



Indice

Premessa	2
U.O. 1 Istituto Superiore di Sanità - Responsabile Scientifico Dott.ssa Loredana Musmeci	3
La presenza di amianto nei siti inquinati: Stima dell'esposizione, impatto sanitario e priorità per le bonifiche	
U.O. 2 Università Amedeo Avogadro del Piemonte Orientale - Responsabile Scientifico Prof. Corrado Magnani	7
Studi sull'evoluzione nel tempo del rischio di patologia da amianto tra gli ex-esposti e sui modificatori su base genetica del rischio di mesotelioma	
U.O. 3 Università di Torino - Responsabile Scientifico Prof. Giorgio Scagliotti	15
Analisi di nuovi bio-marcatori predittivi di risposta alla chemioterapia con tecniche di espressione genica e proteica ad alta risoluzione per una migliore definizione della strategia terapeutica in pazienti affetti da mesotelioma pleurico	
U.O. 4 Istituto Tumori "Regina Elena" - Responsabile Scientifico Prof. Ruggero de Maria	18
Caratterizzazione funzionale delle cellule staminali tumorali derivanti da mesoteliomi pleurici per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici	

RICERCA CORRENTE 2012: Progetto amianto – Programma di Dettaglio (2013 – 2014)

Coordinamento del Progetto: Dr.ssa Loredana Musmeci,

**Direttore del Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione Primaria,
Istituto Superiore di Sanità**

Premessa

Recenti documenti italiani in merito alle problematiche dell'esposizione ad amianto e delle patologie conseguenti includono: il rapporto della Seconda Conferenza di Consenso sul Mesotelioma Maligno della pleura (24-25 Novembre 2011), il rapporto finale (2012) del Gruppo di Studio costituito con DM 8 aprile 2008, il Quaderno 15 del Ministero della Salute (Stato dell'arte e prospettive in materia di contrasto alle patologie asbesto-correlate) ed il 4° Rapporto del ReNaM. Tra i molti documenti internazionali di valutazione del rischio connesso all'esposizione ad amianto è particolarmente rilevante ed aggiornata la Monografia n. 100C della Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (2011).

Lo stato dell'arte sulle conoscenze scientifiche sui rischi da amianto è stato esaminato nella II Conferenza Governativa Amianto, (Venezia, 22-24 novembre 2012), dove si sono confrontate tutte le componenti interessate, per poter giungere ad una proposta di piano operativo comprensivo delle linee di azione per le diverse problematiche individuate.

Conseguentemente è in corso di elaborazione definitiva il PIANO NAZIONALE AMIANTO che definisce le linee di azioni da intraprendere a breve e medio termine.

Il **Progetto Amianto**, finanziato dal Ministero Salute e coordinato dall'ISS, costituisce una prima attuazione di detto Piano Nazionale Amianto; esso cercherà di dare alcune risposte a problematiche ancora aperte, quali:

- Il rischio connesso all'esposizione non professionale ed ambientale residua dopo il bando dell'amianto
- Le metodologie più efficaci per la sorveglianza sanitaria ed epidemiologica
- Sistemi innovativi di diagnosi e cura delle malattie correlate all'esposizione ad amianto
- Cooperazione con i paesi in cui l'uso dell'amianto è ancora consentito

Il Progetto si compone di 4 Unità Operative (U.O.) di seguito descritte.

U.O. 1 Istituto Superiore di Sanità

La presenza di amianto nei siti inquinati: Stima dell'esposizione, impatto sanitario e priorità per le bonifiche

Responsabile Scientifico U.O.1 Istituto Superiore di Sanità: Dr.ssa Loredana Musmeci,
Direttore del Dipartimento Ambiente e connessa Prevenzione Primaria, ISS

L'Unità Operativa 1 si articola in varie Linee di Ricerca, sinteticamente descritte di seguito:

1. Stima dell'esposizione a fibre nei siti inquinati con presenza di amianto (Reparti Igiene dell'Aria e Suolo e Rifiuti)
2. Il rischio sanitario associato allo smaltimento dei rifiuti contenenti amianto (Reparto Suolo e Rifiuti)
3. Linee guida per la determinazione analitica dell'amianto con particolare riferimento alle matrici biologiche (Reparto Igiene dell'Aria)
4. Sorveglianza epidemiologica della patologia asbesto-correlata in Italia con particolare riferimento ai siti inquinati con presenza di amianto (Reparto Epidemiologia Ambientale e Ufficio di Statistica)
5. Impatto sanitario della fluoro-edenite, stima dell'esposizione e priorità del processo di bonifica (Reparti Igiene dell'Aria, Suolo e Rifiuti, Epidemiologia Ambientale e Ufficio di Statistica)
6. Disseminazione dell'informazione scientifica sulla prevenzione della patologia asbesto-correlata nei paesi in cui l'uso dell'amianto è tuttora consentito, con particolare riferimento all'America Latina (Settore Attività Editoriali); supporto all'attività editoriale del Progetto.

Il Reparto di Igiene dell'Aria parteciperà alle seguenti linee di ricerca:

Linea di Ricerca 1 Stima dell'esposizione a fibre nei siti inquinati con presenza di amianto. In coordinamento con il Reparto di Suolo e Rifiuti saranno definiti ed attuati piani di campionamenti attivi e passivi mediante deposimetri e campionatori per materiale aerodisperso in una serie di siti contaminati. Per la valutazione dei livelli di esposizione, attuale e pregressa, a materiale fibroso saranno svolte le seguenti attività:

- raccolta, analisi e valutazione dei dati di monitoraggio esistenti;
- analisi del materiale campionato tramite tecniche di microscopia ottica ed elettronica (secondo la normativa vigente D.M. 6 settembre 1994) al fine di caratterizzare e classificare chimicamente il materiale fibroso eventualmente individuato;
- analisi della possibile esposizione a fibre avvalendosi di modelli per la stima dell'esposizione pregressa.

Lo studio consentirà di ottenere informazioni sulla dispersione ambientale di tale inquinante, sui fenomeni di trasporto e ricaduta delle fibre, sull'esposizione umana e di supportare le conseguenti indagini epidemiologiche .

Linea di Ricerca 3 Linee guida per la determinazione analitica dell'amianto con particolare riferimento alle matrici biologiche. Il Reparto Igiene dell'Aria svolgerà le seguenti attività:

- analisi e valutazione dei metodi proposti dalla letteratura corrente per la determinazione del contenuto di amianto in varie matrici organiche (espettorato, BALF, frammenti biotici e autotici di tessuto polmonare);
- sviluppo di metodi per la preparazione di campioni di varie matrici organiche per l'analisi mediante tecniche microscopiche in collaborazione con il Dipartimento di Medicina Traslazionale Università del Piemonte Orientale;
- sviluppo di metodi d'analisi dei campioni di matrice organica mediante tecniche di microscopia ottica ed elettronica analitica.

Tale attività sarà finalizzata a standardizzare i metodi per un'adeguata preparativa ed analisi dei campioni al fine di consentire una corretta identificazione del materiale fibroso, individuare le potenzialità ed i limiti delle metodiche analitiche in esame e creare un manuale fotografico-didattico per la corretta ed univoca identificazione dei corpuscoli dell'amianto tramite metodiche microscopiche.

