



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**OSPEDALE REGIONALE DI TREVISO – U.L.S.S. 9**

**SERVIZIO IMMUNOTRASFUSIONALE – BANCA DEL SANGUE CORDONALE**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE FARMACEUTICHE**

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN**

**BIOLOGIA E MEDICINA DELLA RIGENERAZIONE**

**INDIRIZZO INGEGNERIA DEI TESSUTI E DEI TRAPIANTI**

**CICLO XXIII**

**TITOLO DELLA TESI**

**TARGETING DELLE VIE METABOLICHE DELL'EPIDERMAL**

**GROWTH FACTOR (EGF), ADRENOMEDULLINA (ADM) ED**

**ENDOTELINA-1 (ET-1) NELLE LINEE STABILIZZATE**

**DI LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA (LMA)**

**Direttore della scuola:** Prof. Pier Paolo Parnigotto

**Coordinatore:** Prof.ssa Maria Teresa Conconi

**Supervisore:** Dott. Sergio De Angeli

**Dottoranda:** Alessandra Marcuzzo

**DATA CONSEGNA TESI**

31 Gennaio 2011



*... a Simone & Gioia Luna,  
per un nuovo modo di vedere le cose.*

*... al mio Fiore,  
per sapere.*





# **INDICE**

<b>RIASSUNTO</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>7</b>
1. L'EMATOPOIESI	9
2. LA NICCHIA EMATOPOIETICA NORMALE	14
3. LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA	17
4. LA LEUKEMIC STEM CELL E LA NICCHIA NEOPLASTICA	25
5. ADRENOMEDULLINA	28
6. ENDOTELINA-1	34
7. EPIDERMAL GROWTH FACTOR	38
8. GEFITINIB	41
9. C/EBPA	45
<b>OBIETTIVI DELLA TESI</b>	<b>51</b>
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>53</b>
1. LINEE CELLULARI	53
2. ESPRESSIONE FENOTIPICA BASALE DI ADM, ET-1, EGF E DEI LORO RECETTORI	54
3. CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA	55
4. ESPRESSIONE DEI MARKER DI DIFFERENZIAZIONE GRANULOCITARIA	55
5. PREPARAZIONE DI GEFITINIB	56

6.	PREPARAZIONE DI ADRENOMEDULLINA	56
7.	PREPARAZIONE DI ENDOTELINA	56
8.	PREPARAZIONE DI ADM-FRAGMENT <sub>22-52</sub>	57
9.	PREPARAZIONE DI ET-1 INHIBITOR BQ123	57
10.	PREPARAZIONE DI ET-1 INHIBITOR BQ788	57
11.	PROPRIETA' INDUTTIVE DI ADM ED ET-1	57
11.1.	VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' INDUTTIVE DI ADM ED ET-1 MEDIANTE SAGGI CLONOGENICI IN TERRENO SEMISOLIDO	57
11.2.	VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' INDUTTIVE DI ADM ED ET-1 MEDIANTE TEST DI CRESCITA A BREVE TERMINE IN TERRENO LIQUIDO	58
11.3.	VERIFICA DELLE PROPRIETA' INDUTTIVE DI ADM ED ET-1 MEDIANTE INIBITOR	59
12.	PROPRIETA' INDUTTIVE DELL'EPIDERMAL GROWTH FACTOR	60
12.1.	VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' DI EGF MEDIANTE SAGGI CLONOGENICI IN TERRENO SEMISOLIDO	60
12.2.	VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' INDUTTIVE DI EGF MEDIANTE TEST DI CRESCITA A BREVE TERMINE IN TERRENO LIQUIDO	60
12.3.	VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI GEFITINIB	61
13.	CARATTERIZZAZIONE PROTEOMICA BASALE DI EGF-R MEDIANTE WESTERN BLOTTING	62
14.	ESPRESSIONE BASALE DI RNA MESSAGGERI DI ADM ED EGF-R	63
15.	VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI C/EBP	64
15.1.	ESTRAZIONE DELL'RNA E RETROTRASCRIZIONE	64
15.2.	REAL TIME PCR PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI C/EBP	64

