponibilità della sua subunità inducibile, HIF-1alfa, che è regolata da meccanismi dipendenti o meno dall'ossigeno. Recentemente è stato riportato che IGFs (*Insulin-like Growth Factors*) sono in grado di aumentare i livelli di HIF-1alfa in condizioni di normossia e di ipossia. In questo lavoro abbiamo studiato gli effetti dell'inibizione del recettore IGF di tipo I (IGF-IR) sull'espressione e sulla funzione di HIF-1alfa, sulla sopravvivenza cellulare e sulla risposta alla temozolomide (TMZ), uno dei pochi agenti chemioterapici attivi sui glioblastomi, in una linea cellulare di glioblastoma umano, le cellule U87MG.

I nostri risultati indicano che:

- le cellule U87MG esprimono in modo costitutivo la forma attiva di IGF-IR;
- l'inibizione di IGF-IR da parte di un derivato pirrolo[2,3-d]pirimidinico, NVP-ADW541 (0,5 – 2  $\mu$ M per 24h) diminuisce i livelli proteici di HIF-1alfa e la sua attività trascrizionale in condizioni normossiche e ancor di più in condizioni ipossiche;
- NVP-AEW541 (0,5-1  $\mu$ M per 24h) inibisce il rilascio di VEGF, il prodotto del principale bersaglio genico di HIF-1;
- NVP-AEW541 (0,5-1  $\mu$ M per 24 e 48h) inibisce la crescita delle cellule U87MG ed esercita un effetto sinergico quando combinato con concentrazioni citotossiche di TMZ.

Ulteriori indagini sono in corso al fine di valutare il ruolo della *down*-regolazione di HIF-1alfa da parte di NVP-AEW541 nell'effetto chemosensibilizzante di questo antagonista del recettore IGF-IR; comunque, questi dati preliminari suggeriscono che l'inibizione di IGF-IR potrebbe essere una utile strategia per il controllo dei glioblastomi umani.

## **P8 PROMIELOCITI UMANI COME SISTEMA MODELLO PER LO STUDIO DEL DANNO RADIOINDOTTO IN FUNZIONE DELLO STATO PROLIFERATIVO, DIFFERENZIATIVO E DELL'INVECCHIAMENTO**

Beatrice Di Carlo, Arianna Cesetti, Antonella Maggi, Orazio Sapora  
*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La linea cellulare HL60 è stata isolata dal sangue di un paziente con leucemia promielocitica acuta. Presenta un numero di cromosomi variabile da 45 a 46 con anomalie che riguardano soprattutto i cromosomi 5, 8 e X. Ha la caratteristica di andare incontro, sotto opportuni stimoli chimici, a processi di differenziamento di tipo mieloidi. Sostanze diverse possono indurre differenti processi: per esempio il DMSO e l'acido retinoico inducono al differenziamento granulocitico mentre gli esteri del forbolo portano alla formazione di monociti e macrofagi. In generale le cellule perdono la loro capacità proliferativa con accumulo in fase G0 come risulta dall'analisi citofluorimetrica. Inoltre prolungati passaggi a bassa densità (oltre il 30°) inducono fenomeni di invecchiamento particolarmente evidenti sulle membrane cellulari. Questi fenomeni sono dovuti ad un accumulo di colesterolo e di sfingomielina che induce una maggiore resistenza al danno ossidativo radioindotto. Negli esperimenti riportati sono considerate proliferanti (AP) cellule HL60 in fase logaritmica della curva di crescita (utilizzate entro i primi 10 passaggi), per differenziate (D) cellule HL60 indotte a monociti/macrofagi a seguito di trattamento con PMA per 72 ore e per invecchiate (O) cellule HL60 dopo il 30° passaggio. Sono stati valutati i seguenti *end-point*: l'ordine e la struttura delle membrane cellulari, la struttura del nucleo, il livello intracellulare di specie reattive dell'ossigeno, la concentrazione del GSH cellulare e i danni introdotti dalle radiazioni ionizzanti sul DNA cellulare (ssb e dsb rispettivamente singole e doppie rotture della catena). I metodi utilizzati sono basati sull'impiego di probes e tecniche di fluorescenza come: il *Comet Assay* per il danno al DNA, la Polarizzazione Generalizzata per le membrane, e la citofluorimetria a flusso per la valutazione del ciclo e del livello intracellulare di ROS. Il GSH invece è stato misurato con un metodo colorimetrico.

I risultati mostrano che:

- l'ordine delle membrane cellulari in cellule sia D che O è differente da quello presente in cellule AP, risultando più rigide a causa dell'accumulo di colesterolo (O) o di un differente ordine strutturale (D);
- la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) è più alta in cellule D che in cellule AP e O;
- la concentrazione di GSH intracellulare cresce secondo il seguente ordine  $AP < O < D$ ;
- il numero di ssb prodotto per unità di dose è minore di 2.98 volte in cellule D e 1.60 volte in cellule O rispetto al numero misurato in cellule AP;
- cellule AP e O mostrano lo stesso indice di produzione di dsb per unità di dose, mentre in cellule D l'ammontare è 3,21 volte minore.

I risultati indicano che cellule indotte al differenziamento mostrano una maggiore resistenza nei confronti del danno di tipo ossidativo rispetto a cellule proliferanti sia AP che O. Inoltre cellule HL60 in seguito a processi di senescenza mostrano un comportamento differente in risposta ad agenti genotossici rispetto ad altre linee cellulari *in vitro*.

