

### SOMMARIO

- **miR379/411 regola IL-18 e contribuisce alla resistenza alla terapia nel mesotelioma pleurico maligno.**
- **Cisplatino in combinazione con Fenetil-isotiocianato (PEITC) una nuova potenziale strategia terapeutica per il mesotelioma pleurico maligno**

---

### **miR379/411 regola IL-18 e contribuisce alla resistenza alla terapia nel mesotelioma pleurico maligno.**

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

**Razionale e obiettivi:** Fino ad ora la chemioterapia con Pemetrexed (PEM) in combinazione con il Cisplatino (CDDP) ha dato i migliori risultati: il 41% dei pazienti con mesotelioma pleurico maligno (MPM) ha risposto al trattamento con un tempo di sopravvivenza medio di 12 mesi. Data la breve durata della risposta e la rapida ricaduta cui vanno incontro i pazienti trattati, risultano necessarie nuove modalità terapeutiche. Recentemente è stato osservato che, l'inibitore dell'istone deacetilasi (HDAC), Vorinostat (SAHA) aumenta significativamente l'apoptosi indotta dal CDDP nelle cellule di MPM. Inoltre un trial clinico in fase I con carbonplatino e paclitaxel insieme a SAHA ha mostrato un significativo incremento di risposta alla terapia e un trend verso un'augmentata sopravvivenza nei pazienti con MPM. Esistono dunque diverse evidenze che la combinazione SAHA-farmaci derivati del platino potrebbe essere una promettente strategia terapeutica nel MPM. I tumori hanno la capacità di evitare o di sopprimere attivamente le risposte immunitarie antitumorali attraverso diversi meccanismi. La secrezione, da parte di cellule tumorali, di molecole quali IL-6, IL-18 e TGF- $\beta$ , può bloccare direttamente la proliferazione delle cellule T, promuoverne l'apoptosi o conferire alle cellule tumorali resistenza contro l'attacco da parte delle cellule T. L'IL-18 gioca un ruolo importante nell'infiammazione e nella risposta immunitaria; inoltre può promuovere la progressione e le metastasi. La comprensione dello stato infiammatorio dei tumori umani potrebbe condurre verso nuove strategie diagnostiche e terapeutiche. I microRNA (MiRNAs) sono molecole di RNA

a singolo filamento in grado di modulare l'espressione genica attraverso il legame con la 3'UTR dell'mRNA target. I miRNAs possono comportarsi sia da soppressori tumorali che da oncogeni. Recenti studi hanno identificato molti miRNA con potenziale diagnostico, prognostico e terapeutico nel MPM. In questo studio è stata valutata la correlazione tra l'espressione genica di 10 citochine, tra cui l'IL-18, e gli effetti antitumorali di PEM e SAHA nelle linee cellulari di MPM.

**Disegno dello studio:** È stata valutata l'attività antitumorale di PEM e SAHA in sei linee cellulari di MPM attraverso un test di citotossicità. Inoltre i profili di espressione genica, analizzati nelle sei linee cellulari, sono stati confrontati con i risultati ottenuti nel test di citotossicità in modo da ottenere un modello molecolare di sensibilità al farmaco. Al fine di comprendere il ruolo biologico dei geni identificati deregolati è stata effettuata un'analisi del pathway che ha condotto all'identificazione dell'IL-18 come gene associato alla sensibilità al farmaco. È stata quindi analizzata l'espressione dell'IL-18 e di altre 9 citochine nello stesso pannello di cellule valutando la correlazione con la sensibilità al farmaco osservata. Successivamente è stata analizzata l'espressione dei miRNA nelle cellule di MPM per chiarire il meccanismo d'induzione, da parte dell'IL-18, alla resistenza al farmaco. Attraverso l'ausilio di software di predizione *in silico* e il saggio della luciferasi, sono stati identificati due miRNA la cui espressione risultava essere molto bassa nelle linee cellulari resistenti ai farmaci. L'identificazione dei due miRNA chiave nella regolazione dell'espressione dell'IL-18 ha condotto a un test di valutazione della funzione di questi due miRNA, nella capacità invasiva delle cellule di MPM