16.	ANALISI DEI DATI ED ELABORAZIONE STATISTICA	65
	<b>RISULTATI</b>	<b>67</b>
1.	CARATTERIZZAZIONE BASALE DELLE LINEE CELLULARI	67
1.1.	ESPRESSIONE FENOTIPICA BASALE DI ADM, ET-1, EGF E DEI LORO RECETTORI	67
1.2.	GROWTH RATE BASALI DELLE LINEE CELLULARI	69
1.3.	ESPRESSIONE BASALE DEI MARKER DI DIFFERENZIAZIONE GRANULOCITARIA	69
1.4.	CARATTERIZZAZIONE PROTEOMICA BASALE DI EGF-R	73
1.5.	ESPRESSIONE BASALE DI mRNA DI ADM ED EGF-R	73
2.	PROPRIETA' INDUTTIVE DI ADM ED ET-1	75
2.1.	VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' INDUTTIVE DI ADM ED ET-1 MEDIANTE TEST DI CRESCITA A BREVE TERMINE IN TERRENO LIQUIDO	75
2.2.	ESPRESSIONE DEI MARKER DI DIFFERENZIAZIONE GRANULOCITARIA POST-ESPOSIZIONE AD ADM ED ET-1	87
2.3.	CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA POST-ESPOSIZIONE AD ADM ED ET-1	93
2.4.	VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' INDUTTIVE DI ADM ED ET-1 MEDIANTE SAGGI CLONOGENICI IN TERRENO SEMISOLIDO	99
2.5.	VERIFICA DELLE PROPRIETA' INDUTTIVE DI ADM ED ET-1 MEDIANTE INIBITORI	105
3.	PROPRIETA' INDUTTIVE DI EGF	113
3.1.	VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' INDUTTIVE DI EGF MEDIANTE TEST DI CRESCITA A BREVE TERMINE IN TERRENO LIQUIDO	113
3.2.	ESPRESSIONE DEI MARKER DI DIFFERENZIAZIONE GRANULOCITARIA POST-ESPOSIZIONE AD EGF	119

3.3. CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA POST-ESPOSIZIONE AD EGF	122
3.4. VALUTAZIONE DELLE PROPRIETA' INDUTTIVE DI EGF MEDIANTE SAGGI CLONOGENICI IN TERRENO SEMISOLIDO	125
3.5. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI GEFITINIB	131
3.5.1. EFFETTI CITOTOSSICI A BREVE TERMINE	131
3.5.2. TEST DI RECUPERO	132
3.5.3. CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA POST-ESPOSIZIONE A GEFITINIB	151
3.5.4. ESPRESSIONE DEI MARKER DI DIFFERENZIAZIONE GRANULOCITARIA POST-ESPOSIZIONE A GEFITINIB	163
3.5.5. AMPLIFICAZIONE DEL GENE C/BPA	167
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>169</b>
<b>CONCLUSIONI</b>	<b>175</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>177</b>

## ABBREVIAZIONI PIU' FREQUENTEMENTE UTILIZZATE

<b>ABMT</b>	Autologous Bone Marrow Transplantation, trapianto di midollo osseo autologo
<b>ADM</b>	Adrenomedullina
<b>Ang-1</b>	Angiopietina-1
<b>LMA</b>	Leucemia Mieloide Acuta
<b>AlloBMT</b>	Allogenic Bone Marrow Transplantation, trapianto di midollo osseo allogenico
<b>AUC</b>	Area Under the Curve, area sotto la curva
<b>BFU-E</b>	Blast Forming Units-Erythroid, unità di formazione esplosiva degli eritrociti
<b>BM</b>	Bone Marrow, midollo osseo
<b>BMSC</b>	Bone Marrow Stem Cells, cellule staminali del midollo osseo
<b>Bzip</b>	Basic Leucine Zipper Protein
<b>CGRP</b>	Calcitonin gene-related peptides
<b>CFU</b>	Colony Forming Unit, unità formante colonie
<b>CAFC-A</b>	Cobbleston area-forming cells assay
<b>CFU-BL</b>	Colony Forming Unit- Blast cell, unità formante colonie di cellule blastiche
<b>CFU-G</b>	Colony Forming Unit-Granulocyte, unità formante colonie granulocitiche
<b>CFU-GEMM</b>	Colony Forming Unit-Granulocyte/Erythrocyte/Macrophage/Megakaryocyte, unità formante colonie granulocitiche/eritrocitiche/macrofagiche/megacariocitiche
<b>CFU-GM</b>	Colony Forming Unit-Granulocyte-Macrophage, unità formante colonie granulocitico-macrofagiche
<b>CFU-L</b>	Colony Forming Unit-Leukemia, unità formante colonie leucemiche
<b>CFU-M</b>	Colony Forming Unit-Macrophage, unità formante colonie macrofagiche
<b>CFU-Meg</b>	Colony Forming Unit-Megakaryocyte, unità formante colonie megacariocitiche
<b>CFU-Mix</b>	Colony Forming Unit-Mix, unità formante colonie miste
<b>CFU-S</b>	Colony Forming Unit-Spleen, unità formante colonie spleniche
<b>CLP</b>	Common lymphoid progenitor
<b>CMP</b>	Common myeloid progenitor
<b>Committed</b>	Commissionato