Linea di Ricerca 5 Impatto sanitario della fluoro-edenite, stima dell'esposizione e priorità del processo di bonifica. La quantificazione e caratterizzazione dell'esposizione umana a materiale fibroso nell'area di Biancavilla è un'attività di speciale interesse per la tipologia dell'esposizione e del materiale fibroso presente. In collaborazione con il Reparto Suolo e Rifiuti sarà stimata, avvalendosi della microscopia ottica ed elettronica analitica, la variabilità spaziale della concentrazione in aria di fibre fluoro-edenitiche al fine di verificare per comparazione l'efficacia degli interventi di mitigazione attuati negli ultimi dieci anni e di supportare gli studi del Reparto di Epidemiologia Ambientale e dell'Ufficio Statistica.

Il Reparto Suolo e Rifiuti parteciperà alle seguenti linee di ricerca:

Linea di Ricerca 1 Stima dell'esposizione a fibre nei siti inquinati con presenza di amianto. In coordinamento con il Reparto Igiene dell'Aria, progettazione ed esecuzione di un piano di campionamento, per le matrici suolo (e rifiuti) ed aria, in un determinato sottoinsieme di Siti di Interesse Nazionale, impianti di smaltimento rifiuti contenenti amianto e siti in bonifica con contaminazione anche da amianto al fine di stimare l'esposizione dei residenti e lavoratori potenzialmente esposti alla presenza di fibre di amianto.

Linea di Ricerca 2 Il rischio sanitario associato allo smaltimento dei rifiuti contenenti amianto. Il Reparto Suolo e Rifiuti, acquisiti i dati di campionamento e valutazione della stima dell'esposizione di cui al punto precedente elaborerà apposita procedura di valutazione delle criticità emerse nello studio degli impianti che gestiscono i rifiuti contenenti amianto, al fine di ottimizzarne la gestione stessa, eliminare i rischi e gli impatti rilevati proponendo, in caso, apposite procedure di mitigazione.

Linea di Ricerca 5 Impatto sanitario della fluoro-edenite, stima dell'esposizione e priorità del processo di bonifica. In coordinamento con il Reparto Igiene dell'Aria, il Reparto Epidemiologia Ambientale e l'Ufficio Statistica, è prevista specifica

caratterizzazione dei siti con presenza di fluoro-edenite e della contaminazione ad esso correlata nonché del relativo impatto sanitario. Tutto ciò sarà finalizzato a:

- gerarchizzare, anche con l'ausilio di un mirato studio statistico che consenta l'elaborazione dei dati di contaminazione, esposizione e rischio sanitario correlato, la priorità di intervento dei progetti di bonifica, sia nei SIN che nei siti in bonifica scelti.
- proporre una metodologia di approccio che sia funzionale alla pianificazione territoriale di interventi analoghi all'interno delle competenze Regionali e Provinciali.

Il Reparto Epidemiologia Ambientale e l'Ufficio di Statistica parteciperanno alle seguenti linee di ricerca:

Linea di Ricerca 4 Reparto di Epidemiologia Ambientale svolgerà, in collaborazione con l'Ufficio di Statistica, un'attività di sorveglianza epidemiologica della patologia asbesto-correlata (mesotelioma di pleura, peritoneo, pericardio e tunica vaginale del testicolo; tumore maligno di polmone, laringe e ovaio; asbestosi) nei siti di interesse nazionale per le bonifiche, con particolare riferimento a quelli per i quali la presenza di amianto è esplicitamente menzionata nei decreti istitutivi.

Linea di Ricerca 5 Uno specifico filone di ricerca riguarderà il sito di Biancavilla, caratterizzato dalla presenza di fluoro-edenite, una fibra asbestiforme presente nei suoli e in particolare nel materiale lapideo ampiamente utilizzato per decenni nell'edilizia locale. La fluoro-edenite causa mesoteliomi nell'uomo e nell'animale da laboratorio. Occorre ora capire quale sia il suo spettro d'azione anche in relazione all'induzione di asbestosi, placche e ispessimenti pleurici.

In collaborazione con i Reparti Igiene dell'Aria e Suolo e Rifiuti, il Reparto di Epidemiologia Ambientale concorrerà inoltre all'individuazione delle misure di contrasto alla patologia asbesto-correlata nei siti in esame, e all'individuazione delle priorità degli interventi di bonifica.

Il Settore Attività Editoriali (SAE) parteciperà alla seguente linea di ricerca

Linea di Ricerca 6 Il SAE svolgerà la propria attività nelle seguenti 3 aree:

- Disseminazione dell'informazione scientifica sulla prevenzione della patologia asbesto-correlata nei paesi in cui l'uso dell'amianto è tuttora consentito, con particolare riferimento all'America Latina.

Le informazioni scientifiche già validate sulla prevenzione della patologia asbesto-correlata e le nuove informazioni risultanti dalle attività di ricerca del progetto saranno opportunamente selezionate per la loro disseminazione a target diversi (ricercatori, operatori sanitari, decisori politici, organizzazioni sociali, studenti), nei paesi in cui l'uso dell'amianto è tuttora consentito, con particolare riferimento all'America Latina. Questa attività di disseminazione comprenderà la produzione di strumenti idonei (documentazione tecnico- scientifica, dépliant, poster, newsletter,

video) in diverse lingue (italiano, spagnolo, inglese, e/o altre lingue). Tutta la documentazione sarà accessibile online, secondo il paradigma dell'accesso aperto alla letteratura scientifica derivante da finanziamenti pubblici, fortemente sostenuto e adottato dall'ISS già da diversi anni. La disseminazione di tale documentazione sarà effettuata in parte direttamente dall'ISS e in parte dalle istituzioni accademiche e di ricerca dei paesi latino americani con i quali l'ISS ha già avviato accordi di collaborazione tecnico-scientifica nell'area della Salute Pubblica e in particolare nel settore Ambiente e Salute (Universidad Tecnológica Equinoccial de Quito, Ecuador; Istituto de Salud Pública, Bogotá, Colombia). Sarà anche utilizzata la rete di istituzioni europee e latino americane sviluppata nell'ambito del progetto NECOBELAC - Network of Collaboration BETWEEN Europe and Latin American Caribbean countries (2009-2012, EC FP7), coordinato dal SAE-ISS.

- Attività editoriale a supporto del Progetto

Il SAE svilupperà la linea grafica identificativa del progetto (logo) e produrrà materiale promozionale anche multimediale a supporto del progetto.

Il SAE curerà l'attività editoriale del progetto attraverso la pubblicazione delle attività e dei risultati nelle serie edite dall'ISS. In particolare si prevede la pubblicazione di:

- un *Rapporto ISTISAN*, ad uso degli operatori del settore, in lingua italiana e spagnola;
- un volume della serie *ISTISAN Congressi* da distribuire al Convegno finale del progetto;
- una Monografia in inglese nella rivista *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* che offra una riflessione sui risultati dell'attività del Progetto nel più ampio dibattito internazionale.

- Organizzazione dei eventi del Progetto (Seminari e Convegno finale)

E' prevista l'organizzazione di uno o più seminari tecnico-scientifici in America Latina, co-organizzati con le istituzioni con le quali l'ISS ha già in corso accordi di collaborazione tecnico-scientifica.

