

SOMMARIO

- **Il rapporto dei fenotipi dei macrofagi intra-tumorali è un fattore prognostico nel mesotelioma pleurico maligno epitelioide**
- **Caratterizzazione e profilo della sensibilità a farmaci di cellule primarie derivanti da effusioni pleuriche di mesotelioma pleurico maligno.**
- **L'inibizione del recettore FGF è attiva contro il Mesotelioma e sinergica con la radio- e chemio-terapia.**

Il rapporto dei fenotipi dei macrofagi intra-tumorali è un fattore prognostico nel mesotelioma pleurico maligno epitelioide

A cura della Dott.ssa **Elisa Paolicchi**

Razionale e obiettivi: La chirurgia nel MPM, in alcuni casi, può portare ad un aumento della sopravvivenza. Vi sono pazienti però in cui la sopravvivenza dopo l'intervento è estremamente breve. Questo evidenzia la necessità di un bio-marcatore per fornire ulteriori informazioni su quali pazienti potrebbero trarre beneficio da un intervento chirurgico oppure no. Gordon e colleghi hanno descritto un test di un rapporto di espressione di quattro geni che può prevedere una buona prognosi dopo l'intervento, tuttavia questo test deve essere ancora convalidato in un ambiente clinico. Suzuki e colleghi invece hanno trovato in un gruppo di pazienti trattati prevalentemente con la terapia chirurgica che l'infiammazione cronica nello stroma è un predittore indipendente di sopravvivenza, mentre altri gruppi hanno trovato un sottoinsieme di tipi di cellule immunologiche per predire un migliore risultato clinico nei pazienti trattati con la chirurgia, focalizzandosi sui linfociti infiltranti il tumore CD8. E' ormai accertato che in alcuni tipi di tumore, queste cellule immunitarie infiltranti sono in grado di influenzare la progressione del tumore. Altri tipi cellulari immunitari coinvolti sono i macrofagi, che sono noti per avere un duplice ruolo nel cancro a seconda del loro fenotipo. I macrofagi associati al tumore (TAM) possono essere divisi in macrofagi attivati classicamente (M1) e macrofagi attivati alternativa-

mente (M2). Nel mesotelioma, Burt e colleghi hanno dimostrato che l'alta densità dei macrofagi infiltranti il tumore è associata con la scarsa sopravvivenza nei pazienti trattati con la chirurgia, tuttavia, questo è relativo solo ai pazienti con MPM non epitelioide. Recenti studi hanno dimostrato che, il rapporto dei macrofagi M1/M2 predice la sopravvivenza e la capacità metastatica di un tumore. In genere, una più grande componente di M2 della conta totale dei macrofagi è inversamente correlata con la sopravvivenza.

Disegno dello studio: 8 pazienti MPM che hanno ricevuto la chemioterapia di induzione e il trattamento chirurgico sono stati abbinati per età, sesso, tumore, istologia, stadio TNM e il punteggio EORTC con 8 pazienti che hanno ricevuto solo la chemioterapia. Le cellule T-CD8 positive e il totale conteggio dei macrofagi, utilizzando il marcatore pan-macrofagi CD68 e il conteggio dei macrofagi M2-CD163 positivo è stato determinato nei campioni tumorali prima del trattamento.

End point: Analizzare se le cellule T e i sottotipi di macrofagi potrebbero essere utili come marcatori predittivi per selezionare pazienti affetti da mesotelioma per il trattamento chirurgico. Inoltre è stato testato il valore prognostico dei diversi sottotipi di macrofagi e dei linfociti infiltranti il tumore-CD8 positivi (TILS).

Risultati: L'età media di tutti i pazienti partecipanti era di 62 anni (range 36-75 anni), 12 uomini e 4 donne. Tutti gli istotipi erano del sottotipo epitelioide. La media dei CD8 erano comparabili tra il gruppo dell'intervento chirurgico e quello senza intervento chirurgico e nessuna correlazione è stata trovata tra numero di cellule CD8 e la sopravvivenza globale (OS) nel gruppo chirurgico e nel gruppo senza intervento chirurgico. Anche, il numero totale di cellule CD163 è risultato paragonabile tra il gruppo del trattamento chirurgico e non. Il conteggio di CD68 non correlava con OS e il conteggio di CD163 ha mostrato un trend inverso con OS. Il rapporto CD163/CD68 (Macrofagi M2) e la OS ha mostrato una correlazione significativa nel gruppo non-chirurgico. Per studiare l'influenza dei fattori derivati dal tumore sul fenotipo dei macrofagi, i macrofagi derivati dai monociti sono stati messi in coltura, in presenza di surnatante derivato da sei linee cellulari di mesotelioma. I surnatanti delle cellule tumorali (CM) inducevano i macrofagi verso un fenotipo incline a M2 con un relativamente alto livello di espressione della citochina IL-10 e bassi livelli di mRNA dei marker M1 IL-12, CD80 e HLA-DR. Il marcatore standard di M2 CD163 e il rapporto Arginasi1/iNOS ha mostrato diverse espressioni dipendenti dai diversi CM. Inoltre, livelli di espressione del marcatore di attivazione PD-L1 sui macrofagi coltivati in CM erano paragonabili alla condizione M2, in generale, questi livelli erano più bassi rispetto alla condizione M1. L'espressione genica dell'IL-12 è stata vista solo quando i macrofagi sono stati

coltivati in condizioni M1 e l'espressione di VEGF era bassa/assente in tutte le condizioni. In conclusione, i fattori derivanti dal mesotelioma influenzano i macrofagi verso un fenotipo M2 a vari livelli.