<b>DFS</b>	Disease Free Survival, sopravvivenza libera da malattia
<b>DMH</b>	Dimetil Hydrazide, dimetilidrazide
<b>EP</b>	Efficienza di piastramento
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor, fattore di crescita epidermica
<b>EGFR</b>	Epidermal Growth Factor Receptor, recettore del fattore di crescita epidermico
<b>ET-1</b>	Endotelina-1
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FLAT3</b>	FMS-like Tyrosin kinase 3
<b>FGF4</b>	Fibroblastic Growth Factor 4
<b>G-CSF</b>	Granulocyte- Colony Stimulating Factor, fattore stimolatore delle colonie granulocitiche
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Macrophage-Colony Stimulating Factor, fattore stimolatore delle colonie granulocitico-macrofagiche
<b>GVHD</b>	Graft-Versus-Host Disease, malattia del trapianto contro l'ospite
<b>GVL effect</b>	Graft-Versus-Leukemia effect, effetto del trapianto contro la leucemia
<b>HiDAC</b>	High Dose Cytarabine, citarabina ad alte dosi
<b>HLA</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>HPP-CFU</b>	High Proliferative Potential-Colony Forming Unit, unità formante colonia ad alto potenziale proliferativo
<b>HSC</b>	Hematopoietic Stem Cell, cellula staminale emopoietica
<b>LSC</b>	Leukemic Stem Cell, cellula staminale leucemica
<b>LTC</b>	Long Term Culture, coltura a lungo termine
<b>LTC-IC</b>	Long Term Culture-Initiating Cell, cellula iniziante le colture a lungo termine
<b>E-LTC-IC</b>	Extend LTC-IC
<b>NC<sub>totali</sub></b>	Numero di Cellule totali
<b>NOD-SCID</b>	Non obese diabetic SCID
<b>NSCLC</b>	Non Small Cell Lung Cancer, carcinoma polmonare non a piccole cellule
<b>PB</b>	Peripheral Blood, sangue periferico
<b>PBSC</b>	Peripheral Blood Stem Cell, cellula staminale ematopoietica del sangue periferico
<b>SCF</b>	Stem Cell Factor, c-kit ligand
<b>SCID</b>	Severe Combined Immunodeficiency, immunodeficienza severa combinata
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Transforming Growth Factor- $\alpha$ , fattore di crescita trasformante- $\alpha$
<b>VCAM</b>	Vascular Cell Adhesion Molecole-1
<b>VLA-4</b>	Very Late Antigen-4

## RIASSUNTO

L'*outcome* della leucemia mieloide acuta (LMA) non ha subito significativi miglioramenti nonostante la sempre più accurata descrizione dei meccanismi patogenetici che sottendono la trasformazione neoplastica della cellula staminale ematopoietica. Il blocco maturativo è caratteristica distintiva di tutte le leucemie acute e verosimilmente la presenza di una quota minoritaria di cellule a fenotipo più immaturo è responsabile di chemioresistenza e *relapse*.

La prospettiva di poter utilizzare strategie farmacologiche volte a superare il blocco differenziativo, incoraggiata dal successo ottenuto nella leucemia acuta promielocitica con l'introduzione nei protocolli di terapia dell'acido all-trans retinoico, diventa alquanto attraente.

Con questo obiettivo è stato proposto un modello sperimentale *in vitro* che vede l'utilizzo di linee cellulari stabilizzate di LMA, in particolare KASUMI-1 provenienti dalla banca tedesca DSMZ, tre ceppi HL-60 (HL-60 TV dall'università di Padova, HL-60 CRO dall'ospedale CRO di Aviano e HL-60 BANCA dalla banca tedesca DSMZ), dei peptidi Adrenomedullina (ADM), Endotelina-1 (ET-1) e dei loro rispettivi inibitori (ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor, BQ123 e BQ788), del fattore di crescita dell'epidermide (EGF - *Epidermal Growth Factor*) e del suo inibitore indiretto (Gefitinib) a diverse concentrazioni. Tutti i ceppi HL-60 e la linea KASUMI-1 sono stati caratterizzati da un punto di vista immucitochimico e immunofenotipico. Queste analisi hanno evidenziato una diversità tra i ceppi sotto tutti i profili, anche nel tempo di duplicazione durante la crescita.

Questo spiegherebbe il fatto che risultati discordanti in letteratura potrebbero essere originati da ceppi cellulari utilizzati nei diversi laboratori che possono differire anche in maniera significativa nelle loro caratteristiche biologiche, con eventuali meccanismi di selezione clonale e possibili ripercussioni sulla risposta allo stimolo farmacologico.

Gli esperimenti sono stati condotti in parallelo su tutte le linee esponendole a concentrazioni decrescenti di ADM ( $5 \times 10^{-8}M$ ,  $2.5 \times 10^{-8}M$ ,  $1.25 \times 10^{-8}M$  e  $0.625 \times 10^{-8}M$ ; ET-1 ( $5 \times 10^{-8}M$ ,  $2.5 \times 10^{-8}M$ ,  $1.25 \times 10^{-8}M$  e  $0.625 \times 10^{-8}M$ ) ed EGF (10mg/ $\mu$ l, 5mg/ $\mu$ l, 2.5 $\mu$ g/ml e 1.25 $\mu$ g/ml). Il processo è stato valutato anche in relazione al tempo: 24h, 48h e 72h di esposizione.