## **P9 FRAMMENTAZIONE DEL DNA PRODOTTA DA RADIAZIONI DI DIVERSA QUALITÀ: RISULTATI SPERIMENTALI E TEORICI**

Giuseppe Esposito (a,b), Francesca Antonelli (a), Mauro Belli (a,b), Alessandro Campa (a,b),  
Valentina Dini (a,b), Giustina Simone (a,b), Eugenio Sorrentino (a,b), Maria Antonella  
Tabocchini (a,b)

(a) *Dipartimento Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *INFN, Sezione di Roma1, Gruppo Collegato Sanità, Roma*

Nei sistemi biologici irradiati con radiazioni ionizzanti il pattern di deposizione di energia a livello microscopico è responsabile della produzione di danni spazialmente correlati nel DNA cellulare. Il tipo e l'entità di questi danni correlati è critico per gli effetti radiobiologici e dipende dalla qualità (tipo ed energia) della radiazione.

L'induzione e la distribuzione di doppie rotture (DSB, *Double Strand Breaks*) sul DNA è stata studiata in fibroblasti umani AG1522 a seguito di irradiazione con raggi gamma, protoni da 0,84 MeV, ioni carbonio da 60 MeV/u e ioni ferro di diversa energia (200 MeV/u, 500 MeV/u, 1 GeV/u e 5 GeV/u). La misura delle DSB è stata effettuata mediante elettroforesi pulsata (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) utilizzando diverse condizioni sperimentali per separare frammenti di DNA di dimensioni variabili da 23 a 5700 kbp. Il numero di DSB è stato determinato mediante conteggio dei frammenti. Inoltre, è stata sviluppata una metodologia analitica per valutare di quanto la distribuzione osservata dei frammenti devia rispetto ad una distribuzione casuale.

I risultati sperimentali hanno mostrato che il numero di DSB per unità di dose valutato dai frammenti di DNA indotti nell'intervallo 23-5700 kbp è simile per i diversi tipi di particelle (p, ioni C, ioni Fe) e leggermente superiore a quello ottenuto per raggi gamma.

L'analisi teorica dei dati ha invece indicato che la deviazione dalla causalità nell'induzione di DSB dipende dalla qualità della radiazione, essendo non significativa per i raggi gamma e crescendo apprezzabilmente per le particelle più densamente ionizzanti, nel senso che all'aumentare della densità di ionizzazione (misurata dal trasferimento lineare d'energia, LET, delle particelle) vengono prodotti con maggiore frequenza frammenti più piccoli di DNA.

Questi risultati contribuiscono alla definizione del quadro generale del meccanismo d'azione delle radiazioni ionizzanti, confermando che la diversa radiosensibilità cellulare ai diversi tipi di radiazione è correlata alla distribuzione spaziale delle DSB radioindotte, in quanto essa influenza verosimilmente la loro riparabilità.

## **P10** INDUZIONE E RIPARAZIONE DEL DANNO AL DNA PRODOTTO DA RAGGI GAMMA E IONI AZOTO IN CELLULE K562 ATTIVAMENTE PROLIFERANTI E DIFFERENZIATE

Valentina Dini (a,b), Francesca Antonelli (a), Mauro Belli (a,b), Giuseppe Esposito (a,b), Orazio Sapora (a,b), Giustina Simone (a,b), Eugenio Sorrentino (a,b), Bo Stenerlow (c), Maria Antonella Tabocchini (a,b)

(a) *Dipartimento Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *INFN, Sezione di Roma1, Gruppo Collegato Sanità, Roma*

(c) *Rudbeck Laboratory, Uppsala University, Uppsala*

La produzione e la riparazione di doppie rotture (DSB, *Double Strand Breaks*), radioindotte sul DNA cellulare in proeritroblasti umani K562 sono state studiate sia in funzione della qualità della radiazione che dello stato differenziativo. A seguito di induzione del differenziamento queste cellule vanno infatti incontro a profondi cambiamenti a livello sia strutturale che metabolico. In particolare la cromatina risulta più compatta, un minor numero di geni sono espressi e il contenuto nucleare e citoplasmatico di radioprotettori endogeni, come ad esempio il glutatione, è fortemente aumentato. Questi cambiamenti possono influenzare sia la suscettibilità al danno radioindotto sul DNA che la sua riparazione.

Cellule attivamente proliferanti (AP) e cellule a 72 ore dall'induzione del differenziamento (D), sono state irradiate con fotoni  $\gamma$  da sorgente di  $^{60}\text{Co}$  presso l'Istituto Superiore di Sanità e con ioni azoto da 125 keV/ $\mu\text{m}$  presso il sincrociclotrone Gustaf Werner, della Bio-Medical Unit, Svedberg Laboratory, Uppsala. La determinazione delle DSB iniziali dopo irradiazione con dosi fino a 200 Gy e di quelle residue dopo una dose di 80 Gy e tempi di riparazione fino a 2 ore è stata effettuata mediante elettroforesi su gel in campo pulsato (PFGE, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Il numero di DSB per unità di dose è stato determinato dall'analisi dei profili di frammentazione del DNA nell'intervallo di pesi molecolari 5,7-0,145 Mbp.

I risultati, ottenuti nell'arco di diversi anni, mostrano che:

- il numero di DSB per unità di dose indotto dalla radiazione gamma in cellule attivamente proliferanti e in cellule differenziate è simile mentre dopo irradiazione con ioni azoto esso risulta leggermente maggiore in cellule differenziate;
- le cinetiche di ricongiungimento delle DSB indotte da raggi gamma sono più lente in cellule differenziate rispetto a cellule attivamente proliferanti mentre dopo irradiazione con ioni azoto non si riscontrano differenze tra i due diversi tipi di cellule.