E' prevista l'organizzazione di una giornata per la promozione delle conoscenze di base sulle problematiche asbesto-correlate rivolta agli studenti delle scuole secondarie, nell'ambito della Settimana della scienza 2014.

E' prevista l'organizzazione di un Convegno finale sulle attività/risultati del Progetto, da svolgersi a Roma nel 2014 a conclusione del Progetto (dicembre).

U.O. 2 Università Amedeo Avogadro del Piemonte Orientale

Studi sull'evoluzione nel tempo del rischio di patologia da amianto tra gli esposti e sui modificatori su base genetica del rischio di mesotelioma.

Responsabile Scientifico U.O.2 Amedeo Avogadro del Piemonte Orientale:
Prof. Corrado Magnani, Dipartimento di Medicina Traslazionale Università del
Piemonte Orientale Novara

Il progetto è articolato in tre Linee di Ricerca.

Linea di Ricerca 1. Il rischio di patologia amianto-correlata dopo la cessazione dell'esposizione

E' in corso un dibattito scientifico, con ricadute dirette ed importanti in ambito di sanità pubblica, sull'evoluzione del rischio di malattie da amianto dopo la cessazione dell'esposizione. Nel caso del mesotelioma maligno, che è la patologia di maggior rilevanza oggi, si contrappongono due modelli scientifici: al modello che riconosce per l'amianto un solo effetto iniziante e che quindi prevede la costanza del rischio dopo la cessazione dell'esposizione si è contrapposto negli ultimi anni un modello definito partendo da osservazioni epidemiologiche che prevede la riduzione del rischio dopo la cessazione dell'esposizione.

Dal punto di vista biologico questo secondo modello trova la sua plausibilità sulla base di: i. l'osservazione della molteplicità degli effetti biologici riconosciuti in conseguenza dell'esposizione ad amianto, in particolare degli effetti infiammatori che sono esercitati dalle fibre presenti nel tessuto polmonare e pleurico e che sono associati al carico di fibre; ii. le osservazioni empiriche sulla riduzione del carico di fibre dai tessuti polmonari in coorti di soggetti esposti. Considerati i due aspetti insieme, si ritiene biologicamente plausibile che, qualora la concentrazione di fibre di amianto nei tessuti si riduca, si possa assistere anche ad una riduzione della frequenza di patologie neoplastiche causate da tale esposizione. Peraltro è essenziale estendere, verificare, e si auspica rinforzare, le osservazioni epidemiologiche sulla riduzione del rischio di neoplasia dopo la cessazione dell'esposizione, che sono ancora limitate nel mondo a pochi studi di coorte.

In Italia esiste un ampio ventaglio di studi di coorte su gruppi di ex-esposti ad amianto in diverse regioni italiane (elenco delle regioni e delle coorti principali che sono già state oggetto di studio epidemiologico con risultati pubblicati: Piemonte (Cemento Amianto Casale Monferrato: Eternit, Eternit Mogli, Tessile: SIA di Grugliasco, Miniera: Balangero), Lombardia (Cemento Amianto: Broni), Emilia (pool di coorti del cemento amianto, Costruzioni Ferroviarie Bologna); Marche (Cemento amianto Senigallia), Veneto (Officine Grandi Riparazioni, Cemento Amianto, Costruzioni Ferroviarie), Trentino (Produttori isolamenti in amosite Arco di Trento), Friuli (Cantieri navali, Monfalcone - non ancora pubblicato come studio di coorte ma solo come analisi dei casi), Toscana (pool di coorti di esposti ad amianto di oltre 10000 persone,

prevalentemente in costruzioni meccaniche, termoelettrica, macchinari pesanti), Lazio (Costruzioni ferroviarie Colleferro, altre coorti in corso di follow-up), Campania (Cemento amianto Bagnoli), Puglia (Cemento Amianto Bari). La cessazione dell'uso di amianto ed il controllo dell'esposizione residua imposte dal D.leg 257/1992 hanno determinato una situazione 'quasi sperimentale' che, opportunamente investigata consente di misurare su ampia scala l'andamento del rischio di patologia da amianto tra gli ex esposti.

Si propone quindi di condurre uno studio che includa il numero più ampio possibile di coorti, includendo inizialmente le coorti già indagate e che richiedono solo un aggiornamento dei dati.

Questi studi saranno quindi inclusi in un'analisi pooled da cui otterremo informazioni sulla variazione del rischio di morte per mesotelioma e per altre neoplasie dopo latenza molto lunga (oltre 40 anni indicativamente) e dopo la cessazione.

I registri regionali dei mesoteliomi indicheranno i casi incidenti di mesotelioma (pleurico e peritoneale) in modo da ottenere informazioni sulla variazione dell'incidenza di mesotelioma dopo latenza molto lunga (oltre 40 anni indicativamente) e tempo dalla cessazione.

Valutazioni preliminari condotte nella fase di preparazione del progetto hanno confermato la disponibilità della maggior parte delle coorti citate in precedenza.

Per l'aggiornamento del follow-up saranno valutate nuove metodologie, basate sulle informazioni presenti in archivi elettronici. I metodi tradizionali di follow-up postale saranno impiegati ove necessario.

Interazione con altri progetti:

- Le coorti che corrispondono ad aree ad alto rischio ambientale con esposizione ad amianto forniranno informazioni utili a separare tra i residenti gli effetti causati da esposizione ambientale da quelli causati da esposizione occupazionale.

Attività

- Costituzione del panel di ricercatori e formalizzazione degli impegni sulla disponibilità dei dati per lo studio e le analisi pooled;
- Aggiornamento del follow-up di mortalità degli studi di coorte partecipanti;
- Ricognizione delle informazioni sull'esposizione disponibili per le diverse coorti;
- Costruzione di un repertorio delle informazioni sull'esposizione, finalizzato alla analisi pooled con considerazione dei livelli di esposizione;
- Costruzione di un data base comune per le analisi pooled;
- Controlli di qualità dei dati inseriti nel data base comune;
- Armonizzazione dei dati delle diverse coorti;

- Aggiornamento dei tassi di riferimento di mortalità, per regione, periodo e versione della classificazione ICD;
- Predisposizione dei tassi di riferimento di incidenza, per regione e periodo;
- Analisi statistiche della variazione del rischio dopo la cessazione dell'esposizione, per diversi criteri di aggregazione delle diverse coorti, secondo modelli classici (SMR o SIR) e di regressione multivariata (Modelli di Poisson). Verrà valutata l'utilità dell'analisi dei dati con un modello caso controllo nested, che rispetto al modello di Poisson consente una maggiore flessibilità nei metodi di analisi statistica.

Linea di Ricerca 2 Il rischio di patologia amianto tra gli esposti a solo crisotilo

E' riconosciuto dalle valutazioni delle principali agenzie internazionali, come la IARC, che anche l'amianto crisotilo determina tra gli esposti un aumento del rischio di mesotelioma ma l'entità di tale rischio e quindi la potenza cancerogena delle fibre di crisotilo sono argomenti dibattuti in ambito scientifico.