I risultati mostrano un potere stimolante di tutti e tre i peptidi in relazione alla dose e al tempo di somministrazione, con minime differenze tra i ceppi utilizzati.

Gli effetti dei peptidi sono stati confermati dai risultati ottenuti utilizzando i loro rispettivi inibitori.

ADM-fragment<sub>22-52</sub> Inhibitor non esercita alcun effetto sui ceppi HL-60 e sulla linea KASUMI-1 singolarmente ma accoppiato ad ADM ne blocca la capacità proliferativa: gli effetti inducenti di ADM sono annullati dall'aggiunta ai terreni di coltura del corrispettivo inibitore.

Allo stesso modo gli inibitori BQ123 e BQ788 dell'Endotelina da soli non esercitano alcun effetto sulle cellule mentre annullano il potere inducente di ET-1 in tutte le linee stabilizzate di LMA.

Gefitinib esplica *in vitro* attività antiproliferativa con effetto citossico e citostatico a concentrazioni terapeuticamente raggiunte nell'attuale impiego clinico del farmaco, in particolare nel trattamento delle neoplasie di origine epiteliale.

Questa indagine è stata effettuata mediante una sperimentazione preliminare articolata su test citotossici a breve termine associati a test di recupero in terreno semisolido e su indagini morfologiche ed immunofenotipiche. Le osservazioni microscopiche confermano tali risultati, ma evidenziano che l'attività antiproliferativa di Gefitinib è dose dipendente e si realizza con modalità differenti nei diversi ceppi. Nei saggi colturali a breve termine, l'analisi statistica ha rivelato che anche il DMSO utilizzato come solvente del farmaco esercita una azione antiproliferativa.

Gli effetti a lungo termine del Gefitinib sono stati testati come numero medio di CFU sviluppatesi post esposizione al farmaco in un terreno semisolido uguale per tutti i dosaggi. Le osservazioni morfologiche condotte su preparati allestiti al termine dei saggi colturali a breve termine non evidenziano, ai dosaggi più bassi, alcun fenomeno di segmentazione e/o banded a carico dei nuclei, tipico della differenziazione del promielocita in mielocita, metamielocita e granulocita maturo che caratterizza il processo di maturazione di questa filiera ematopoietica. Anche le indagini citofluorimetriche non mostrano variazioni qualitative del fenotipo di tutti i ceppi, post esposizione al farmaco.

Essenziale per il *commitment* e lo sviluppo emopoietico in senso granulocitario è il ruolo esercitato da C/EBP $\alpha$ , proteina appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione bzip (basic leucine zipper protein), in grado di formare omodimeri o eterodimeri con altre proteine C/EBP e attivare così la trascrizione di geni *target* (G-CSF receptor). La principale funzione di questa proteina sembra essere quella di bilanciare la proliferazione e la differenziazione cellulare regolando il *self-renewal* del pool staminale ematopoietico.

E' chiaro che se C/EBP $\alpha$  rappresenta un comune denominatore in pazienti affetti da



leucemia acuta mieloide (con o senza alterazioni cromosomiche associate), strategie terapeutiche dirette alla correzione di questo *pathway* possono rappresentare una razionale prospettiva terapeutica. Per questo motivo sono stati iniziati degli studi sul ceppo HL-60 TV con metodica *Real Time* PCR sulle cellule in condizioni basali, dopo incubazione a breve termine con Gefitinib alla concentrazione di 2.5 $\mu$ M (la più alta in grado di dare effetto citostatico, ma non citotossicità) e nei controlli incubati con DMSO e in coltura di mantenimento. Consensualmente alle osservazioni morfologiche ed immunofenotipiche, Gefitinib non induce *up*-regolazione di C/EBP $\alpha$ .

Pertanto, questi dati, se considerati nel loro complesso, suggeriscono che ADM ed ET-1 contribuiscono alla proliferazione delle cellule di LMA, azione fortemente ridotta dai rispettivi inibitori, mentre EGF esercita minimi effetti induttivi sulle cellule. Alla luce di tali considerazioni è possibile ritenere che AM ed ET-1 siano due nuove promettenti molecole regolatorie dei processi ematopoietici.

**PAROLE CHIAVE:** Leucemia Mieloide Acuta, Adrenomedullina, Endotelina-1, ADM-fragment<sub>22-52</sub> Inhibitor, BQ123 Inhibitor, BQ788 Inhibitor, Epidermal Growth Factor, Gefitinib.