Discussione: L'analisi del rapporto CD163/CD68 nelle biopsie prima del trattamento ha mostrato una correlazione con la OS. Il numero totale di macrofagi invece non correla con la OS, indicando che il numero assoluto di macrofagi non influenza la progressione del tumore. La percentuale dei macrofagi M2 del conteggio totale dei macrofagi era paragonabile tra il gruppo chirurgico e non chirurgico e, pertanto, il rapporto CD68/CD163 non discrimina in favore di un intervento chirurgico in pazienti affetti da mesotelioma. I risultati di questo studio corrispondono con le capacità prognostiche negative dei macrofagi M2; una gran parte di questi macrofagi CD163 positivi nel conteggio totale dei macrofagi correla con una ridotta sopravvivenza. Questo sottolinea che l'equilibrio tra i macrofagi M1 e M2 sembra svolgere un ruolo cruciale nella prognosi dei pazienti MPM. In questo studio, un risultato interessante si basa sul rapporto CD163/68 e la previsione di sopravvivenza nei pazienti con mesotelioma. Questo suggerisce una correlazione clinica all'ipotesi dell'effetto anti-tumorale di M1 TAM e l'effetto pro-tumorale di M2 TAM. Questa è la prima pubblicazione che mostra l'importanza del rapporto CD163/CD68 nel mesotelioma. Inoltre, questo rapporto si è dimostrato essere significativamente correlato con la sopravvivenza nel mesotelioma epitelioide. Le sei linee cellulari di mesotelioma hanno mostrato evidenti effetti eterogenei sui macrofagi in termini di polarizzazione dei macrofagi. Fattori derivanti dal tumore di linee cellulari inducevano i fenotipi M1 e M2 in gradi diversi, in concordanza con l'ampio spettro fenotipo trovato nei tumori. Tuttavia, nel complesso i supernatanti delle cellule tumorali inducevano un fenotipo più incline a M2 con livelli di espressione relativamente elevata di IL-10 e bassa espressione dei marcatori M1: IL-12, CD80 e HLA-DR. Gli esperimenti *in vitro* usando fattori derivanti dal tumore per influenzare il fenotipo dei macrofagi, complementa i risultati immunostochimici *in vivo* dimostrando che i fattori derivati dal tumore possono modulare direttamente il fenotipo dei macrofagi. Oltre all'impatto di questa scoperta sul valore prognostico della sopravvivenza globale dei pazienti, i macrofagi potrebbero anche rivelarsi come un potenziale bersaglio per l'intervento terapeutico. In conclusione, il rapporto CD68/CD163 è risultato essere un prognostico marcatore in un numero limitato di pazienti affetti da mesotelioma epitelioide, ma non è un marcatore predittivo di outcome dopo l'intervento chirurgico. Questo studio sottolinea l'importanza dell'equilibrio tra i macrofagi M1 e M2 nel comportamento del tumore. A dispetto di non essere un predittivo fattore per la chirurgia nel mesotelioma, questo valore prognostico potrebbe essere di grande importanza nei pazienti affetti da mesotelioma. La ripolarizzazione dei macrofagi può essere un nuovo bersaglio terapeutico nel mesotelioma in-

tegrando strategie di immunoterapia.

Conclusioni: *Questi dati hanno rivelato che il rapporto CD163/CD68 è un potenziale marcatore prognostico nei pazienti affetti da mesotelioma epitelioide indipendenti di trattamento, ma non può essere utilizzato come marcatore predittivo per l'esito dopo l'intervento chirurgico.*

Parole chiave: Mesotelioma pleurico maligno, Macrofagi (M1, M2), CD68/CD163.

Riferimento Bibliografico: Cornelissen R et al. PLoS One. 2014 Sep 5;9(9):e106742.