Il numero di studi di coorte di soggetti con esposizione a solo crisotilo è sorprendentemente modesto, considerata l'enorme quantità di tale minerale estratto ed utilizzato al mondo. Le coorti di minatori e di addetti alla prima lavorazione sono limitate a pochi studi, di cui soltanto la coorte dei minatori di crisotilo cinesi ha un aggiornamento del follow-up ad anni recenti. In questo ambito la coorte dei minatori di crisotilo di Balangero costituisce una preziosa risorsa. I risultati di ricerche in proposito, oltre che per la rilevanza scientifica, saranno di rilievo per le ricadute di sanità pubblica in Italia e nel mondo, poiché l'amianto crisotilo è ampiamente utilizzato in molti paesi, in particolare in paesi in via di sviluppo.

I lavoratori della miniera di Balangero sono stati inclusi in studi di coorte di mortalità, l'ultimo dei quali con follow-up aggiornato al 2003 (Pira et al, 2009) ed in valutazioni dei casi incidenti di mesotelioma, aggiornati al 2007 (Mirabelli et al, 2008). Per l'aggiornamento di tali osservazioni è stata condotta dal CPO-Piemonte una verifica della composizione della coorte con estensione agli assunti degli anni più recenti, sulla base dei libri matricola. Si intende completare l'aggiornamento del follow-up di mortalità e di incidenza di mesotelioma, secondo modalità analoghe a quelle adottate nella precedente sezione del progetto. Le analisi consentiranno, essendo l'esposizione lavorativa cessata completamente nel 1990, anno di conclusione dell'attività estrattiva, anche lo studio della variazione del rischio dopo la cessazione dell'esposizione.

Per l'aggiornamento del follow-up saranno valutate nuove metodologie, basate sulle informazioni presenti in archivi elettronici. I metodi tradizionali di follow-up postale saranno impiegati ove necessario.

Interazione con altri progetti:

- L'area di Balangero è uno dei siti di interesse nazionale a causa dell'esposizione ad amianto, causata principalmente dall'Amiantifera di Balangero ma anche da alcune aziende manifatturiere situate in comuni vicini all'area. L'aggiornamento dello studio di coorte fornirà informazioni utili a separare tra i residenti gli effetti causati da esposizione ambientale da quelli causati da esposizione occupazionale.
- Ogni informazione aggiornata sul rischio sanitario connesso all'esposizione a crisotilo è di particolare rilevanza per l'aggiornamento delle politiche sanitarie ed economiche dei paesi che producono o utilizzano tale minerale, pertanto questa sezione del progetto potrà integrarsi in particolare con la linea di attività sulla diffusione scientifica.
- La coorte di Balangero contribuirà allo studio sulla variazione del rischio dopo la cessazione dell'esposizione.

Attività

- Aggiornamento dello studio di coorte e del follow-up di mortalità e di incidenza;
- Costruzione di un repertorio delle informazioni sull'esposizione, finalizzato alla analisi pooled con considerazione dei livelli di esposizione;
- Analisi statistiche della mortalità per causa e dell'incidenza di mesotelioma, con analisi per intensità e durata dell'esposizione e latenza.
- Inserimento dei dati nel data base per il progetto "Il rischio di patologia amianto-correlata dopo la cessazione dell'esposizione".

Linea di Ricerca 3 Approfondimento sui meccanismi di azione dell'amianto e dell'interazione tra esposizione, caratteristiche individuali e fattori genetici nell'eziologia del mesotelioma

L'interazione tra fattori genetici ed esposizione ambientale costituisce un importante orizzonte nella ricerca biologica sull'eziologia dei tumori. Non fanno eccezione i mesoteliomi che, come spesso viene ricordato, determinano un rischio cumulativo nell'ordine al massimo del 10%, anche tra le coorti di soggetti fortemente esposti ad amianto.

L'integrazione tra indagini epidemiologiche e studi di biologia molecolare e genetica sui mesoteliomi costituisce una occasione unica per affrontare questo argomento, in modo semplificato rispetto ad analoghi studi su altre neoplasie per il fatto che l'esposizione ad amianto è l'unico fattore esogeno rilevante per l'eziologia del mesotelioma. Da questo punto di vista il mesotelioma maligno può costituire un modello di studio più semplice di altri tumori causati da molteplici esposizioni.

Gruppi di ricercatori italiani (Università del Piemonte Orientale: Magnani e Dianzani; Università di Torino: Matullo e Mirabelli; Istituto Tumori di Genova: Bonassi e Neri) si sono già coordinati per condurre studi sulla variazione del rischio di

mesotelioma pleurico in relazione a specifiche mutazioni, in particolare mutazioni che determinano una diversa capacità di riparazione del DNA dopo un danno ossidativo (uno dei meccanismi di azione delle fibre di amianto). Lo stesso gruppo ha condotto un Genome Wide Association Study (GWAS) su 392 casi e 379 controlli, che ha identificato associazioni fortemente significative, con interazione tra genetica ed esposizione ad amianto (in press). I risultati necessitano però di approfondimenti e conferme. Si ritiene quindi importante sviluppare queste osservazioni, consolidandole anche dal punto di vista della dimensione dello studio e proponendole per l'estensione in studi internazionali. E' essenziale la conduzione dello studio secondo un preciso disegno epidemiologico, per evitare distorsioni causate dalla non confrontabilità dei casi e dei controlli.

Mancano evidenze relativamente alla possibile relazione tra prognosi del mesotelioma e caratteristiche genetiche del soggetto, che potrebbero essere di estremo interesse nella prospettiva di individuare le terapie migliori per i diversi casi.

Interazione con altri progetti

- Il materiale biologico raccolto in questo studio ed incluso nella banca biologica del mesotelioma sarà la base per futuri studi, strettamente coordinati con gli studi clinici sul mesotelioma.
- Il materiale biologico raccolto (i campioni di tessuto sano polmonare e pleurico e tessuto tumorale) potrà essere utilizzato per stime individuali del carico di fibre, che potranno essere effettuate presso il laboratorio dell'ISS.
- Le analisi genetiche dei casi (studio GWAS) potranno essere utilizzate per indagare eventuali profili genetici connessi con la prognosi ed i risultati potranno contribuire alla ricerca di terapie del mesotelioma.
- La rilevazione dei casi di mesotelioma e dei controlli di popolazione potranno essere condotte interagendo con attività in corso di sorveglianza epidemiologica, in particolare la rilevazione dei casi di mesotelioma condotta dai registri mesotelioma e la survey sull'esposizione ad amianto condotta in Piemonte, Lombardia, Veneto, Toscana e Puglia nell'ambito di un progetto CCM (coordinatore D.Mirabelli).

Attività

- Studio caso controllo sul mesotelioma, con disegno caso controllo di popolazione, accurata stima dell'esposizione ad amianto (con intervista secondo un questionario standardizzato, con valutazione dell'esposizione da parte di esperti igienisti industriali) e raccolta di campioni biologici (per i casi: sangue, tessuto tumorale, tessuto polmonare e tessuto pleurico indenne da neoplasia, liquido di versamento pleurico; per i controlli: sangue). Si ha l'obiettivo della raccolta di materiale biologico per circa 200 casi e 200 controlli (campione di sangue per tutti, campioni di tessuto polmonare, e pleurico e di tessuto neoplastico per i casi con intervento chirurgico. Per i soggetti che non accettano il prelievo di sangue si prevede la possibilità di un campione di saliva).

- Conservazione dei campioni in banca di materiale biologico dedicata. A questo fine verrà estesa la collaborazione in atto con la banca biologica del mesotelioma dell'AO di Alessandria.