In conclusione, sia la struttura della cromatina che la qualità della radiazione sembrano influenzare l'induzione e la riparazione del danno radioindotto, suggerendo la presenza di una complessa interazione tra struttura della traccia e struttura del target biologico.



## **P11** RUOLO DEL GLUTATIONE NELL' APOPTOSI INDOTTA DA RADIAZIONI ANALIZZATO MEDIANTE $^1\text{H}$ MRS DI CELLULE TUMORALI IN COLTURA

Anna Maria Luciani (a), Sveva Grande (a), Alessandra Palma (a), Claudio Giovannini (b), Antonella Rosi (a), Laura Guidoni (a), Orazio Sapore (c), Vincenza Viti (a)

(a) *Dipartimento di Tecnologie e Salute e INFN Gruppo Collegato Sanità, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(c) *Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

È noto che le cellule hanno la capacità di contrastare lo stress ossidativo causato dall'esposizione a radiazioni ionizzanti per mezzo di un complesso sistema *redox* che include sia enzimi che *scavenger* antiossidanti come l'ascorbato, la tioredossina e il glutatione (GSH). Molte evidenze sperimentali hanno mostrato l'importante ruolo giocato dal GSH intracellulare come protettore contro l'instaurarsi di morte apoptotica.

In questo studio abbiamo utilizzato la spettroscopia di MR del protone ( $^1\text{H}$ ) per analizzare il comportamento delle cellule tumorali in coltura HeLa, MCF-7 in relazione alle caratteristiche dei segnali associati al GSH. Le cellule MCF-7 sono state trattate con BSO (butionina sulfossamina) che è in grado di diminuire il contenuto di GSH attraverso l'inattivazione dell'enzima gamma-glutamylcisteina sintetasi in diversi tipi di cellule in coltura e anche *in vivo*, come è stato dimostrato in studi clinici. L'instaurarsi e la progressione di apoptosi nei sistemi cellulari suddetti sono state studiate mediante test dell'Annessina. È stato valutato mediante colorazione con *trypan blue* il *cell killing* in seguito ad irraggiamento con radiazioni ionizzanti ( $^{60}\text{Co}$ ) delle cellule con dosi crescenti fino a 20 Gy: questo effetto è più forte nelle HeLa che nelle MCF-7. Il test dell'Annessina ha mostrato la presenza di apoptosi nelle HeLa ma non nelle MCF-7. Il trattamento con BSO 0,1 mM per 18 ore ha causato un aumento di radiosensibilità delle MCF-7, accompagnato da un aumento della percentuale di cellule apoptotiche.

Parallelamente, è stato analizzato l'andamento dei segnali di MRS dell'acido glutammico libero (glu) e del GSH in campioni di cellule HeLa, MCF-7 e MCF-7 trattate con BSO, prima e dopo l'irraggiamento per verificare se i suddetti segnali possono agire come *marker* predittivi di apoptosi. Mediante MRS è stato osservato che il segnale del GSH è meno intenso nei campioni di cellule HeLa rispetto alle MCF-7, mentre è vero il contrario per quanto riguarda il segnale dell'acido glutammico libero (glu); inoltre, il segnale del GSH diminuisce fortemente in seguito a trattamento con BSO, mentre quello del glu aumenta. La resistenza delle MCF-7 all'apoptosi può essere attribuita all'elevato livello di GSH e alla elevata attività della gamma-glutamylcisteina sintetasi.

Infine, in seguito ad irraggiamento si osserva una deplezione del GSH intracellulare, testimoniata dalla diminuzione del segnale del GSH negli spettri MRS. I nostri dati supportano l'ipotesi che la deplezione del GSH indotta da IR sia implicata in un'azione radio-protettrice, eventualmente correlata al funzionamento della proteina p53.

## **P12 IPOSSIA E RADIAZIONI IONIZZANTI: EFFETTI SULLE PROPRIETÀ ADESIVE E SULL'ESPRESSIONE DELLE MOLECOLE DI ADESIONE IN SFEROIDI DI CELLULE DI OSTEOSARCOMA UMANO MG-63**

Paola Indovina (a), Antonella Ferrante (a), Gabriella Rainaldi (a,b), Maria Teresa Santini (a,b)  
(a) *Dipartimento di Ematologia, Oncologia e Medicina Molecolare, Istituto Superiore di Sanità, Roma*  
(b) *CNR, INFM, Unità di Napoli, Complesso Universitario Monte S. Angelo, Napoli*