Il III workshop residenziale della "Piattaforma Europea Oncologica Toracica" (European Thoracic Oncology Platform-ETOP), Danzica, Polonia

A cura della Dott.ssa **Elisa Paolicchi**

Il 3 ° workshop residenziale organizzato dalla "**Piattaforma Europea Oncologia Toracica**" (European Thoracic Oncology Platform-ETOP) si è tenuto dal 27 al 29 agosto 2014 a Danzica, Polonia. Trentadue giovani ricercatori di oncologia toracica provenienti da 14 paesi diversi hanno partecipato al workshop. Il programma era incentrato sulle tendenze attuali nella ricerca e cura del tumore del polmone e del mesotelioma. 17 esperti della cura del tumore ai polmoni e mesotelioma hanno contribuito ogni giorno con presentazioni riguardanti il loro settore di competenza. Le presentazioni hanno spaziato dalla terapia, a test molecolari fino alla sperimentazione clinica. Come temi caldi scelti dai padroni di casa c'è stato un confronto intra-europeo sulla cura del tumore del polmone, sottolineando il collegamento tra la sopravvivenza a 5 anni e la potenza economica di un paese proponendo un nuovo piano di intervento per migliorare la situazione in Polonia. Inoltre, i partecipanti sono stati invitati a portare e presentare il proprio progetto di ricerca. I progetti specificatamente per il mesotelioma riguardavano lo studio sul ruolo dell'adrenomedullina, un peptide multifunzionale altamente conservato che viene indotto dall'ipossia (1% di ossigeno), i cui recettori sembrano stimolare la progressione del tumore. Risultati preliminari osservati dal dipartimento di patologia dell'Università di Semmelweis (Budapest, Ungheria) suggeriscono che l'adrenomedullina è espressa dalle cellule di mesotelioma e può esercitare effetti pro- cancerogeni. Il laboratorio di diagnostica molecolare e immunologia dell'istituto nazionale delle malattie del pomone e tubercolosi, (Varsavia, Polonia) invece ha presentato un progetto sul rilevamento basato sulle nanotecnologie di biomarcatori epigenetici per la diagnostica del cancro, andando a valutare i microRNA circolanti nel plasma di pazienti affetti da mesotelioma pleurico maligno utilizzando il "surface-enhanced Raman scattering" (SERS), ovvero una tecnica che consente il rilevamento specifico di molecole bersaglio di acido nucleico con sensibilità estremamente elevata (fino a 10⁻¹⁵ M). Un altro progetto presentato si basa sulla scoperta e la caratterizzazione funzionale di nuovi bersagli terapeutici nel mesotelioma. Ricercatori e Medici oncologi dell'Istituto catalano di Oncologia (Barcellona, Spagna), attraverso tecniche di "Next generation sequencing" hanno l'obiettivo di identificare nuove mutazioni di geni che porterebbero ad un trattamento personalizzato del paziente selezionato sulla base del profilo molecolare. Inoltre focalizzeranno la loro attenzione sull'espressione di PD-L1, un marker predittivo per la risposta immunologica che attualmente richiama molta attenzione nel mondo scientifico perchè sembra avere un ruolo

molto interessante nella cura del mesotelioma e del tumore al polmone. Il laboratorio di Genetica del Dipartimento di Biologia dell'Università di Pisa (Italia), invece ha presentato un progetto relativo allo studio del ruolo della via molecolare dei Geni Polycomb/HIF/VEGF nell'eziologia del mesotelioma. Lo studio italiano si focalizza sulla connessione che c'è tra ipossia (1% di ossigeno), tipica di questo tumore, e la resistenza alla terapia dovuta alla presenza e incremento delle cellule staminali tumorali che sono le maggiori responsabili della chemioresistenza. Risultati preliminari hanno dimostrato che l'ipossia gioca un ruolo fondamentale su questa via molecolare, suggerendo nuove opzioni per il disegno di nuove terapie mirate per i pazienti di mesotelioma. Un'altro progetto italiano osservazionale proposto dall'ospedale "Humanitas Gavazzeni" (Bergamo, Italia) propone uno studio clinico non randomizzato di fase II con pemetrexed e carboplatino in pazienti anziani con il mesotelioma pleurico maligno epitelioide usando come criteri di stratificazione e di selezione l'età e le comorbidità dei pazienti. Questi progetti insieme a quelli riguardanti il tumore del polmone sono stati presentati e poi discussi, a presiedere la discussione sono stati scienziati "senior" che dirigono laboratori di ricerca in università europee. Le molte ed eccellenti presentazioni sono state seguite da vivaci discussioni che hanno continuato nel corso del coffee break e delle cene. Il workshop è stato finanziato dall'Associazione europea di medicina oncologica (European Society of Medical Oncology- ESMO) e dal generoso sostegno di Roche e Amgen. I meriti vanno anche a Kathleen Beese e Alicja Maciejewska-Izdebska per il loro grande impegno e una perfetta organizzazione del workshop.