**End point:** Individuare specifici geni e miRNA che possano essere utili biomarcatori di risposta al farmaco nel MPM.

**Risultati:** In base ai risultati del test di citotossicità verso i due farmaci testati le cellule 211H sono risultate sensibili ai farmaci; le H28 e le H2052 mediamente sensibili mentre le H2452, le MESO1 e le MESO4 sono state ritenute resistenti ad entrambi i trattamenti. Il profilo di espressione genica è stato confrontato tra le cellule 211H e tutte le altre: sono stati identificati 16 geni significativamente correlati alla resistenza alla terapia. L'analisi del pathway ha identificato l'IL-18 come un importante gene associato alla sensibilità al farmaco nelle cellule di MPM: i livelli di espressione dell'IL-18 nelle cellule resistenti erano significativamente più alti rispetto ai livelli trovati nelle 211H. Tra le 9 citochine analizzate l'IL-18 era la più upregolata nelle cellule resistenti. Al fine di comprendere il meccanismo di induzione, IL-18 dipendente, alla resistenza ai trattamenti chemioterapici nelle cellule di MPM è stata analizzata l'espressione dei miRNA: è stata osservata una diminuzione dell'espressione del miRNA 379 e del 411 nelle linee cellulari resistenti alla terapia. Come ulteriore evidenza, il trattamento delle cellule di MPM con miRNA mimic 379/411 ha indotto una diminuzione dell'espressione dell'IL-18, dimostrando il

ruolo regolatorio dei miRNA identificati. Inoltre questo trattamento ha determinato un'inibizione delle capacità invasive nelle cellule di MPM e un aumento della sensibilità al trattamento con SAHA. Questi risultati suggeriscono che i miRNA 379/411 giocano un ruolo chiave nella carcinogenesi dell'MPM regolando l'espressione dell'IL-18 e contribuendo alla sensibilità delle cellule di MPM al SAHA e al PEM.

**Discussione:** L'IL-18, qui identificata come gene di resistenza al farmaco, è in grado di combinarsi con l'IL-2 e svolgere funzioni antitumorali attraverso l'induzione della risposta immunitaria ma, da sola, può promuovere l'angiogenesi, le metastasi e l'evasione dalla risposta immunitaria in assenza di citochine di tipo Th1. In molti tumori umani, aumentati livelli sierici di IL-18 accompagnano la progressione tumorale e contribuiscono ad una prognosi infausta. Questo indica che l'IL-18 gioca un ruolo chiave nella promozione della progressione tumorale e delle metastasi. In questo studio, Yakamoto e i suoi collaboratori hanno osservato che i livelli d'espressione dei miRNA 379 e miRNA 411 erano significativamente diminuiti nelle linee cellulari di MPM resistenti alla terapia. Diminuiti livelli del miRNA 379 sono stati osservati anche nel cancro della mammella; infatti il miRNA 379 è stato individuato come regolatore della produzione dell'IL-11 indotta da ciclina B1 e TGF $\beta$  nelle linee cellulari di tumore della mammella. Il saggio della luciferasi ha evidenziato che l'IL-18 è un target diretto dei due miRNA identificati, i quali tendono a diminuire l'espressione dell'IL-18 sopprimendo anche la capacità invasiva. I risultati di questo studio forniscono la prima evidenza per un ruolo significativo dei miRNA 379/411 nella carcinogenesi dell'MPM, definendoli anche nuovi potenziali target terapeutici. La combinazione dei chemioterapici PEM e CDDP è al momento, il miglior trattamento disponibile per i pazienti con MPM; comunque la sua efficacia rimane limitata, per questo nuovi agenti terapeutici sono necessari. In questo studio sono stati trovati alti livelli di IL-18 nelle linee cellulari di MPM-PEM e SAHA resistenti. Il silenziamento genico dell'IL-18, ottenuto attraverso trasfezione delle linee cellulari con i miRNA mimics 379/411, ha condotto verso un trend di aumento della sensibilità ai farmaci PEM e SAHA in quelle linee cellulari che avevano costitutivamente alti livelli di IL-18. Alti livelli di IL-18 sono stati osservati anche in linee cellulari di cancro della mammella resistenti alla doxorubicina. Una terapia mirata verso l'IL-18 potrebbe essere una nuova strategia terapeutica nei pazienti di MPM con alti livelli di IL-18. Inoltre i miRNA 379/411 potrebbero essere usati come intervento terapeutico atto a regolare l'espressione dell'IL-18 e controllare l'invasione delle cellule di MPM. In conclusione questi dati suggeriscono che l'IL-18 svolge un ruolo chiave nel determinare la sensibilità a PEM e SAHA nelle cellule di MPM. Al fine di comprendere appieno il meccanismo alla base dell'associazione tra i miRNA379/411 e la resistenza ai farmaci nel MPM dovrebbero essere intrapresi ulteriori studi di approfondimento.