- Analisi genetica sui 'geni candidati', a replicazione dei risultati dello studio GWAS già condotto. Questa attività sarà condotta nel laboratorio di genetica della Prof.Irma Dianzani dell'Università di Piemonte Orientale, con cui il coordinatore del progetto collabora per analoghi studi.

- Follow-up di sopravvivenza dei casi e valutazione dello stadio di malattia.

- Analisi statistiche dello studio caso-controllo, relative all'associazione tra caratteristiche genetiche e rischio di mesotelioma.

- Analisi statistiche dei soli casi, relative all'associazione tra caratteristiche genetiche e prognosi, stadio ed altre caratteristiche della malattia.

Il restante materiale biologico sarà conservato per ulteriori progetti, inclusa la possibilità di misurare il carico polmonare delle fibre di amianto.

Per la replicazione dello studio GWAS) o di studi esplorativi dell'intero genoma con metodologie allo stato dell'arte) sui nuovi casi e controlli saranno necessarie risorse aggiuntive, ad esempio con la partecipazione a bandi di ricerca internazionali. Limitatamente alle risorse disponibili saranno condotti su sottoinsiemi dei soggetti valutazione con metodologie quali next-generation sequencing delle regioni di maggiore interesse emerse dallo studio GWAS o suggerite dalla letteratura oppure la caratterizzazione genomica/epigenomica, in particolare dei campioni di tessuto pleurico indenne da neoplasia.

La rilevazione dei soggetti avverrà con interazione con attività correnti di rilevazione e documentazione dei casi di mesotelioma condotta dai registri mesotelioma e con la survey sull'esposizione ad amianto condotta in Piemonte, Lombardia, Veneto, Toscana e Puglia nell'ambito dell'attività dei COR - ReNaM e di un progetto CCM (coordinatore D.Mirabelli).

Lo studio sarà sottoposto alla valutazione del comitato etico di riferimento per l'Università del Piemonte Orientale e la partecipazione allo studio sarà volontaria, con firma di un consenso informato da parte dei soggetti interessati.

Milestones intermedie a 12 mesi.

Linea di Ricerca 1.:

- definizione dell'elenco delle coorti, con accordi formali di collaborazione (obiettivo almeno 10000 assunti prima del 1980);

- incontro con tutti i P.I.;

- inserimento in un repertorio comune delle informazioni relative alla coorte (criteri di inclusione, di arruolamento, ecc);

- inserimento in un repertorio comune delle informazioni sull'esposizione per le diverse coorti;
- avvio del follow-up (obiettivo almeno 50% dei soggetti con follow-up aggiornato al 2010).

Linea di Ricerca 2.:

- controllo di qualità delle coorte aggiornato fino alla chiusura dell'attività estrattiva;
- Ricostruzione storica delle informazioni sull'esposizione, con reperimento dei dati da archivi storici (Archivio di Stato, Atti processuali, Corpo miniere, ENPI, INAIL, ARPA ecc) e costruzione di una matrice di esposizione per periodo e area di lavoro;
- avvio del follow-up (obiettivo almeno 50% dei soggetti con follow-up aggiornato al 2010).

Linea di Ricerca 3.:

- approvazione da parte del comitato etico
- definizione di protocollo di intesa con la banca biologica del mesotelioma dell'AO di Alessandria;
- definizione di protocollo di intesa dei centri ospedalieri per il reclutamento di casi e del protocollo di campionamento dei controlli;
- avvio della rilevazione dei casi e dei controlli, con obiettivo di 100 casi e 100 controlli con intervista e campione di sangue /saliva;
- analisi dei geni candidati per i 10 geni maggiormente associati al rischio di mesotelioma, per i casi e controlli del primo anno di attività.

Milestones finale a 24 mesi.

Linea di Ricerca 1.:

- completamento del follow-up (obiettivo almeno 95% dei soggetti con f.u. aggiornato al 2010).
- file con tassi di riferimento;
- analisi dei dati con metodologia tradizionale (SMR)
- analisi dei dati con metodi multivariati
- stesura rapporto finale e discussione durante un incontro con tutti i P.I.;

Linea di Ricerca 2:

- completamento del follow-up (obiettivo almeno 95% dei soggetti con f.u. aggiornato al 2010).

- analisi dei dati con metodologia tradizionale (SMR)
- analisi dei dati con metodi multivariati
- stesura rapporto finale.

Linea di Ricerca 3:

- estensione della rilevazione dei casi e dei controlli, con obiettivo complessivo di 200 casi e 200 controlli con intervista e campione di sangue /saliva;
- analisi dei geni candidati per i 10 geni maggiormente associati al rischio di mesotelioma, per i casi e controlli del secondo anno di attività.
- analisi dei dati con metodi multivariati
- stesura rapporto finale.

U.O. 3 Università di Torino

Analisi di nuovi bio-marcatori predittivi di risposta alla chemioterapia con tecniche di espressione genica e proteica ad alta risoluzione per una migliore definizione della strategia terapeutica in pazienti affetti da mesotelioma pleurico

Responsabile Scientifico U.O. 3 Università di Torino: Prof. Giorgio Scagliotti
Università di Torino – Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche
Responsabile della Struttura Semplice Dipartimentale a Direzione Universitaria di
Oncologia Polmonare - Azienda Sanitaria Ospedaliera S. Luigi di Orbassano (Torino)

Scopo dello studio - Il mesotelioma maligno della pleura (MMP) è una neoplasia relativamente rara, asbesto- correlata (~ 1.200 - 1.500 casi/anno in Italia) con notevole rilevanza socio-sanitaria, soprattutto in certe regioni del nord Italia, compreso il Piemonte. Giunge alla diagnosi talora dopo decenni di latenza (fino a 40 anni) e la neoplasia è frequentemente diagnosticata in stadio avanzato ed è moderatamente sensibile ai farmaci citotossici. Una esigua frazione di casi (circa 15%) presenta sopravvivenze prolungate oltre 24 mesi, raramente fino 60 o 70 mesi, soprattutto in anni recenti a seguito di nuovi protocolli chemioterapici e/o interventi radicali.

L'approccio terapeutico del MMP è alquanto eterogeneo in rapporto allo stadio iniziale di malattia ed associato con evoluzioni cliniche di notevole variabilità nella risposta terapeutica e qualità di vita dei pazienti colpiti. Allo stesso tempo, a fronte di estesi dati epidemiologici sulla distribuzione della malattia in Italia e all'estero, sono invece scarsi i dati sulla patogenesi e biologia del MMP ed in particolare sui meccanismi precoci di trasformazione neoplastica. Dalla ricerca preclinica sono stati nel passato identificati marcatori con significato diagnostico (ad es. calretinina) e prognostico (ad es. mesotelina ed osteopontina), mentre sono molto esigui i risultati di studi su biomarcatori predittivi di risposta terapeutica. In questo ambito, la ricerca dovrebbe trovare nuovi dimensioni di sviluppo, per meglio definire i profili di attivazione genica e proteica nei singoli casi di MMP, con speciale riferimento alle molecole bersaglio di agenti terapeutici noti e ancora in fase di sviluppo. A tale riguardo, i dati di letteratura di su biomarcatori predittivi di risposta chemioterapica in altre neoplasie umane sono notevolmente più avanzati e consolidati. Pertanto è auspicabile una verifica di tali bersagli anche nel MMP. Dati preliminari generati nei laboratori dei proponenti e in altre sedi indicano come alti livelli di espressione di molecole bersaglio di farmaci antifolati, quali la timidilato sintasi (TS) sono correlati con scarsa risposta a terapie con tali agenti (ad es. pemetrexed) (Righi e coll. *J Clin Oncol* 2010;28:1534-9). Altri bersagli di agenti chemioterapici includono i geni del riparo di DNA (ERCC1, RRM1, NER, etc) per i derivati del platino, altro farmaco utilizzato per la terapia sistemica del MMP. Tali molecole potrebbero essere espresse in associazione con i danni al DNA indotti dall'asbesto ed i loro livelli di espressione potrebbero interferire con la risposta a specifici protocolli chemioterapici. Inoltre moderni approcci terapeutici mirano a colpire molecole di trasmissione del segnale intracellulare, per interrompere in modo mirato l'attivazione di specifiche vie ("pathways") molecolari che controllano la