## ABSTRACT

Outcome among Acute Myeloid Leukaemia (AML) patients did not undergo a significant improvement despite the more and more careful overview of the pathogenetic mechanisms those are involved in neoplastic transformation of haematopoietic stem cell. Cell maturation arrest is the distinguishing feature of each acute leukaemia and probably the presence of a very low rate of immature cells is responsible for chemoresistance and relapse.

Perspective to utilize pharmacological approaches to overcome cell maturation arrest is rather attractive and it is encouraged by the success obtained in Acute Promyelocytic Leukaemia with the introduction of all-trans-retinoic acid in medical trials.

Concerning this aim, an *in vitro* experimental model was proposed. It utilizes LMA stabilized cell lines, especially KASUMI-1, from German cell bank DSMZ and three HL-60 cell lines (HL-60 TV from University of Padova, HL-60 CRO from the CRO Institute of Aviano-Italy and HL-60 BANCA from DSMZ German bank), peptides ADM and ET-1 and their own inhibitors (ADM-fragment<sub>22-52</sub>, BQ123 and BQ788) and Epidermal Growth Factor-EGF and its indirect inhibitor (Gefitinib) at different concentrations. Cell lines were immunophenotypic and immunocytochemistry characterized. These analysis suggested differences among cell lines under all points of view even in duplication time during growth cell.

This could explain that contrasting results you can find in Literature could arise from cell lines utilized in different laboratories. These cell lines could significantly differ in their biological characteristics presenting possible clonal selection mechanisms that could have possible effects on pharmacological stimulus responses.

Experiments were carried out in parallel on all cell lines exposing them to decreasing doses of ADM, ET-1 ( $5 \times 10^{-8}$  M,  $2.5 \times 10^{-8}$  M,  $1.25 \times 10^{-8}$  M,  $0.625 \times 10^{-8}$  M) and EGF (10 mg/ $\mu$ l, 5 mg/ $\mu$ l, 2.5 mg/ $\mu$ l, 1.25 mg/ $\mu$ l). The time of exposure (24h, 48h, 72h) was also considered.

Results show a stimulating power of all peptides with regards to doses and time of exposure. Minimal differences were observed among different cell lines.

The effects exerted by these peptides were confirmed with the results obtained utilizing their own inhibitors. ADM-fragment<sub>22-52</sub> does not exert any effect on cell lines by itself, but it blocks off ADM proliferation induction effects in association with this peptide.

At the same way, ET-1 inhibitors BQ123 and BQ788 do not exert any effect on cell lines and they reverse the inductive power of ET-1 on all stabilized AML cell lines.

Gefitinib has *in vitro* anti-proliferation activity with cytotoxic and cytostatic effects at therapeutic doses reached in its clinical use, especially in the treatment of epithelial origin neoplasia. And it also has a clinical significance on LAM treatment, even if it is not possible to observe and prove morphologically and immunophenotypically myeloid maturation.

This investigation was carried out by a preliminary investigation which was based on short-term cytotoxic tests connected with recovery test on semisolid medium, on morphologic and immunophenotype analysis. The microscopic observation confirm these results, but they underline that the anti-proliferation activity of Gefitinib is dose-dependent and it is show in different modalities among cell lines. Moreover, statistical analysis, elaborated for short-term cell culture assays, proved that DMSO, used as solvent for the drug, exerts an anti-proliferation activity on cell lines. Long-term effects exerted by Gefitinib were tested with a Colony Forming Unit (CFU) assay in a semisolid medium. The mean CFU number grown up post exposition to drug was considered. Morphological observations carried out on preparations set up at the end of the short-term cell culture assays exposed to low dose of the drug did not showed any segmentation or/and banded phenomenon on myeloid cells nuclei. As we know, these fragmentation phenomenons are typical of the myeloid differentiation pathway. Cytometric analysis, too, did not evidence phenotypically alterations of different cell lines after exposure to drug.

The role of C/EBA $\alpha$  on commitment and differentiation of haematopoietic stem cells through granulocyte cells is essential. C/EBA $\alpha$  is a protein of the bzip (basic leucine zipper protein) transcription factors family, that is able to form homodimers and heterodimers with other C/EBP protein family and to trans-activate target genes (G-CSF receptor) transcription. The main function of this protein is the balance between cell proliferation and differentiation controlling the haematopoietic stem cell pool self-renewal.

If C/EBA $\alpha$  is the common denominator in patients affected by Acute Myeloid Leukaemia (with or without associated chromosomal alterations), therapeutical strategies headed to correct this pathway could be very interesting. The C/EBA $\alpha$  gene expression was evaluated by Real Time PCR in HL-60 TV cell line at the basal time, after short-term incubation time with 2.5  $\mu$ M Gefitinib (the highest drug-dose able to give cytostatic but not cytotoxic effect). Relative controls, cell line incubated with DMSO and with culture medium alone, were also considered in these analysis. Similarly to morphological and immuno-phenotypically observations Gefitinib does not induce up-regulation of C/EBA $\alpha$  gene expression.