La presenza di aree ipossiche nei tumori solidi è uno dei più importanti fattori che influenzano l'efficacia della terapia contro il cancro poiché è associata con la resistenza alle radiazioni e ad alcune forme di chemioterapia e con tumori più aggressivi, con una maggiore predisposizione all'invasione e alla metastasi. Le radiazioni ionizzanti, oltre a provocare danni al DNA, alle membrane, al metabolismo e alla crescita cellulare, possono anche avere profonde conseguenze sul comportamento invasivo. L'obiettivo di questa ricerca è l'analisi dell'effetto dell'ipossia e delle radiazioni ionizzanti su uno dei passaggi cruciali dell'invasione, ossia l'interazione adesiva tra le cellule e la matrice extracellulare (ECM). Per rappresentare meglio la struttura spaziale tridimensionale e le interazioni cellula-cellula e cellula-matrice caratteristiche dei tumori solidi, è stato utilizzato il modello degli sferoidi tumorali multicellulari. In particolare, sono stati utilizzati piccoli sferoidi di cellule di osteosarcoma umano MG-63 privi di centro ipossico. L'ipossia è stata indotta chimicamente con CoCl<sub>2</sub> e verificata mediante analisi di western blotting dell'espressione del fattore ipossia-inducibile HIF-1alfa. Sferoidi, trattati o non trattati con CoCl<sub>2</sub>, sono stati irradiati alla dose di 5 Gy e raccolti a tempi diversi. Saggi di adesione cellulare hanno mostrato un aumento di adesione degli sferoidi MG-63 in seguito al trattamento ipossico. Inoltre, l'ipossia provocava una parziale inibizione degli effetti delle radiazioni ionizzanti. Infatti, in condizioni normossiche, le radiazioni bloccavano quasi completamente l'adesione, mentre, in condizioni ipossiche, l'esposizione alle radiazioni determinava un aumento di adesione. Al fine di ricercare una base molecolare per i cambiamenti delle proprietà adesive indotti dall'ipossia e dalle radiazioni, sono stati analizzati, mediante *western blotting*, gli effetti di questi trattamenti sull'espressione di molecole di adesione (CAM) note per essere implicate nei processi invasivi quali l'integrina alfa 5, l'integrina alfa 2, CD54 e CD44. Data l'importanza della fibronectina nell'influenzare le caratteristiche invasive dei tumori, sono state esaminate variazioni di espressione anche di questo componente della ECM. I risultati hanno mostrato che i cambiamenti nelle proprietà adesive conseguenti al trattamento ipossico e alle radiazioni erano accompagnati da variazioni concomitanti nell'espressione di tutte le CAM esaminate e della fibronectina. In conclusione, i risultati mostrano che l'ipossia influenza sia le proprietà adesive degli sferoidi MG-63 sia la loro risposta alle radiazioni ionizzanti. Sebbene gli effetti dell'ipossia sull'esposizione alle radiazioni siano molto complessi, i risultati presentati sembrano indicare che l'ipossia possa diminuire l'efficacia delle radiazioni anche attraverso le CAM.

## **P13 IL DANNO MITOCONDRIALE E IL BLOCCO DEL CICLO CELLULARE IN FASE G1 SONO GLI EVENTI PRIMARI DI APOPTOSI INDOTTA DALLA PUVA IN CHERATINOCITI UMANI**

Elena Fortunato (a), Laura Del Giudice (a), Silvia Disarò (a), Laura Cecconet (a), Giuseppe Basso (a), Giampietro Viola (b)

(a) *Dipartimento di Pediatria, Università degli Studi di Padova*

(b) *Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Padova*

La terapia PUVA (*psoralen plus UVA*) è una terapia largamente utilizzata per la cura della psoriasi, il linfoma cutaneo a cellule T (CTCL) e altre patologie di carattere dermatologico. Studi preliminari hanno dimostrato che la PUVA induce apoptosi in linfociti umani e in altre linee cellulari, ma il preciso meccanismo d'azione non è ancora stato delucidato in maniera completa. In questo studio abbiamo preso in esame l'attività biologica di quattro derivati dello psoralene: due lineari, 5-metossipsoralene (5-MOP), 8-metossipsoralene (8-MOP), e due angolari angelicina (ANG) e 4,6,4'-trimetilangelicina (TMA) in una linea immortalizzata di cheratinociti umani. I meccanismi di morte cellulare sono stati studiati tramite analisi citofluorimetriche. I risultati ottenuti mostrano che nei cheratinociti i quattro derivati, dopo irradiazione, inducono un blocco del ciclo cellulare in fase G1 seguito da apoptosi, dimostrata dalla comparsa del caratteristico picco ipodiploide (sub-G1). L'arresto del ciclo cellulare in fase G1 è concomitante con l'aumento di espressione di p21<sup>Waf/Cip</sup>, una proteina che induce arresto della crescita tramite il blocco delle *cyclin-dependent kinases* (CDK). Queste osservazioni ci hanno suggerito di proseguire con ulteriori e più specifiche indagini sull'attivazione del meccanismo di apoptosi indotta dallo psoralene dopo irradiazione. Come dimostrato da esperimenti di microscopia ad epifluorescenza, gli psoraleni si localizzano specificatamente nel mitocondrio dove, dopo irradiazione, provocano delle disfunzioni mitocondriali, come il collasso del potenziale di transmembrana, rilascio di citocromo c e produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Questi risultati suggeriscono che la PUVA induce un danno mitocondriale, il quale porta in seguito a morte cellulare per apoptosi. È stato inoltre studiato il ruolo delle caspasi, in termini di induzione di apoptosi e il risultato ottenuto mostra per tutti e quattro i derivati un'attivazione della caspasi-9 e 3 ma non della caspasi-8. Questo meccanismo sembra essere comune ai quattro derivati sebbene essi differiscano tra di loro per le diverse capacità di danneggiare il DNA. Infatti i derivati lineari sono in grado di indurre la formazione di *cross link* intercatena mentre i derivati angolari no. Questi risultati suggeriscono pertanto che la morte cellulare indotta da psoraleni può non essere direttamente collegata alle loro capacità di danneggiare il DNA.

## **P14 L'OLIO ESSENZIALE ESTRATTO DALLA MELALEUCA ALTERNIFOLIA INDUCE APOPTOSI NELLE CELLULE RESISTENTI DI MELANOMA UMANO**

Annarita Stringaro, Annarica Calcabrini, Marisa Colone, Laura Toccaceli, Manuela Marra, Cristiano Giordani, Marco Diociaiuti, Giuseppe Arancia, Agnese Molinari  
*Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

La ricerca di metodi terapeutici innovativi basati sull'uso di nuove sostanze sta guadagnando sempre più interesse in oncologia clinica. In questo studio *in vitro*, la potenziale attività antitumorale del *tea tree oil* (TTO), olio essenziale distillato dalla *Melaleuca alternifolia*, è stata analizzata su una linea parentale di melanoma umano (M14 WT) e su una sua linea derivata (M14 ADR) resistente a doxorubicina, vincristina e melfalan, sovraesprimente la P-glicoproteina (Pgp).