crescita e differenziazione neoplastica nonché la capacità invasiva e metastatizzante del MMP stesso.

L'attivazione differenziale di vie intracellulari è mediata da geni che controllano la crescita cellulare ed altre funzioni e mutazioni di alcuni di tali geni sono stati identificati ad elevata frequenza nel MMP, suggerendo possibili legami con specifiche alterazioni molecolari e di trasmissione del segnale. Sono ad esempio stati identificati geni frequentemente sovra-espressi nel MMP, fra i quali la survivina (BIRC5) e la ciclo-ossigenasi 2 (PTGS2) (Melaiu et al. *Mutat. Res.* 2011).

In relazione alla bassa incidenza la comprensione degli eventi molecolari associati e il sequenziale accumulo di alterazioni geniche ed epigenetiche che sottendono allo sviluppo e alla progressione clinica del MMP è ampiamente sconosciuta. Secondo il database COSMID i geni più frequentemente mutati comprendono il CDKN2A, NF2 and BAP1 mentre altri meno frequentemente riportati comprendono , c-MET, VHL, WT1, p16Ink4a/p14Arf. Il gene onco-soppressore NF2 codifica per l'espressione della merlina, proteina che regola svariate vie molecolari fra le quali l'Hyppo la quale svolge un ruolo importante nella sviluppo delle neoplasia. Alterata espressione di molecole effettrici correlate alla via Hyppo sono state identificate in cellule di MMP tra le quali l'aumentata espressione di YAP e l'inattivazione di LATS2, il che fa supporre un ruolo rilevante di questa via molecolare nella genesi e progressione del MMP. Inoltre in linee cellulari di MMP l'inattivazione della merlina comporta un aumento dell'attività di tirosin chinasi associate a recettori di membrana, fra i quali EGFR e c-MET. La correlazione fra alterazioni geniche e l'andamento clinico del MMP sottoposto a terapia con farmaci citotossici non è stato ancora oggetto di studio.

Scopo della ricerca

Indagine prospettiva - L'obiettivo di questa parte dello studio è valutare prospettivamente l'impatto prognostico e/o predittivo della presenza/assenza di mutazioni mediante l'impiego di un pannello di geni precedentemente testato retrospettivamente (oggetto di altre e precedenti richieste di finanziamento presso altri istituzioni) a partire da un iniziale pannello di 44 geni, correlare questo pannello genico con l'espressione di alcuni geni coinvolti nella risposta al terapia con cisplatino/antifolati, fra i quali, ma non esclusivamente, l'Excision Repair Cross-Complementating 1 (ERCC1), coinvolto nella rimozione degli addotti DNA-cisplatino, e la timidilato sintetasi (TS), correlata agli antifolati. Inoltre si ritiene rilevante confrontare questi parametri molecolari nei sopravvissuti a lungo termine (> 24 mesi) rispetto a quanti, a parità di stadio, hanno avuto una sopravvivenza inferiore < 12 mesi.

In breve si intende :

Linea di Ricerca 1 Esplorare i livelli di espressione di bersagli molecolari (noti o di recente osservazione) di agenti chemioterapici.

Linea di Ricerca 2 Indagare la presenza di nuove mutazioni e/o l'espressione anomala di proteine che potrebbero rappresentare bersagli terapeutici, per implementare la strategia di trattamento con interventi combinati su multipli bersagli.

Linea di Ricerca 3. Verificare la modulazione di espressione di molecole bersaglio sopra identificate in rapporto a specifici trattamenti su modelli in vitro.

Disegno dello studio prospettico - Sulla base di quanto identificato mediante l'indagine retrospettiva verrà limitato il numero dei geni/bersagli da valutare ulteriormente nella fase prospettica. Si intende costruire un protocollo di indagine genica trasversale agli stadi della malattia indipendentemente dalla inclusione o meno dei pazienti in uno specifico studio clinico.

Pazienti e metodi - In una serie consecutiva di 100- 150 pazienti ai quali è stata posta diagnosi di MMP in stadio avanzato e sottoposti a uniforme trattamento chemioterapico e con disponibilità di adeguate quantità di tessuto tumorale dal materiale paraffinato verrà estratto il DNA tumorale ed analizzato per la presenza delle mutazioni tra i geni precedentemente prescelti (studio retrospettivo) usando la tecnologia Ion Torrent. Successivamente l'RNA totale sarà estratto, retrotrascritto in cDNA ed sottoposto all'analisi in Real-Time PCR con l'ausilio di primers specifici appositamente disegnati per valutare i trascritti geni di ERCC1 e TS. I valori di espressione saranno calcolati normalizzandoli con l'espressione di un gene-controllo di riferimento. Con metodica immunisto chimica tradizionale verrà studiata l'espressione della merlina con ausilio di anticorpi specifici.

Risultati attesi *Linea di Ricerca 1* correlazione fra la presenza di specifiche mutazioni geniche e prognosi del MMP o risposta alla terapia; *Linea di Ricerca 2* correlazione fra presenza di mutazioni ed espressione di geni correlati con la sensibilità ai farmaci citotossici impiegati; *Linea di Ricerca 3* Espressione di merlina e correlazione con variabili clinico-patologiche, risposta alla terapia ed espressione di geni correlati con la risposta ai farmaci citotossici.

Sviluppi prevedibili - Individuazione di profili predittivi/prognostici al fine di perseguire l'ottimizzazione della terapia farmacologica del MMP sulla base del profilo genetico di ciascun paziente.

La flessibilità della proposta consente di adattare tale studio di genomica del mesotelioma a qualsiasi studio clinico ed in qualsiasi stadio della malattia consentendo in tal modo una vera mappatura genomica "ad impronta epidemiologica" del mesotelioma della pleura.

U.O. 4 Istituto Tumori "Regina Elena"

Caratterizzazione funzionale delle cellule staminali tumorali derivanti da mesoteliomi pleurici per l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici

Responsabile Scientifico U.O. 4 Istituto Tumori "Regina Elena: Prof. Ruggero de Maria, Direttore Scientifico dell'Istituto Tumori "Regina Elena"

1.0 Introduzione

La terapia personalizzata, intesa come la somministrazione di farmaci esclusivamente in una sottopopolazione selezionata di pazienti con atteso beneficio, rappresenta la principale sfida dell'oncologia moderna. Sebbene in casi selezionati, la somministrazione di farmaci a bersaglio molecolare in tumori con definiti background molecolari abbia portato a un sensibile miglioramento degli outcome clinici. Tali evidenze sottolineano la necessità di sviluppare strategie farmacologiche unitamente a biomarcatori predittivi e test sensibili e riproducibili per la valutazione ed il monitoraggio nel tempo del target molecolare.