**Conclusioni:** I miRNA 379/411 giocano un ruolo chiave nella carcinogenesi dell'MPM regolando l'espressione dell'IL-18 e contribuendo alla sensibilità delle cellule di MPM al SAHA e al PEM; per questo motivo potrebbero rappresentare un nuovo target ter

**Parole chiave:** IL-18, miR379, miR411, mesotelioma, inibitori dell'istone deacetilasi

**Riferimento Bibliografico:** Yakamoto K. Oncol Rep. 2014 Dec;32(6):2365-72

## **Cisplatino in combinazione con Fenetil-isotiocianato (PEITC) una nuova potenziale strategia terapeutica per il mesotelioma pleurico maligno**

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

**Razionale e obiettivi:** Il trattamento di prima linea per la cura del mesotelioma pleurico maligno (MPM) attualmente consiste nella combinazione tra il cisplatino e un antimetabolita: il pemetrexed (Alimta). Comunque, nonostante ci sia una migliore risposta terapeutica, questo miglioramento rimane modesto e solo la metà dei pazienti risponde alla combinazione. È quindi necessario trovare nuovi approcci terapeutici per trattare il MPM. È stato descritto da molti anni che il consumo frequente di verdure crucifere (cavoli) riduce l'incidenza del cancro. L'inibizione della carcinogenesi sembra essere attribuibile ad alcuni dei loro prodotti di degradazione come gli isotiocianati (ITCs). Gli effetti antitumorali possono essere dovuti alla capacità degli ITCs di generare le specie reattive dell'ossigeno (ROS). Tra tutti gli ITC, è stato dimostrato *in vivo* che il PEITC è stato in grado di raggiungere la concentrazione plasmatica massima dopo l'ingestione orale, in un range di dosaggio micromolare. È interessante notare che, dosi micromolari di PEITC applicata a cellule in cultura e modelli animali sono stati mostrati per prevenire il cancro, attraverso diversi meccanismi che devono ancora essere ulteriormente indagati. Gli autori si sono quindi chiesti se la combinazione del cisplatino con PEITC potrebbe essere di potenziale beneficio terapeutico per i pazienti affetti da MPM, agendo con maggiore specificità sulle cellule tumorali e ottenendo minori effetti collaterali. Questo studio si focalizza sulle proprietà antitumorali di PEITC da solo o in combinazione con il cisplatino su un'ampia collezione di linee cellulari di MPM e linee cellulari primarie realizzate dal versamento pleurico di pazienti.

**Disegno dello studio:** Nove linee cellulari di MPM e cellule mesoteliali primarie (PMC), in co-coltura con i Macrofagi M2 presenti nel microambiente del MPM, sono stati utilizzati per valutare le proprietà antitumorali di PEITC e del cisplatino. I composti sono stati impiegati da soli o in combinazione. È stata determinata dopo ogni trattamento la vitalità cellulare, la produzione di specie reattive dell'ossigeno, l'attivazione dell'apoptosi e la capacità delle cellule di formare colonie.

**End point:** Valutare l'effetto di PEITC da solo o in combinazione con cisplatino per migliorare il trattamento del MPM.

**Risultati:** In questo studio è stato dimostrato per la prima volta che il PEITC è citotossico per le cellule di MPM grazie alla produzione dei ROS e che sia il PEITC che il cisplatino sono citotossici per le cellule MPM in maniera dose dipendente. Inoltre la combinazione cisplatino-PEITC ha dimostrato un potenziamento degli effetti citotossici di entrambi i composti, inoltre si è ridotta la comparsa di cellule di MPM resistenti. È interessante

notare che, le PMC normali non erano sensibili alla combinazione. Infine, la presenza di macrofagi M2 non ha fatto modificare le proprietà anti-tumorali della combinazione. Questi risultati suggeriscono che la combinazione di cisplatino-PEITC potrebbe essere di grande interesse per il trattamento del MPM.