Link del workshop:

http://www.etop-eu.org/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=402&Itemid=348

Caratterizzazione e profilo della sensibilità a farmaci di cellule primarie derivanti da effusioni pleuriche di mesotelioma pleurico maligno

A cura della Dott.ssa **Ombretta Melaiu**

Razionale e obiettivi: Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un tumore proveniente dal tessuto mesoteliale, caratterizzato dall'accumulo di liquido nella cavità pleurica responsabile di sintomi iniziali come la dispnea. Per alleviare la sintomatologia si ricorre alla pleurocentesi. Il versamento pleurico così raccolto può essere utilizzato per stabilire la diagnosi, in base al contenuto di cellule mesoteliali benigne e maligne, cellule infiammatorie, proteine escrete associate e carboidrati. La chemioterapia è spesso l'unica opzione disponibile per il trattamento dei pazienti con MPM, ma la corrente chemioterapia di prima linea (una combinazione di pemetrexed e cisplatino o carboplatino) ha un tasso di risposta di solo il 40% e aumenta la sopravvivenza dei pazienti di tre mesi. Anche se un certo numero di combinazioni di farmaci ha mostrato risultati promettenti, non vi è una seconda linea di chemioterapia standardizzata. Doxorubicina e gemcitabina vengono talvolta usati nel trattamento di seconda linea. I pazienti che rispondono alla chemioterapia hanno un aumentato tasso di sopravvivenza globale, sottolineando l'importanza di una selezione accurata dei farmaci da impiegare. È stato suggerito che due proteine, ERCC1 e RRM1 sono coinvolte nella resistenza ai chemioterapici. ERCC1 gioca un ruolo principale nel pathway della riparazione per escissione di nucleotidi, un pathway coinvolto nella riparazione del DNA che sembra eliminare gli effetti causati da farmaci a base di platino. RRM1 è una subunità della ribonucleotide reduttasi (RNR), una proteina necessaria per la sintesi del DNA. È stato dimostrato che RNR viene completamente inattivato dalla gemcitabina *in vitro*. Diversi studi hanno mostrato un legame tra ERCC1 e RRM1 sole o in combinazione con altri biomarcatori per la sensibilità ai farmaci, la sopravvivenza libera da progressione tumorale e la sopravvivenza globale nel cancro al polmone e nel MPM. È stato anche visto che l'immunoreattività di ERCC1 e RRM1 può spiegare la sensibilità delle linee cellulari di MPM al carboplatino. Tuttavia, queste proteine hanno ancora bisogno di ulteriori indagini. Al momento gli unici marcatori correlabili con la prognosi o la risposta alla terapia sembrano essere mesotelina e acido ialuronico.

Disegno dello studio: Versamenti pleurici contenenti cellule di MPM primarie sono stati raccolti dalla diagnostica di routine. Gli autori hanno caratterizzato e testato la chemiosensibilità di 18 campioni maligni e 4 campioni benigni provenienti da 16 diversi pazienti con versamento pleurico. Le cellule sono state seminate in piastre da 384 pozzetti e sottoposti ad un sistema robotizzato per determinare la sensibilità a 32 farmaci diversi. Le cellule primarie sono state ulteriormente caratterizzate

mediante immunocitochimica per valutare la percentuale di cellule maligne e per studiare la reattività di RRM1 e ERCC1.

End point: Impiegare linee primarie di MPM in un saggio di chemiosensibilità *ex vivo* con il futuro scopo di predire la migliore scelta di trattamento da impiegare per i pazienti con MPM.

Risultati: Tutti i casi con cellule morte per il 50% alla massima concentrazione di farmaco sono stati definiti come resistenti. Una grande variabilità individuale nella sensibilità ai differenti trattamenti è stata osservata tra differenti colture cellulari. Le cellule più resistenti (MMi3, MMi18, MMi15 e MMi16) sono state influenzate dall'azione di un solo farmaco e le più sensibili (MMi17, MMi4, MMi5 e MMi6) da dieci. Alcuni effetti dei farmaci sono stati visti anche nei quattro campioni benigni, in particolare i farmaci che agiscono sulla proliferazione cellulare. Actinomicina D e daunorubicina sono risultati i due farmaci più efficaci, influenzando su 10 delle 18 colture di cellule maligne. I taxani (paclitaxel e docetaxel), gli alcaloidi (vinblastina, vincristina e vinorelbina) e le antracicline (daunorubicin, doxorubicina e epirubicina) sono risultati i gruppi più potenti di farmaci. Sorprendentemente l'effetto di bortezomib, cisplatino, carboplatino e pemetrexed era limitato, anche se il pemetrexed è stato testato solo sul 50% dei campioni. La percentuale di cellule maligne nelle linee di cellule primarie isolate variava tra il 10-98% e correlava in modo inversamente proporzionale con la percentuale di farmaci efficaci, mentre la correlazione con la sopravvivenza globale dei pazienti non era statisticamente significativa. Il tempo di sopravvivenza, tuttavia, correlava con la percentuale di farmaci efficaci e con la sensibilità degli stessi. Carboplatino, cisplatino e pemetrexed hanno influito solo su un campione di cellule maligne ciascuno, mentre la gemcitabina e la doxorubicina hanno influito su quattro isolati ciascuno. Tutti i campioni sono stati colorati per RRM1 e ERCC1, valutando la colorazione delle popolazioni di cellule maligne. RRM1 correlava fortemente con il numero di farmaci efficaci, ma non con il tempo di sopravvivenza. Colture cellulari primarie con un punteggio ICC più alto per RRM1 erano più resistenti agli agenti antimicrotubulari (tranne paclitaxel), topotecan, idrossiurea, gemcitabina, methotrexate, bleomicina e doxorubicina, rispetto a quelli con un punteggio ICC più basso. La colorazione per ERCC1 non era correlata con la proporzione di farmaci efficaci o con il tempo di sopravvivenza dei pazienti. I valori di acido ialuronico e mesotelina variavano notevolmente tra i diversi pazienti e i diversi campioni. I livelli di acido ialuronico correlavano con la colorazione citoplasmatica di RRM1 dei dodici campioni dei pazienti con MPM, ma non con il tempo di sopravvivenza. Nessuna correlazione è stata trovata per la mesotelina. L'importanza di come le culture sono state isolate e come possono cambiare durante la progressione tumorale sono state studiate. Quando una coltura primaria (MMi3) è stata mantenuta per 18 passaggi (cultura MMi4) gli autori hanno registrato una