Un numero sempre maggiore di evidenze sperimentali rilevano l'importanza di una sottopopolazione di cellule tumorali con caratteristiche di staminalità, indicate come cellule staminali tumorali (CST), le cui proprietà funzionali le rendono in grado di dare origine all'intera popolazione tumorale e di spiegare l'eterogeneità esistente all'interno delle neoplasie (1). L'aspetto più sorprendente è la capacità delle CST di sopravvivere a condizioni stressanti quali l'esposizione ad agenti antineoplastici convenzionali (2). Ciò avviene attraverso molteplici meccanismi difensivi quali l'attivazione di pompe transmembranarie in grado di estrarre attivamente una vasta gamma di chemioterapici di derivazione naturale e una rapida attivazione dei network molecolari coinvolti nel riparo del DNA in seguito ad esposizione ad agenti genotossici. Le CST sono state isolate nella maggior parte delle neoplasie solide, sia quelle più frequenti come il tumore del colon, del polmone e della mammella, che decisamente più rare come i tumori primitivi del sistema nervoso centrale, i tumori della tiroide e il mesotelioma pleurico (3-8). Le cellule staminali ottenute da questi tumori sono in grado di generare nell'animale da esperimento tumori che morfologicamente riproducono la neoplasia del paziente.

Accanto alla possibilità di isolare, mantenere in coltura e propagare le CST nell'animale da esperimento (9), una profonda caratterizzazione di tale sottopopolazione cellulare è resa possibile dalle tecnologie high-throughput. Tali strumenti sono in grado di fornire l'intera gamma di anomalie genetiche, epigenetiche e proteiche caratterizzanti i tumori, rappresentando dunque una strategia preferenziale per l'identificazione di parametri molecolari predittivi di attività dei nuovi farmaci oncologici.

La definizione del background genetico di ogni singolo tumore consente di catturare un'istantanea di tutte le anomalie che caratterizzano un dato tumore. Le sempre più performanti piattaforme per il sequenziamento consentono di definirne in grande dettaglio gli assetti mutazionali. Inoltre l'esperienza clinica sottolinea come l'attività

dei farmaci a bersaglio molecolari sia spesso ristretta a definiti backgrounds genetici. Pertanto la definizione di biomarcatori genetici potrà aiutare sia la scelta di nuove terapie efficaci, sia l'identificazione dei pazienti che potranno beneficiare dalla terapia.

2.0 Background e razionale

I mesoteliomi sono neoplasie primitive delle *sierose* che derivano dalle cellule mesoteliali di rivestimento. Sono dei tumori rari, dal momento che negli Stati Uniti si stimano circa 2.500 nuovi casi/anno, e nella maggioranza dei casi si sviluppano dai foglietti pleurici (10). La patogenesi è prevalentemente correlata con l'esposizione cronica all'asbesto, sebbene anche altri agenti eziologici sembrano essere coinvolti quali la radioterapia o l'esposizione ad alcuni minerali. Esistono differenti sottotipi istologici: epitelioide (il più comune), bifasico o misto e sarcomatoide. Tale eterogeneità istologica unitamente all'evidenze che i sottotipi epitelioidei si associano ad una prognosi lievemente migliore suggerisce che un differente background biologico sottende lo sviluppo delle varie forme. La prognosi per questi pazienti è infausta, con una sopravvivenza globale di circa 1 anno nonostante un approccio aggressivo multimodale rappresenti la terapia standard negli stadi iniziali. Per gli stadi più avanzati o non operabile la chemioterapia, prevalentemente composta da derivati del platino con pemetrexed, rappresenta l'unico approccio terapeutico. Tali regimi producono però solo un limitato beneficio clinico e sono spesso gravati da tossicità non trascurabile.

Nonostante l'armamentario terapeutico sia alquanto limitato, la possibilità di isolare, caratterizzare, manipolare e studiare le CST del mesotelioma pleurico rappresenta un approccio rivoluzionario nella ricerca oncologica e una fonte virtualmente illimitata di materiale biologico sul quale eseguire test di farmacosenibilità sia in vitro sia in vivo. Tale approccio potenzialmente permette anche di stabilire eventuali correlazioni esistenti tra l'attività di un dato farmaco/combinazione e un definito parametro molecolare. I proponenti hanno una consolidata esperienza nello studio delle CST. Ciò è dimostrato da studi pionieristici di caratterizzazione delle CST da tumori del colon, del polmone e della tiroide, nonché dall'identificazione della capacità delle CST isolate da glioblastomi multiformi di partecipare attivamente alla creazione della rete vascolare intratumorale (11), della caratterizzazione dei meccanismi di chemioresistenza di tali cellule ed, infine, della possibilità di ucciderle selettivamente con farmaci a bersaglio molecolare. A tal proposito risultati promettenti sono stati ottenuti con inibitori in grado di prevenire i meccanismi del danno al DNA indotto dalla chemioterapia quali gli agenti bloccanti chk1 (12), nonché inibitori recettoriali o anticorpi neutralizzanti dell'interleuchina 4 (13). Inoltre, è stato dimostrato come le CST ricapitolano il tumore di origine nell'animale da esperimento non solo a livello istologico, ma anche molecolare. In particolare, i tumori generati da cellule staminali tumorali in topi immunocompromessi (xenografts) replicano molto più fedelmente il tumore umano di origine in termini di attivazione/disattivazione di pathways coinvolti in importanti processi pro-tumorigenici, rispetto alle linee cellulari disponibili commercialmente. Infine è stato recentemente dimostrato come la popolazione staminale isolata da linee cellulari di mesotelioma e trattata con pemetrexed acquisisce caratteri più aggressivi ed un fenotipo stem-like, e che tale sottopopolazione

resistente al pemetrexed è rappresentata in campioni biologici provenienti da essudati pleurici o campioni chirurgici (8).

Inoltre, ci siamo recentemente equipaggiati di nuove tecnologie di sequenziamento in grado di fornire l'intera gamma di eventi genetici presenti nel tumore, in modo di essere in grado di avere una fotografia dell'intera gamma di anomalie genetiche caratterizzanti ogni singolo tumore.