L'insorgenza della polifarmacoresistenza (MDR) Pgp-mediata nelle cellule M14 ADR era associata ad una resistenza all'apoptosi caspasi-dipendente. Le cellule sensibili M14 WT e le cellule resistenti M14 ADR sono state coltivate in presenza del TTO a concentrazioni comprese tra 0,005 e 0,03%. Sia il TTO che il suo principale componente attivo, il terpinen-4-ol, erano in grado di indurre apoptosi caspasi-dipendente nelle cellule di melanoma e tale effetto appariva più evidente nella popolazione variabile resistente. I dati provenienti dalle nostre indagini morfologico-ultrastrutturali suggerivano fortemente la membrana plasmatica come bersaglio del TTO e del suo componente attivo. Allo scopo di chiarire il ruolo della riorganizzazione dei lipidi nell'effetto citotossico indotto dal TTO, sono state analizzate le sue interazioni con modelli di membrana. Sono state in particolare studiate le proprietà termodinamiche (isoterme di compressione, misure di potenziale) e le caratteristiche strutturali (microscopia elettronica a trasmissione, a forza atomica e ad angolo di Brewster) di monostrati lipidici planari (film di Langmuir-Blodgett) e liposomi costituiti da fosfolipidi (DPPC), gangliosidi (GD3 e GM1) e colesterolo. Le membrane modello sono state quindi messe a contatto con il TTO in concentrazioni crescenti e sono stati valutati gli effetti indotti. I risultati biofisici indicano che il TTO interagisce preferenzialmente con DPPC e sembrava non alterare la struttura dei *raft*. Sulla base di queste osservazioni e sapendo che la funzione di trasporto dei farmaci della Pgp, ATP-dipendente, sembra essere correlata strutturalmente con i *raft*, possiamo supporre che l'effetto antiapoptotico (ATP-indipendente), osservato nelle cellule resistenti, fosse dovuto ad un'attività della Pgp non localizzata nei *raft*. In accordo a tale ipotesi, esperimenti condotti mediante citometria a flusso sugli effetti del TTO sull'attività di trasporto della Pgp hanno dimostrato che l'attività di estrusione dei farmaci viene mantenuta dalle cellule resistenti anche in presenza dell'olio essenziale.

In conclusione, il TTO e il terpinen-4-ol sono in grado di interferire con la crescita delle cellule di melanoma umano M14. Tali composti, inoltre, inducono apoptosi caspasi-dipendente che appare maggiormente evidente nelle M14 ADR, superando in tal modo la resistenza all'apoptosi (caspasi-dipendente) mediata dalla Pgp. Infine, il TTO sembra interagire preferenzialmente con i fosfolipidi della membrana plasmatica alterando l'attività antiapoptotica della Pgp.

## **P15 L'ESTRATTO VEGETALE VOACAMINA POTENZIA L'EFFETTO CITOTOSSICO DELLA DOXORUBICINA SU CELLULE TUMORALI FARMACORESISTENTI**

Stefania Meschini (a), Manuela Marra (a), Maria Condello (a), Annarica Calcabrini (a), Elena Federici (b), Maria Luisa Dupuis (b), Maurizio Cianfriglia (b), Giuseppe Arancia (a)  
(a) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*  
(b) *Dipartimento del Farmaco, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

L'individuazione di nuove sostanze ad attività antitumorale in grado di superare la farmacoresistenza e, possibilmente, con limitati effetti collaterali, costituisce uno dei principali obiettivi della ricerca oncologica. In questo studio è stata esaminata la capacità della voacamina, un alcaloide estratto dalla pianta *Peschiera fuchsiaefolia*, di aumentare l'effetto citotossico della doxorubicina (DOX) su cellule in coltura di osteosarcoma umano, sensibili e resistenti ai chemioterapici. Nella prima fase dello studio è stato dimostrato che la voacamina è in grado di aumentare la citotossicità della DOX nei confronti della linea cellulare resistente e che tale effetto era accompagnato da un significativo aumento della concentrazione intracellulare dell'agente antineoplastico.

È stato quindi verificato l'eventuale coinvolgimento della P-glicoproteina (Pgp), nota molecola di trasporto responsabile dell'estrusione di chemioterapici dalle cellule resistenti, nell'effetto chemiosensibilizzante della voacamina. Utilizzando diversi anticorpi monoclonali anti-Pgp, è stato dimostrato che la voacamina è un substrato della Pgp ed è quindi in grado di competere con la DOX nell'attività di estrusione esercitata dalla Pgp stessa. Osservazioni mediante microscopia elettronica hanno confermato l'aumentato effetto citotossico indotto nella linea resistente dal trattamento combinato voacamina-DOX, rispetto a quello con la sola DOX. Infatti, nelle cellule trattate con la combinazione erano presenti mitocondri con morfologia alterata, vacuoli contenenti materiale di degradazione cellulare, nonché strutture mielina-simili.