diminuzione della colorazione di RRM1, mentre ERCC1 rimaneva colorato. Contemporaneamente le proporzioni di farmaci efficaci aumentavano dal 4% al 36%. Allo stesso modo MMi6, linea cellulare ottenuta da un paziente con la sopravvivenza a lungo termine, è stata testata dopo sette passaggi come MMi7. Un secondo campione è stato ottenuto dallo stesso paziente quattro anni più tardi. Questa seconda linea cellulare è stata separata in due frazioni, la prima (MMi17) costituita da cellule aderenti e la seconda (MMi18) rappresentata da cellule poco aderenti. I primi isolati (MMi6 e MMi7) hanno mostrato la stessa colorazione per RRM1 e ERCC1 e la sensibilità al farmaco è stata persa dopo una coltura prolungata.

Discussione: Il trattamento chemioterapico per l'MPM continua ad essere un tasto difficile e anche se sono stati proposti diversi agenti diversi e combinazioni di farmaci, la combinazione di pemetrexed e cisplatino o carboplatino rimane il trattamento di prima linea. Il tasso di risposta del 40% di questi trattamenti è, però, deludente e i pazienti che rispondono al trattamento hanno un tempo di sopravvivenza più lungo. Ciò dimostra la necessità di una maggiore comprensione della risposta del paziente, degli effetti del trattamento e dei marcatori che correlano con questi aspetti. In linee cellulari diverse sono state viste in precedenza grandi differenze nella sensibilità a diversi farmaci, e nella immunoreattività a diversi marcatori predittivi, suggerendo una possibilità per il trattamento personalizzato. Eseguendo studi più dettagliati per i pazienti con MPM su cellule maligne primarie gli autori potrebbero essere in grado di individuare un trattamento in grado di aumentare i tassi di risposta e i tempi di sopravvivenza. Tra i farmaci utilizzati in prima e seconda linea di trattamento, cisplatino, carboplatino e pemetrexed hanno mostrato poco o nessun effetto su una qualsiasi delle linee cellulari maligne. Il limitato effetto del pemetrexed può essere spiegato con risultati precedenti degli autori, secondo cui la distribuzione del ciclo cellulare è un approccio più sensibile quando rileva un effetto a breve termine di questo farmaco. Dopo correzione per il numero di cellule benigne e per l'effetto medio del rispettivo farmaco su queste ultime, la correlazione dell'efficacia del farmaco con la sopravvivenza migliora, specie con pemetrexed e cisplatino. Tuttavia, diversi studi di fase II hanno raggiunto risultati comparabili con pemetrexed e carboplatino così come la combinazione di carboplatino, doxorubicina liposomizzata e gemcitabina. Questi cinque farmaci hanno influenzato diversi campioni di cellule, ad indicare che alcuni dei pazienti che non rispondono al trattamento a base di pemetrexed e cisplatino potrebbero aver una risposta migliore se trattati con un'altra combinazione di farmaci. Anche se non ancora provato, questo tipo di test *ex vivo* per testare la sensibilità ad un farmaco può fornire una base per la scelta personalizzata del trattamento. Inoltre, versamenti pleurici ottenuti dallo stesso paziente a distanza di quattro anni mostravano un aumento della percentuale di cellule maligne nel campione. Le cellule presentavano una au-

mentata reattività per RRM1 nel tempo e aumentata resistenza ai farmaci, forse riflettendo il progredire della malattia. La percentuale di cellule maligne nelle effusioni pleuriche sembra avere un effetto decisivo in questi esperimenti, correlando con la percentuale di farmaci efficaci e che influenzano il tempo di sopravvivenza. Gli effetti citotossici osservati su linee cellulari corrispondevano agli effetti osservati su cellule primarie, a dimostrare che queste linee cellulari sono un sistema modello adatto per studiare le cellule primarie di MPM. La colorazione per ERCC1 non ha mostrato correlazioni con nessun fattore misurato. Una causa per questo può essere che i farmaci inclusi non influenzano il DNA direttamente, dal momento che ERCC1 indica principalmente la resistenza a farmaci che interagiscono con il DNA.