3.0 Approccio metodologico

Lo studio prevederà l'isolamento e la caratterizzazione delle CST isolate da campioni biologici di mesotelioma pleurico, previo consenso informato scritto, consistenti sia in essudati pleurici che campioni chirurgici. Un database condiviso nel quale saranno inclusi tutti i parametri clinici, istologici e molecolari verrà appositamente generato e potrà essere consultato ed aggiornato dai singoli investigatori. Ogni campione verrà codificato in modo da favorire un facile matching con i dati clinico-istologici. Le CST verranno ottenute previa dissociazione meccanica ed enzimatica dei campioni tissutali e quindi coltivate in un apposito medium supplementato di EGF e FGF-2 che consente la sopravvivenza selettiva delle cellule più immature, portando a morte le cellule più mature e le cellule contaminanti non neoplastiche. Tale protocollo porta a selezionare un limitato numero di cellule immature che danno origine ad aggregati (tumorspheres) entro 1-2 mesi dalla messa in coltura. Le cellule formanti le sfere verranno ulteriormente espanse e caratterizzate per l'immunofenotipo caratteristico delle CST. La controparte differenziata per ogni campione verrà ottenuta attraverso coltura in apposito mezzo differenziativo. Una volta realizzata l'effettiva caratterizzazione attraverso la valutazione dei criteri operativi per definire le CST, si procederà alla loro caratterizzazione a livello genomico. Le medesime analisi saranno eseguite sui campioni tissutali. L'assetto mutazionale verrà esplorato mediante next generation sequencing. La caratterizzazione delle CST del mesotelioma pleurico verrà completata attraverso l'inoculo delle cellule formanti le sfere nel cavo pleurico di topi immunocompromessi al fine di saggiarne l'effettiva tumorigenicità. Le prove farmacologiche in vitro prevederanno il monitoraggio della vitalità a differenti time-point sino a 96 ore. In considerazione dell'elevato numero di composti che verranno testati (paragrafo 4.0), solo i composti che in monoterapia produrranno il più alto tasso di morte cellulare verranno successivamente testati nell'animale da esperimento, ad eccezione di composti che presenteranno spiccate capacità chemiosensibilizzante. Al fine di incrementare le probabilità di isolare composti particolarmente attivi e potenziali biomarcatori predittivi, parte dei tessuti derivanti da procedure chirurgiche verranno impiantate ortotopicamente nell'animale da esperimento.

4.0 Obiettivi dello studio

Lo studio si articolerà in due diverse fasi sequenziali aventi come obiettivo, rispettivamente, la caratterizzazione a livello genomico delle CST del mesotelioma pleurico e l'identificazione di composti in grado di ucciderle selettivamente.

La prima fase del progetto, che si estenderà per l'intera durata dello studio, consisterà nell'isolamento e caratterizzazione delle CST del mesotelioma pleurico, cui si

assoceranno saggi di chemiosensibilità che prevedranno l'impiego delle combinazioni utilizzate nella pratica clinica (derivati del platino con pemetrexed o gemcitabina, taxani, alcaloidi della vinca). La controparte differenziata ottenuta come descritto sopra e linee commerciali di mesotelioma pleurico verranno impiegate come controllo durante lo svolgimento dell'intero algoritmo sperimentale. Un volta completato l'aspetto di caratterizzazione genetica, funzionale e farmacologica si procederà con lo screening di inibitori chinasi condotto mediante l'utilizzo di una libreria commerciale (BIOMOL Kinase), con la vitalità cellulare che verrà rilevata attraverso un saggio di bioluminescenza basato sull'ATP. Ulteriori farmaci a bersaglio molecolare non rappresentati nella libreria potranno essere considerati a discrezione dello sperimentatore laddove sussistano validi presupposti clinici (profilo di tollerabilità noto, dose e schedula). Lo screening dei farmaci a bersaglio molecolare avrà due obiettivi principali: il primo sarà quello di identificare composti che in monoterapia determinano una mortalità cellulare rilevante, arbitrariamente definita in base alle nostre precedenti esperienze come almeno il 60% di letalità cellulare; il secondo sarà quello di testare gli inibitori chinasi unitamente ai comuni regimi chemioterapici al fine di identificare molecole che, sebbene non incontrino in monoterapia il cut-off del 60% di eventi letali, esercitano notevole azione di chemiopotenziamento. Dal momento che gli inibitori chinasi possono essere gravati, in misura variabile, da effetti off-target su altre chinasi, si esplorerà l'effettiva validità farmacologica del target in oggetto attraverso RNA interference. I dati di mortalità verranno quindi interrogati alla luce della precedente caratterizzazione genetica al fine di identificare assetti mutazionali suggestivi di farmacosenibilità (biomarcatori predittivi). Qualora un effetto di chemiopotenziamento non fosse rilevato per nessuno degli inibitori testati, verrà considerato l'impiego di librerie di short hairpin RNA (Collecta Pooled Bar-Coded library) al fine di definire gli hit più potenti nel determinare il fenotipo letale in associazione alla chemioterapia convenzionale. Ove possibile, tali dati verranno validati attraverso l'impiego di inibitori farmacologici. I composti o combinazioni inibitore/chemioterapia che supereranno con successo la fase di screening saranno quindi testati nell'animale da esperimento, i cui tumori verranno generati sia mediante inoculo ortotopico delle CST del mesotelioma pleurico, sia attraverso l'impianto ortotopico di frammenti di tessuto tumorale. Al fine di limitare al massimo la manipolazione di tali cellule e avere una più accurata definizione dell'attività antineoplastica l'evoluzione della malattia sarà monitorata in modo preferenziale attraverso imaging radiologico con micro-CT. I composti/combinazioni che completeranno con successo l'intero percorso di valutazione preclinica, e per i quali siano stati identificati putativi biomarcatori predittivi, saranno proposti per la successiva sperimentazione clinica laddove possibile.

In definitiva, il progetto sopra descritto si pone i seguenti obiettivi:

Generazione di una collezione di CST-mp con un completo quadro del background genetico

Identificazione in vitro e validazione in vivo di inibitori chinasi in grado di uccidere selettivamente le CST del mesotelioma pleurico

Identificazione in vitro e validazione in vivo di inibitori chinasi in grado di potenziare gli effetti citotossici della chemioterapia convenzionale sulle CST del mesotelioma pleurico

Identificazione di anomalie genetiche (mutazioni) in grado di predire l'efficacia di un dato composto

5.0 Bibliografia

- 1) Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001;414:105-11.
- 2) Maugeri-Saccà M, Vigneri P, De Maria R. Cancer stem cells and chemosensitivity. *Clin Cancer Res*. 2011;17:4942-7.
- 3) Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, et al. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007;445:111-5.
- 4) Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*. 2008;15:504-14.
- 5) Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:3983-8.
- 6) Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004;64:7011-21.
- 7) Todaro M, Iovino F, Eterno V, Cammareri P, Gambarà G, Espina V, et al. Tumorigenic and metastatic activity of human thyroid cancer stem cells. *Cancer Res*. 2010;70:8874-85.
- 8) Canino C, Mori F, Cambria A, Diamantini A, Germoni S, Alessandrini G, et al. SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells. *Oncogene*. 2012; 31:3148-63
- 9) Baiocchi M, Biffoni M, Ricci-Vitiani L, Pilozzi E, De Maria R. New models for cancer research: human cancer stem cell xenografts. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:380-4.
- 10) Favoni RE, Florio T. Combined chemotherapy with cytotoxic and targeted compounds for the management of human malignant pleural mesothelioma. *Trends Pharmacol Sci*. 2011;32(8):463-79.
- 11) Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*. 2010;468:824-8.
- 12) Bartucci M, Svensson S, Romania P, Dattilo R, Patrizii M, Signore M, et al. Therapeutic targeting of Chk1 in NSCLC stem cells during chemotherapy. *Cell Death Differ*. 2011.
- 13) Todaro M, Perez Alea M, Di Stefano AB, Cammareri P, Vermeulen L, Iovino F, et al. Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell* 2007;1:389-402.