Poiché è noto che le sostanze che interagiscono con i microtubuli inibiscono la proliferazione cellulare e interferiscono sul traffico intracellulare, è stato studiato mediante microscopia confocale l'effetto della voacamina sull'apparato microtubulare. Inoltre, è stata analizzata mediante citofluorimetria la progressione del ciclo cellulare dopo trattamento con differenti concentrazioni dell'agente chemiosensibilizzante. Nelle cellule resistenti trattate con la combinazione voacamina-DOX si è osservata un'alterazione della polimerizzazione dei microtubuli e una maggiore ritenzione del farmaco nei nuclei, rispetto alle cellule trattate con la sola DOX. Inoltre, l'analisi del ciclo cellulare della linea resistente trattata con voacamina ha rivelato un arresto della popolazione cellulare in G2-M pari al 30%. Essendo l'integrità citoscheletrica importante per l'eliminazione dalla cellula di costituenti citotossici, l'effetto diretto della voacamina sui microtubuli potrebbe giustificare l'aumentata citotossicità osservata nella linea di osteosarcoma resistente.

In conclusione, queste osservazioni sembrano dimostrare che la voacamina, modificando alcuni processi di detossificazione cellulare, è in grado di aumentare la sensibilità delle cellule farmacoresistenti, suggerendone un promettente impiego nella terapia antitumorale.

## **P16 VEICOLAZIONE DI FARMACI ANTIBLASTICI MEDIANTE IMPULSI BIFASICI COME *RESCUE* IN NEOPLASIE LOCALIZZATE: PRIMI RISULTATI IN ANIMALI D'AFFEZIONE CON NEOPLASIE SPONTANEE**

Enrico Pierluigi Spugnini  
*SAFU, Istituto Tumori Regina Elena, Roma*

Le proteine Pgp 170 e MDR rappresentano uno dei principali meccanismi di chemioresistenza in pazienti trattati con chemioterapia. L'applicazione di treni di impulsi bifasici aventi appropriato voltaggio è in grado di indurre l'apertura transitoria di micropori e di macropori nella membrana cellulare, permettendo una migliore captazione di molecole antiblastiche. La capacità dell'elettrochemioterapia di contrastare la resistenza ai farmaci non è stata ancora ben valutata. A tale scopo si è deciso di testare questa ipotesi in animali d'affezione affetti da patologia neoplastica localizzata risultata non responsiva ai normali protocolli antiblastici. Pertanto sono stati reclutati in uno studio di fase II cani affetti da Sarcoma di Sticker e pazienti canini e felini affetti da linfomi localizzati. Tutti i pazienti selezionati avevano ricevuto numerose chirurgie oppure trattamenti chemioterapici con farmaci capaci di indurre farmacoresistenza quali vincristina e doxorubicina, oppure protocolli multifarmacologici come il COP e il MOPP.

Il trattamento prevede, previa sedazione, l'infiltrazione della lesione con bleomicina o cisplatino. Dopo cinque minuti sono state applicati treni di 8 impulsi bifasici della durata di  $50 + 50\mu\text{s}$  ognuno con 1 ms di interpulso (durata totale del trattamento 7,1 ms) ad un voltaggio di 1300 V/cm per lesioni cutanee e di 800 V/cm per lesioni mucosali.

La terapia è risultata ben tollerata e priva di tossicità locali o sistemiche (salvo una lieve connettivite in alcuni soggetti). I casi clinici trattati finora hanno raggiunto una remissione completa dopo due sedute. Le remissioni ottenute sono state di lunga durata, inoltre in caso di recidiva la neoplasia è risultata responsiva ad ulteriori trattamenti.

L'elettrochemioterapia sembra essere una nuova modalità di *rescue* ben tollerata e in grado di assicurare un controllo locale in caso di farmacoresistenza. Ulteriori studi di base e il reclutamento di un maggior numero di pazienti sono necessari per assicurare una migliore caratterizzazione della metodica e per una più corretta valutazione delle potenzialità terapeutiche.

## **P17 I PRODOTTI DI OSSIDAZIONE ENZIMATICA DELLA SPERMINA INDUCONO CITOTOSSICITÀ SU LINEE TUMORALI UMANE FARMACORESISTENTI**

Manuela Marra (a), Giuseppe Arancia (a), Agnese Molinari (a), Annarica Calcabrini (a), Maria Condello (a), Laura Toccaceli (a), Laura Dalla Vedova (b), Francesca Belli (b), Paola Palmigiani (b), Giampiero Tempera (b), Ludovica Marcellini (b), Enzo Agostinelli (b)

(a) *Dipartimento di Tecnologie e Salute, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

(b) *Dipartimento di Scienze Biochimiche Rossi Fanelli, Università degli Studi La Sapienza, Roma*

Scopo di questa ricerca è stato quello di verificare l'efficacia di una nuova strategia terapeutica per il superamento della polifarmacoresistenza. Tale strategia si basa sull'impiego dell'aminossidasi purificata da siero bovino (BSAO), un enzima in grado di catalizzare la deaminazione ossidativa delle poliamine, quale la spermina, con formazione dei prodotti citotossici  $H_2O_2$  e aldeidi.