Conclusioni: In conclusione, la proporzione delle cellule maligne e la reattività di RRM1 nelle effusioni pleuriche correlano con la sensibilità ai farmaci ed il tempo di sopravvivenza. La variabilità in risposta ai chemioterapici comunemente utilizzati enfatizza la necessità di test che indichino la migliore scelta dei farmaci citotossici. L'efficienza dei risultati ottenuti dovrebbe essere preferibilmente corretta per la quota di cellule benigne e per gli effetti di determinati farmaci su di esse.

Parole chiave: Mesotelioma maligno, versamenti pleurici, cellule primarie, chemioterapia, chemiosensibilità *ex vivo*, farmaci citotossici, RRM1, ERCC1, trattamento individualizzato.

Riferimento Bibliografico: Szulkin A, et al., BMC Cancer. 2014 Sep 24;14(1):709.

L'inibizione del recettore FGF è attiva contro il Mesotelioma e sinergica con la radio- e chemio- terapia

A cura della Dott.ssa **Elisa Barone**

Razionale e obiettivi: Il mesotelioma pleurico maligno (MPM) è un tumore aggressivo la cui incidenza è destinata ad aumentare drammaticamente nei prossimi anni; è caratterizzato da una frequente resistenza a chemio e radio-terapia e le limitate possibilità terapeutiche al momento disponibili sono in grado di prolungare fino ad un massimo di 12 mesi la sopravvivenza del paziente, inoltre non sono applicabili in pazienti con stadio avanzato della malattia. Negli ultimi anni l'approccio di una terapia molecolare mirata ha migliorato le strategie di trattamento in diversi tipi di tumori solitamente refrattari alla terapia, alimentando le speranze per lo sviluppo di ulteriori opzioni terapeutiche anche nel MPM.

I fattori di crescita dei fibroblasti e i loro recettori tirosin-chinasici giocano un ruolo chiave nello sviluppo embrionale; negli ultimi anni hanno suscitato un crescente interesse come potenziali target nella terapia contro il cancro ma la loro importanza nel mesotelioma non è stata chiaramente definita. L'iperattivazione a seguito di mutazioni e traslocazioni è stata dimostrata per FGFR1 nel tumore del polmone a piccole cellule (NSCLC), per FGFR3 nel tumore vescica e nel mieloma multiplo o per FGF19 nel carcinoma epatocellulare (HCC). L'interruzione della via di segnalazione di FGF ha condotto a un'inibizione della crescita tumorale nel NSCLC, nel carcinoma del colon-retto (CRC), nel carcinoma della mammella, nel glioblastoma e nel melanoma.

Per quanto riguarda il MPM, l'espressione di FGF1 e FGF2 è stata osservata in linee cellulari e in tessuti maligni; inoltre è stata osservata una correlazione tra FGF2, l'aggressività del tumore e una ridotta sopravvivenza del paziente. Mentre l'inibizione dell'espressione di FGF2 ha soppresso la proliferazione in linee cellulari di mesotelioma maligno ma non nelle cellule sane di controllo. Il gruppo dell'Institute of Cancer Research di Vienna, coordinato dal Dott. Grusch ha osservato che diversi FGF e FGFR sono overespressi nel MPM. Inoltre hanno dimostrato che il blocco del recettore FGFR1 ostacola la crescita delle cellule di MPM in vitro e in vivo, rendendole più sensibili sia alla chemioterapia che alle radiazioni ionizzanti.

Disegno dello studio: L'espressione dei fattori di crescita dei fibroblasti e dei loro recettori è stata analizzata in linee cellulari di mesotelioma e in 69 campioni di tessuti paraffinati (48 epitelioidi, 18 bifasici, 3 sarcomatoidi). Campioni di pleura sana derivata da pazienti sottoposti a pneumotorace sono stati utilizzati come controllo. Sono stati utilizzati diversi modelli cellulari (3 linee cellulari bifasiche e 3 epitelioidi) per valutare gli effetti dell'inibizione in vitro del recettore del fattore di crescita dei fibroblasti 1, sia attraverso l'utilizzo di uno specifico inibitore, che attraverso

l'utilizzo di un costrutto di adenovirus esprime il dominante negativo di FGFR1 marcato con GFP (AddnFGFR1). È stata valutata la possibile azione sinergica con il trattamento con cisplatino. L'immunoistochimica sui tessuti è stata effettuata con i seguenti anticorpi primari: anti-FGFR1, anti-FGF2, anti-FGF18 e anti-Ki67

End point: Valutare il potenziale anti-tumorale nel mesotelioma dell'inibizione del fattore di crescita dei fibroblasti.

Risultati: FGFR1, FGF2 e FGF18 sono risultati overespressi in 12 linee cellulari di mesotelioma; questi risultati sono stati ulteriormente validati in un pannello 9 linee cellulari di MPM e 3 linee cellulari di mesotelio sano attraverso immunofluorescenza. L'espressione proteica di FGFR1, FGF2 e FGF18 nei tessuti di MPM è stata valutata attraverso immunoistochimica: nessuna delle tre proteine è risultata espressa nel mesotelio della pleura sana mentre nei tessuti di MPM sono risultati overespressi con diverse percentuali; l'intensità maggiore è risultata per FGFR1 mentre la più bassa per FGF18. Non è stata osservata alcuna differenza nei livelli d'espressione tra campioni di MPM epitelioidei e sarcomatoidi, né tra i rispettivi compartimenti epitelioidei e sarcomatoidi dei tumori bifasici.