These data suggest that ADM and ET-1 concur to LMA cell lines proliferation. This effect was blocked by relative inhibitors. EGF does not exert any effect on cell lines. According to these findings it is possible to consider ADM and ET-1 as two new promising regulatory molecules involved in haematopoietic pathways.

**Key-words:** Acute Myeloid Leukaemia, Adrenomedullin, Endothelin-1, ADM-fragment<sub>22-52</sub> Inhibitor, BQ123 Inhibitor, BQ788 Inhibitor, Epidermal Growth Factor, Gefitinib.

## INTRODUZIONE

Le Leucemie Mieloidi Acute (LMA) sono un gruppo eterogeneo di patologie oncoematologiche che originano dalla trasformazione clonale di una cellula ematopoietica mediante acquisizione di riarrangiamenti cromosomici e mutazioni geniche multiple (Betz and Hess, 2010).

Il loro *outcome* non ha subito significativi miglioramenti nonostante la sempre più accurata descrizione dei meccanismi patogenetici che sottendono il processo di trasformazione neoplastica.

Il blocco maturativo, caratteristica distintiva di tutte le leucemie acute, si associa verosimilmente alla presenza di una quota minoritaria di cellule neoplastiche a fenotipo più immaturo (*Leukemic Stem Cells*) responsabili della ripresa della malattia e della chemioresistenza dopo induzione di remissione completa (Dick, 1996).

Le *Leukemic Stem Cells* (LSC) sono una piccola sottopopolazione presente nel *bulk* tumorale dotata di proprietà di autorinnovamento, capacità di organizzazione gerarchica e di asservimento della nicchia stromale a supporto del proprio metabolismo e della modulazione dei segnali che regolano al suo interno la divisione cellulare neoplastica.

Le interazioni tra microambiente e cellula staminale leucemica, mediate da citochine, recettori e molecole di adesione, regolano numerosi fenomeni biologici e di progressione neoplastica, quali l'homing, la sopravvivenza, la differenziazione, la proliferazione e la selezione clonale (Scadden, 2007).

Questa nuova concezione patogenetica delle leucemie, definita in Letteratura come il paradigma delle LSC, sta modificando profondamente le strategie terapeutiche antitumorali. La terapia citotossica convenzionale fino ad oggi utilizzata riduce la massa tumorale, ma non eradica le cellule staminali leucemiche, rendendo quindi possibile la ricrescita tumorale e determinando la ricaduta dei pazienti dopo un periodo più o meno lungo. Al contrario gli agenti che eliminano selettivamente le LSC, pur non inducendo una rapida riduzione della massa tumorale, esauriscono nel lungo termine la progressione neoplastica (Bernasconi, 2010).

L'acquisizione di nuove conoscenze sulle alterazioni metaboliche associate alla trasformazione tumorale, conseguenti alla perdita di recettori fenotipici e di segnali di trasduzione, sono condizione indispensabile per lo sviluppo di terapie innovative selettivamente dirette all'eliminazione delle LSC, il vero bersaglio per la cura delle leucemie mieloidi.

Le famiglie di peptidi regolatori quali le endoteline (ET) e i peptidi derivati dalla pro-adrenomedullina (ADM), potrebbero svolgere un ruolo chiave e fornire il *target* per nuove e più efficienti strategie terapeutiche.

Le Endoteline (ET) e i peptidi di pro-Adrenomedullinici (pro-ADM) sono due famiglie di vaso-modulatori, quasi ubiquitariamente espressi nei tessuti (Yanagisawa et al., 1988; Kitamura et al., 1993). Recenti ricerche hanno dimostrato che tali peptidi, accanto ai noti effetti emodinamici, esercitano attività pleiotropiche sulla proliferazione cellulare, differenziazione e apoptosi e sono coinvolti in numerosi fenomeni patogenetici tra cui la progressione e l'invasività nei tumori solidi (Hinson et al., 2000; Belloni et al., 2001; Fillipatos et al., 2001; Pirtskhalaishvili et al., 2001).

Nel midollo osseo normale, le ET sono secrete dalle cellule endoteliali, dagli osteoblasti e dagli osteoclasti (Sasaki et al., 1993). Inoltre, sono secrete con *loop* autocrini dalle cellule dendritiche (Guruli et al., 2004) e dai precursori piastrinici (Mathieu et al., 1998; Kabadere et al., 2001). Recentemente *loop* autocrini sono stati dimostrati nelle CFU anche per ADM (Del Pup et al., 2003). Inoltre, ADM ed ET-1 sinergizzano *in vitro* l'azione espansiva esercitata sui progenitori ematopoietici cordonali da *cocktail* citochinici (De Angeli et al., 2004).

Sebbene il ruolo svolto dalle Endoteline (ET) e da Adrenomedullina non sia stato ancora esplorato nella patogenesi della LAM, i dati sopra esposti consentono di ipotizzare un loro coinvolgimento nella malattia leucemica.