La citotossicità indotta da tali prodotti è stata valutata mediante *plating efficiency assay* su due linee parentali di cellule tumorali umane di diverso istotipo (adenocarcinoma del colon LoVo e melanoma M14) e sulle loro corrispondenti linee polifarmacoresistenti. I trattamenti con BSAO e spermina sono stati eseguiti sia a 37 °C che in ipertermia (42 °C). L'analisi della sopravvivenza cellulare ha fornito un risultato particolarmente interessante: entrambe le linee resistenti si sono rivelate più sensibili all'effetto citotossico delle specie reattive dell'ossigeno e delle aldeidi. Inoltre, l'effetto citotossico risultava potenziato eseguendo il trattamento a 42 °C. In presenza di catalasi è stata osservata una protezione parziale verso l'effetto citotossico, suggerendo che l' $H_2O_2$  contribuiva principalmente alla citotossicità. Osservazioni in microscopia elettronica a trasmissione e a scansione hanno confermato la maggiore sensibilità delle cellule tumorali con fenotipo resistente che, in seguito al trattamento, presentavano alterazioni morfologiche molto più accentuate rispetto alle corrispondenti cellule sensibili. Tali osservazioni hanno inoltre confermato il potenziamento dell'effetto quando il trattamento veniva eseguito a 42 °C e hanno mostrato che il mitocondrio costituisce il principale target del meccanismo di azione citotossica. Studi sulla funzionalità mitocondriale mediante tecniche di citometria a flusso hanno rivelato una basale iperpolarizzazione della membrana mitocondriale nelle cellule resistenti, probabilmente dovuta a una maggiore attività della catena di trasporto degli elettroni, necessaria ad assicurare il funzionamento della P-glicoproteina. Dopo il trattamento con il sistema enzimatico BSAO/spermina, è stata osservata una più precoce e più intensa depolarizzazione della membrana mitocondriale delle cellule farmacoresistenti rispetto a quella osservata nelle cellule sensibili. Questi risultati suggeriscono che la funzionalità mitocondriale potrebbe influenzare la sensibilità della cellula ai prodotti di ossidazione enzimatica della spermina.

In conclusione, la maggiore sensibilità delle cellule tumorali farmacoresistenti al trattamento con la BSAO in presenza di spermina, soprattutto se confermata su modelli sperimentali *in vivo*, potrebbe essere sfruttata per la messa a punto di protocolli terapeutici innovativi, efficaci nei confronti dei tumori resistenti.

## **P18 ANTITUMORAL EFFICACY OF RETINOIDS ON HUMAN MULTIDRUG RESISTANT COLON CARCINOMA (LOVO MDR) AND LEUKEMIA (HL-60 MDR) CELL LINES**

Giovanna Bartolini (a), Anna Maria Ferreri (b), Paola Rocchi (b), Alessio Papi (a), Marina Orlandi (a)

(a) *Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Bologna*

(b) *Dipartimento di Patologia, Università degli Studi di Bologna*

Acquisition of multidrug resistance (MDR) by tumor cells is a major obstacle in cancer therapy. This phenomenon is often mediated by the overexpression of P-glycoprotein (P-gp), a transmembrane efflux pump that avoids drug accumulation into the cells.

Retinoids are actually used with good results in the treatment of cancer. Here we present data demonstrating that the two retinoids all-trans retinoic acid (ATRA) and IIF (pat.WIPO WO 00/17143) have antitumoral effect also on two cancer cell lines that present MDR: the human colon carcinoma line LoVo MDR and the leukemic line HL-60 MDR.

Both retinoids suppressed cell proliferation in a time and dose dependent way, but while ATRA showed antiproliferative effect only at the highest concentration, IIF resulted significantly more effective, showing remarkable effect at the lowest concentration. The strong inhibition of cell growth (tested by MTT) was accompanied by a reduction of P-gp expression (tested by *Western blotting*). Both retinoids also induced apoptosis (tested by citofluorimetry and DNA laddering).

Our data suggest that the retinoids ATRA and IIF could be used in the treatment of cancer patients that have developed pleiotropic resistance to drugs.



## INDICE DEGLI AUTORI

Abbruzzese, A.; 39  
Agostinelli, E.; 65  
Antonelli, A.; 23  
Antonelli, F.; 31; 57; 58  
Antonioli, P.; 38  
Arancia, G.; 8; 24; 44; 53; 62; 63; 65  
Arcangeli, G.; 7  
Ascione, B.; 22; 54  
Banfi, M.; 55  
Barbieri, E.; 32  
Bartolini, G.; 66  
Basciani, S.; 54  
Basso, G.; 61  
Belardelli, F.; 44  
Belli, F.; 65  
Belli, M.; 31; 45; 57; 58  
Benini, S.; 9; 43; 50  
Bettega, D.; 45  
Biroccio, A.; 23; 42  
Bon, G.; 49  
Bozzuto, G.; 8  
Brunelli, D.; 20  
Budillon, A.; 39  
Calcabrini, A.; 8; 53; 62; 63; 65  
Calzolari, P.; 45  
Cammelli, S.; 32  
Campa, A.; 57  
Campostrini, N.; 38  
Caraglia, M.; 39  
Castagna, A.; 38  
Cauda, R.; 22; 54  
Ceconet, L.; 61  
Cecconi, D.; 38  
Cenacchi, G.; 32  
Cesetti, A.; 56  
Cherubini, R.; 45  
Chianese, M.; 39  
Cianfriglia, M.; 8; 15; 21; 63  
Cohen, P.; 50  
Colombo, T.; 20  
Colone, M.; 8; 62  
Condello, M.; 24; 63; 65  
Cordelli, E.; 33  
Cometta, T.; 11  
Covelli, V.; 29  
Cozzi, R.; 11  
Crateri, P.; 53  
Cuttone, G.; 31; 45  
D'Andrilli, G.; 51  
D'Incalci, M.; 20  
Dalla Vedova, L.; 65  
Damia, G.; 20  
De Milito, A.; 21; 44  
Del Giudice, L.; 61  
Di Carlo, B.; 56  
Di Majò, V.; 29  
Di Tomaso, T.; 32  
Dini, V.; 31; 57; 58  
Diociaiuti, M.; 62  
Disarò, S.; 61  
Dupuis, M.L.; 63  
Durante, M.; 45  
Elli, R.; 23  
Emiliani, E.; 10  
Erba, E.; 20  
Esposito, G.; 31; 45; 57; 58  
Fais, S.; 21; 44  
Falcioni, C.; 20  
Falcioni, R.; 49  
Fanini, F.; 10  
Farruggia, G.; 32  
Federici, C.; 21; 44  
Federici, E.; 63  
Felicioni, L.; 49  
Ferrante, A.; 60  
Ferrerri, A.M.; 66  
Filippi, A.R.; 3; 27  
Folgiro, V.; 49  
Forini, O.; 52  
Fortunato, E.; 61  
Franco, P.; 3; 27  
Fresegna, A.M.; 33  
Furusawa, Y.; 45  
Gabellini, C.; 23; 51