**Discussione:** Utilizzando linee cellulari primarie di MPM costituite da fluidi pleurici dei pazienti, è stato dimostrato per la prima volta che queste cellule erano sensibili all'ITCs. Inoltre, questo studio ha dimostrato che l'induzione della morte cellulare per apoptosi del PEITC era pienamente dipendente dalla produzione dei ROS. Un precedente studio ha dimostrato un'interessante potenzializzazione dell'effetto della combinazione cisplatino-PEITC in un modello di cancro al polmone. Sebbene alcuni studi recentemente pubblicati hanno studiato l'impatto della combinazione cisplatino-PEITC su altri tipi di cancro, questo lavoro si concentra per la prima volta sul MPM, e porta nuove conoscenze per un migliore approccio in questa malattia incurabile. Per la prima volta. In questo studio è stato dimostrato che la combinazione cisplatino-PEITC induce significativamente la morte cellulare di MPM, potenzia i danni al DNA e una delle caratteristiche più importanti, non è tossico per le cellule sane e impedisce la formazione di cellule resistenti. La combinazione cisplatino-PEITC ha mostrato una diminuzione della vitalità cellulare dopo 72h di trattamento. Inoltre, il test clonogenico ha confermato che la combinazione ha portato ad una potenzializzazione degli effetti citotossici in entrambi i composti. Sebbene sia che il cisplatino e il PEITC hanno mostrato un'attività anti-tumorale interessante dopo 72h, quando usati da soli, ripetuti trattamenti hanno portato all'apparizione di cellule resistenti caratterizzate da una perdita di efficacia delle due molecole. Infatti, è stato osservato, che in più della metà delle linee cellulari di MPM testate, avveniva una diminuzione della sensibilità o resistenza verso ogni molecola. Questo potrebbe spiegare lo scarso beneficio terapeutico del cisplatino sui pazienti di MPM e potrebbe anche suggerire che anche PEITC usato da solo avrebbe un'efficacia limitata per l'uso clinico. La produzione di ROS nelle cellule agisce grazie a diversi meccanismi basati sui danni del DNA, ma colpisce soprattutto la guanina che viene trasformato in 8-oxo- 2'deoxyguanosine (8-oxoG). Il principale meccanismo di riparazione del DNA coinvolto nel rimuovere le lesioni del DNA indotte da ROS è la riparazione per escissione di base (BER). Pertanto, è stato ipotizzato che combinando il cisplatino con PEITC, sia la via molecolare di BER che NER (riparazione per escissione nucleotidica) è attivata. La possibilità di aumentare le cellule resistenti sarebbero così limitate a causa della difficoltà per una cellula di attivare due vie di risposta al danno del DNA allo stesso tempo. Il microambiente tumorale svolge un importante ruolo nello sviluppo del tumore e diversi attori sono coinvolti. Tra tutte le cellule presenti nell'ambiente del tumore, i macrofagi sono di notevole importanza e sono



stati descritti come stimolatori della proliferazione delle cellule tumorali. In questo studio è stato dimostrato che la combinazione cisplatino- PEITC è tossica sulle cellule di MPM. La presenza dei macrofagi non modifica la sensibilità delle cellule di MPM alla combinazione. Quindi una somministrazione locale della combinazione cisplatino-PEITC nella cavità pleurica potrebbe essere una promettente strategia per indurre tossicità selettiva verso le cellule maligne. Complessivamente, la combinazione di cisplatino PEITC potrebbe migliorare la morte delle cellule tumorali rispetto ai composti utilizzati da soli e prevenire l'insorgere della resistenza delle cellule, rimanendo sicuro per le PMC sane.

**Conclusioni:** *La combinazione di cisplatino con la molecola naturale PEITC induce una forte morte cellulare nel MPM, rimanendo non tossico per le PMC sane, con comparsa limitata di resistenza rispetto ai farmaci usati da soli. Pertanto, questa combinazione potrebbe rappresentare una strategia promettente per il trattamento del MPM.*

**Parole chiave:** mesotelioma, cisplatino, isotiocianato, specie reattive dell'ossigeno, trattamento combinato

**Riferimento Bibliografico:** Denis I Oncotarget. 2014 Oct 18. pii: 2604.

## 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](mailto:luciano.mutti@hotmail.it),  
[ombretta.melaiu@for.unipi.it](mailto:ombretta.melaiu@for.unipi.it)  
[elisa.paolicchi@for.unipi.it](mailto: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.***