Tutte le linee cellulari utilizzate per la valutazione funzionale esprimevano FGFR1 a livelli medio-alti. Dopo stimolazione con FGF2 le linee cellulari bifasiche di MPM hanno mostrato un aumento della proliferazione cellulare; inoltre, in tutte le linee, eccetto un epitelioide e una bifasica, la stimolazione ha condotto ad un aumento della migrazione cellulare; in alcune linee cellulari è stato osservato un importante cambiamento della morfologia cellulare, costituito da una transizione verso un fenotipo più sarcomatoide. Anche le cellule di mesotelio sano esprimevano la proteina FGFR1 ma non è stata osservata alcuna stimolazione della proliferazione cellulare né nelle Met-5A, né nelle altre linee di controllo.

In contrasto, l'inibizione di FGFR1 attraverso l'utilizzo di uno specifico inibitore tirosin-chinasico o attraverso un costrutto dominante negativo di FGFR1 ha condotto ad una significativa diminuzione della proliferazione cellulare, della crescita di sferoidi e della migrazione cellulare. Il trattamento con l'inibitore tirosin-chinasico specifico per FGFR1 ha determinato una diminuzione dell'attivazione del pathway MAPK (evidenziata da una ridotta fosforilazione di ERK1/2) in tutte le linee cellulari eccetto una linea bifasica e ha condotto ad un aumento dose-dipendente dell'apoptosi.

Al fine di valutare la dipendenza di MPM da FGFR1 *in vivo* è stato utilizzato un modello di xenotrapianto intraperitoneale. Cellule di MPM epitelioidei sono state trasfettate con il costrutto di adenovirus AddnFGFR1 o con il costrutto di controllo e successivamente iniettate nella cavità peritoneale di topi SCID. I topi iniettati con cellule trasfettate con AddnFGFR1 mostravano un importante riduzione della massa tumorale. Lo stesso risultato è stato osservato in topi (precedentemente iniettati con cellule di MPM) trattati con l'inibitore specifico per FGFR1. I tumori di topi trattati con

l'inibitore mostravano una diminuita attività del pathway MAPK, una significativa riduzione della proliferazione cellulare e un aumento dell'apoptosi in confronto ai tumori dei topi di controllo non trattati con l'inibitore. Essendo FGF implicato tra i fattori di resistenza alla terapia, è stato valutato se l'inibizione di FGFR1 potesse rendere più sensibili alla chemio- e alla radio-terapia, le cellule di MPM: in saggi di vitalità è stato osservato un effetto additivo o sinergico, per la maggior parte delle dosi testate, dato dalla combinazione dell'inibitore tirosin-chinasico con il cisplatino. Il blocco dei segnali di FGFR1 per 24h dopo irradiazione ha prodotto un incremento della sensibilità alla radioterapia.

Discussione: Il MPM è associato ad una difficile diagnosi, ad una bassa sopravvivenza e a limitate opzioni terapeutiche. Sebbene il sistema FGFR ha mostrato un ruolo chiave nella crescita di cellule tumorali e nella sopravvivenza in molti tipi di cancro, il suo ruolo biologico e clinico nel MPM non è stato ancora ben caratterizzato. In questo studio è stata effettuata un'esaustiva analisi del sistema FGF/FGFR: è stata osservata un'alta espressione di diversi membri della famiglia di FGF (soprattutto FGF2 e FGF18) sia in cellule umane di MPM che in campioni di tessuti tumorali. L'espressione di tutte e 4 le FGFR è stata individuata in tutte le linee cellulari ma in particolare FGFR1 ha mostrato il più alto livello di espressione genica; per questo motivo le prove funzionali sono state effettuate su questo recettore. Il ruolo di FGFR nelle cellule di MPM è supportato dall'aumentata attività migratoria e crescita cellulare in diverse linee cellulari di MPM previo trattamento con FGF2. Il dato interessante è che la stimolazione della proliferazione e i cambiamenti morfologici sono limitati alle linee cellulari bifasiche mentre l'aumento della migrazione e l'attivazione del pathway MAPK non dipendeva dal sottotipo cellulare. La presenza di FGFR1, FGF2 e FGF18 è stata individuata sia in MPM epitelioide che non; l'espressione di FGFR1 era significativamente correlata a un stadio avanzato della malattia. L'inibizione di FGFR1, sia farmacologica che genetica, ha ridotto la crescita delle linee cellulari di MPM; questo risultato è in accordo con quello osservato in altri tipi tumorali. Inoltre il blocco di FGFR1 si traduce in una diminuita crescita della massa tumorale in xenotrapianti di MPM *in vivo*.