E' noto che ET-1 è responsabile anche della transattivazione di EGF-R con conseguente attivazione delle MAPK mediante c-Src (Bagnato et al., 2008) e ciò ha fornito, nel carcinoma dell'ovaio, il razionale per l'impiego combinato di inibitori specifici del recettore ET<sub>A</sub>R dell'endotelina e di EGF-R (Zibotentan e Gefitinib rispettivamente) per il blocco dei segnali di fosforilazione critici nel *triggering* della proliferazione cellulare (Rosanò et al., 2007).

Recentemente è stato pubblicato il *case report* di una paziente 83enne affetta da adenocarcinoma avanzato del polmone associato a LAM, in remissione completa, dopo trattamento con Gefitinib e basse dosi di citarabina e aclarubicina.

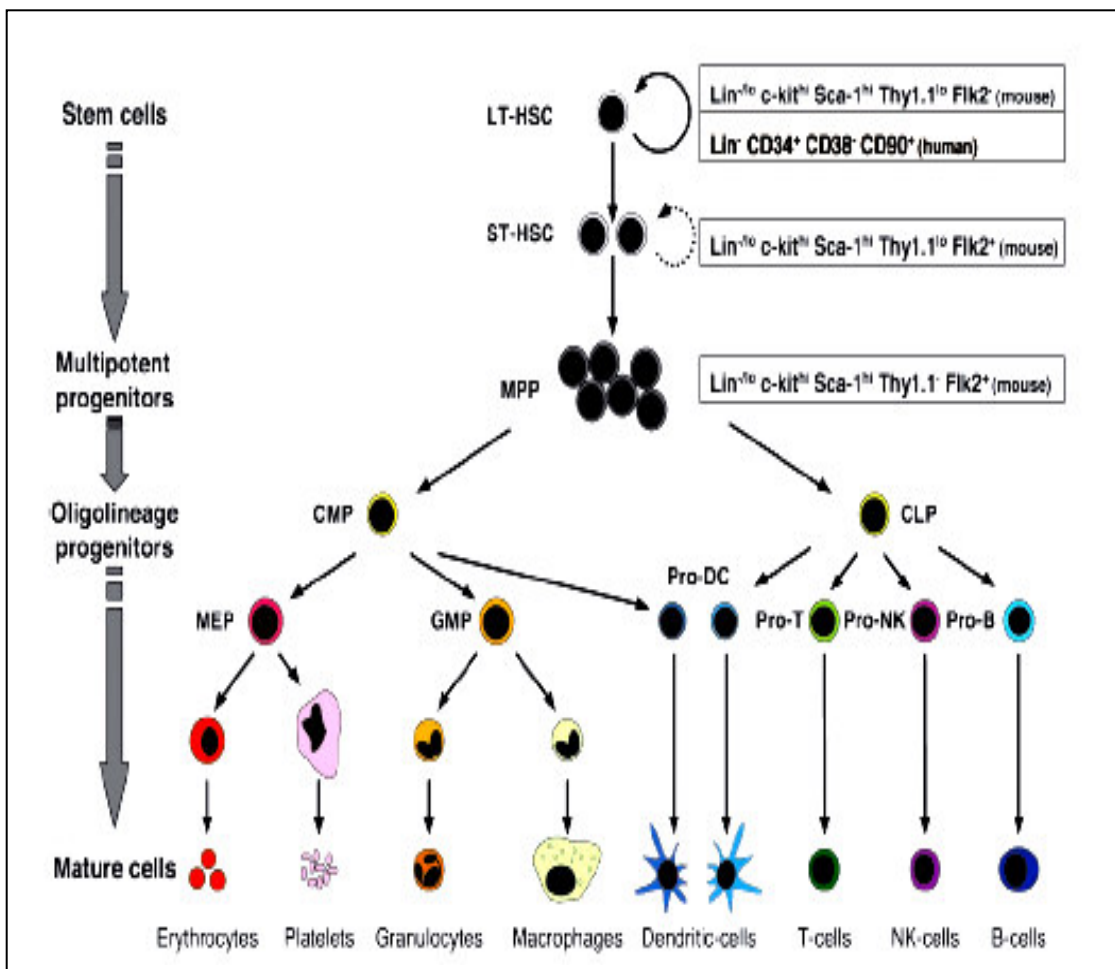
Questa prima segnalazione ha indotto il Gruppo di Stegmaier (2005) ad un'accurata valutazione degli effetti esercitati *in vitro* dal Gefitinib su blasti e su linee cellulari stabilizzate di leucemia mieloide acuta, evidenziando come gli effetti antiproliferativi del farmaco siano associati all'induzione di fenomeni differenziativi.

Questi dati se considerati globalmente, fanno ritenere che anche EGF e il suo recettore possano svolgere un ruolo importante nella proliferazione delle LCS e diventare un bersaglio per un terapia mirata.