Gambardella, L.; 54  
 García-Martínez, J.M.; 53  
 Gariboldi, M.B.; 24; 55  
 Gentile, M.; 8  
 Gerardi, S.; 45  
 Geroni, C.; 43  
 Giaccone, G.; 37  
 Gialanella, G.; 45  
 Gilson, E.; 42  
 Giordani, C.; 62  
 Giordano, A.; 51  
 Giovannini, C.; 34; 59  
 Gnessi, L.; 54  
 González, L.; 53  
 González-Porqué, P.; 53  
 Grande, S.; 34; 59  
 Graziani, G.; 52  
 Grossi, G.; 45  
 Guidoni, L.; 34; 59  
 Hattinger, C.M.; 43  
 Iessi, E.; 21; 44  
 Indovina, P.; 60  
 Lauro, G.M.; 11  
 Laus, G.; 39  
 Leone, S.; 11  
 Leonetti, C.; 42; 52  
 Logozzi, M.; 21; 44  
 Lozupone, F.; 21; 44  
 Lucia, M.B.; 22; 54  
 Luciani, A.M.; 34; 59  
 Lugini, L.; 44  
 Maggi, A.; 56  
 Malorni, W.; 22; 54  
 Manara, M.C.; 9; 43; 50  
 Mancuso, M.T.; 29  
 Manti, L.; 45  
 Marangolo, M.; 10  
 Marcellini, L.; 65  
 Marchetti, A.; 49  
 Marcucci, L.; 23  
 Marra, Manuela; 24; 44; 62; 63; 65  
 Marra, Monica; 39  
 Martinelli, G.N.; 32  
 Martín-Pérez, J.; 53  
 Masciullo, V.; 51  
 Matarrese, P.; 22; 54  
 Mercuri, M.; 43  
 Meschini, S.; 24; 63  
 Mettifogo, F.; 55  
 Molinari, A.; 8; 44; 62; 65  
 Monti, E.; 17; 24; 55  
 Montinaro, A.; 44  
 Muzi, A.; 52  
 Nanni, P.; 50  
 Nicoletti, G.; 50  
 Oh, Y.; 50  
 Orecchia, R.; 41  
 Orlandi, M.; 66  
 Pacchierotti, F.; 33  
 Pacelli, R.; 39  
 Palma, A.; 34; 59  
 Palmigiani, P.; 65  
 Papi, A.; 66  
 Parmiani, G.; 44  
 Pasello, M.; 43  
 Pazzaglia, S.; 29  
 Pepe, S.; 39  
 Perego, P.M.C.; 38  
 Petrinelli, P.; 23  
 Picci, P.; 9; 43; 50  
 Pichierri, P.; 30  
 Pino, S.; 11  
 Pucci, B.; 51  
 Pugliese, M.G.; 45  
 Rainaldi, G.; 60  
 Ranaldi, R.; 33  
 Ravizza, R.; 24; 55  
 Rebessi, S.; 29  
 Ricardi, U.; 3; 27  
 Righetti, P.G.; 38  
 Righetti, S.C.; 38  
 Rivoltini, L.; 44  
 Rizzo, A.; 42  
 Rocchi, P.; 66  
 Rosi, A.; 34; 59  
 Rutella, S.; 22; 54  
 Sabbatino, F.; 39  
 Sacchi, A.; 49  
 Salaroli, R.; 32  
 Santini, M.T.; 60  
 Santucci, M.A.; 32  
 Sapora, O.; 34; 56; 58; 59

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
a stampa o online deve essere preventivamente autorizzata.  
Le richieste possono essere inviate a: [pubblicazioni@iss.it](mailto:pubblicazioni@iss.it).*

*Stampato da Tipografia Facciotti srl  
Vicolo Pian Due Torri 74, 00146 Roma*

*Roma, dicembre 2005 (n. 4)*

Saran, A.; 29  
Scambia, G.; 51  
Scampoli, P.; 45  
Scarsella, M.; 52  
Scotlandi, K.; 9; 21; 43; 50  
Serra, M.; 9; 21; 43  
Simone, G.; 31; 45; 57; 58  
Simone, M.; 20  
Sorrentino, E.; 31; 45; 57; 58  
Spada, M.; 44  
Spugnini, E.P.; 64  
Stenerlow, Bo; 58  
Stoico, G.; 43  
Straface, E.; 22; 54  
Stringaro, A.; 8; 62  
Tabocchini, M.A.; 31; 45; 57; 58  
Tafani, M.; 51  
Tallone, L.; 45  
Tanori, M.; 29  
Tanzi, N.; 23  
Tavecchio, M.; 20  
Tempera, G.; 65  
Tentori, L.; 52  
Terni, F.; 24; 55  
Toccaceli, L.; 8; 62; 65  
Trisciuglio, D.; 53  
Turci, L.; 10  
Valdivieso, P.; 51  
Vergati, M.; 52  
Villani, P.; 33  
Viola, G.; 61  
Viti, V.; 34; 59  
Vona, R.; 22; 54  
Xu, W.; 52  
Zamboni, S.; 21  
Zhang, J.; 52  
Zunino, F.; 5; 38  
Zuntini, M.; 50  
Zupi, G.; 23; 42; 51