A livello clinico, uno dei maggiori ostacoli nella gestione del MPM è la recidiva locale del tumore anche dopo una resezione chirurgica radicale; questa è determinata dalla migrazione di cellule tumorali nei tessuti circostanti. I segnali di FGFR1 sembra giochino un ruolo importante nella capacità migratoria delle cellule di MPM; ciò è stato evidenziato sia dalla stimolazione della migrazione attraverso FGF esogeno che dalla riduzione della migrazione attraverso inibizione di FGFR1. In diversi tumori è stato indicato che i segnali FGF/FGFR contribuiscono all'insorgere della resistenza alla terapia: gli effetti sinergici osservati con la combinazione inibitore di FGFR1 e cisplatino rivelano un'incoraggiante ruolo di questo

agente citotossico nel trattamento del MPM. Un simile effetto di combinazione favorevole è stato osservato anche nel carcinoma polmonare a piccole cellule. La capacità dell'inibizione di FGFR1 di potenziare gli effetti della radioterapia è molto rilevante nel trattamento del MPM, dove la radioterapia è frequentemente applicata. Le scoperte che l'inibizione di FGFR1 ostacola la crescita e la migrazione di cellule di MPM e potenzia gli effetti della radio- e della chemio-terapia sono particolarmente incoraggianti e giustificano ulteriori valutazioni del ruolo di FGFR come potenziale bersaglio terapeutico contro il mesotelioma.

Conclusioni: *Questo studio suggerisce che il fenotipo maligno delle cellule di mesotelioma dipende dal fattore di crescita dei fibroblasti; per questo motivo potrebbe essere un target terapeutico nel mesotelioma pleurico maligno con un promettente potenziale nell'aumentare la sensibilità alla chemio- e alla radio-terapia.*

Parole chiave: Fattore di crescita dei fibroblasti, FGFR, molecular targeted therapy, combined modality therapy. **Riferimento Bibliografico:** Schelch K. et al. American journal of respiratory and critical care medicine; 2014 Sep 4; [Epub ahead of print] PMID: 25188816

NEWSLETTER GRUPPO ITALIANO MESOTELIOMA (GIMe)

<http://www.gime.it/>

<https://www.facebook.com/pages/GIME-Mesotelioma-Luciano-Mutti/457987864331790?ref=nf>

Direttore: Prof. Luciano Mutti (Direttore del Dipartimento di Medicina Generale e del Laboratorio di Oncologia Clinica, Vercelli/ Ospedale di Borgosesia)

Coordinatrici: Dott.ssa Ombretta Melaiu (Università di Pisa)
Dott.ssa Elisa Paolicchi (Università di Pisa)

Web editor: Lillo Mendola

Hanno contribuito a questo numero:

Dott.ssa Ombretta Melaiu (Università di Pisa) Dott.ssa Elisa Paolicchi (Università di Pisa) Dott.ssa Elisa Barone (Università di Pisa)

Supervisione Prof. Luciano Mutti (Direttore del Dipartimento di Medicina Generale e del Laboratorio di Oncologia Clinica, Vercelli/ Ospedale di Borgosesia)

Contatti: luciano.mutti@hotmail.it,
ombretta.melaiu@for.unipi.it
elisa.paolicchi@for.unipi.it

DISCLAIMER – Leggere attentamente

Gli autori e redattori della newsletter del Gruppo Italiano Mesotelioma sono Medici, Farmacisti e Biologi, e quanto riportato deriva da affidabili ed autorevoli fonti e studi scientifici, accompagnato dai relativi estratti o riferimenti bibliografici alle pubblicazioni. In ogni caso, le informazioni fornite, le eventuali nozioni su procedure mediche, posologie, descrizioni di farmaci o prodotti d'uso sono da intendersi come di natura generale ed a scopo puramente divulgativo ed illustrativo. Non possono, pertanto, sostituire in nessun modo il consiglio del medico o di altri operatori sanitari. Nulla su <http://www.gime.it/>, sulle relative newsletter, e-mails, o qualsiasi dei progetti del GIMe, può essere interpretato come un tentativo di offrire o rendere un'opinione medica o in altro modo coinvolta nella pratica della Medicina. Il gruppo italiano mesotelioma, i suoi Soci od altre parti ad esso connesse non possono, quindi, essere ritenuti responsabili circa risultati o conseguenze di qualunque utilizzo o tentato utilizzo di una qualsiasi delle informazioni riportate.

Il servizio è totalmente gratuito e non esistono conflitti di interesse o finalità di lucro. Non sono ammesse la divulgazione e la diffusione della newsletter "GIMe" senza precedente autorizzazione scritta del Gruppo Italiano Mesotelioma.

Sostieni il Gruppo Italiano Mesotelioma (GIMe)!

Il GIMe è un'associazione senza scopo di lucro, sostienilo con il tuo 5 per mille dell'IRPEF per destinare tali fondi a Borse di studio e di ricerca per giovani ricercatori.