Pertanto per una migliore comprensione degli obiettivi sperimentali di queste ricerche, nei paragrafi che seguiranno, attraverso brevi *review* saranno presentate alcune nozioni di base riguardanti l'ematopoiesi, l'eziopatogenesi della LAM, le funzioni di regolazione del microambiente e della nicchia neoplastica ed il ruolo svolto da EGF, ET-1 ed ADM nel promuovere la crescita delle cellule neoplastiche.

## §1. L'EMATOPOIESI

L'ematopoiesi è il processo attraverso il quale una ristretta popolazione di cellule capostipiti origina i precursori e le forme terminali delle filiere differenziative mieloidi, linfoidi, eritroidi e megacariocitiche, mediante un sistema intermedio, altamente gerarchizzato, di progenitori clonogenici *committed* con differenti capacità proliferative ed espansive (Figura 1).



**Fig. 1:** differenziazione e maturazione della cellula staminale ematopoietica

L'esistenza delle cellule ematopoietiche capostipiti (cellule staminali ematopoietiche o HSCs) è stata ipotizzata per la prima volta nel 1961 da Till e McCulloch a seguito dei loro pionieristici studi sulla rigenerazione del sistema ematopoietico *in vivo* su modelli murini. Tali studi hanno documentato come le HSCs siano caratterizzate funzionalmente dalla capacità di autorinnovamento, dalla multipotenza del proprio spettro differenziativo e dall'elevato potenziale proliferativo.

La successiva introduzione dei saggi di crescita delle LTC-IC (Long term Culture-Initiating Cell), delle CAFC-a (Cobbleston Area-Forming Cells assay) e delle CFU-BL (Colony Forming Unit-Blast), in grado di generare *in vitro* elementi morfologicamente indifferenziati capaci di automantenimento, di formare colonie secondarie e di differenziarsi nelle diverse filiere maturative ematopoietiche, hanno confermato l'esistenza e le proprietà funzionali delle HSCs (Sutherland et al., 1989; Sutherland et al., 1990; Ploemacher et al., 1989).

La citofluorimetria a flusso multiparametrica e le tecniche di isolamento immunomagnetico dei *subset* più primitivi hanno consentito di caratterizzare il fenotipo delle HSCs. Attualmente in Letteratura è comunemente accettato che la maggior parte di tali cellule esprimano l'antigene CD34, esibiscano elevati livelli di MDR, non esprimano markers di commissione (Lin<sup>-</sup>) e siano Thy-1<sup>low</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD45RA<sup>-</sup> e Rh-123<sup>+/-</sup> (Carlo-Stella, 1995).

Altri marcatori sono stati proposti per la definizione delle HSCs più primitive, quali il CD133 (Miraglia et al., 1998), che rappresenta l'omologo umano della glicoproteina transmembrana prominin 5, il c-kit (Bhatia, 2001) ed il Vascolar Growth Factor-R 2, conosciuto anche come KDR, identificato nel subset CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>CD90<sup>+</sup>CD117<sup>low</sup> (Ziegler et al., 1999) ad attività SRC (NOD/SCID mouse Repopulating Cell), CAFC e E-LTC-IC (Extend-LTC-IC).

Comunque, è stata documentata anche l'esistenza di *subset* CD34<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup> con capacità di popolamento a lungo termine (LTR) in xenotrapianti, capostipiti delle cellule CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup> (Zanjani et al., 1997).

I saggi di crescita clonogenica sviluppati da McNiece et al. (1989) e da Moore (1991) indicano la presenza, immediatamente a valle delle HSCs, di *subset* cellulari ad elevato potenziale proliferativo (HPP-CFU) con caratteristiche fenotipiche e funzionali intermedie tra la cellula staminale pluripotente ed i progenitori ematopoietici.

Come indicato dalla Figura 1, nel midollo osseo le HSCs e le HPP-CFU possono generare, attraverso il fenomeno del commissione, progenitori multipotenti simili ai CMPs (common myeloid progenitor) e ai CLPs (common lymphoid progenitor) documentati nel topo.



Secondo Ogawa (1993), la decisione di una cellula capostipite di autoreplicarsi o di commissionarsi selezionando uno di questi due specifici pathway, dipende da *input* stocastici di origine genetica. Altri *input* differenziativi, questa volta di origine ambientale, consentono ai progenitori multilinea di assumere potenzialità più ristrette ed orientate verso le singole filiere maturative (progenitori oligo, bi e monopotenti). Parallelamente al restringimento delle potenzialità differenziative, decrescono le capacità di autorinnovamento, mentre aumenta l'espansione clonale a seguito di divisioni cellulari maturative.

I progenitori *committed* sono cellule che crescono bene in mezzi semisolidi (agar/metilcellulosa) dove generano colonie con peculiari caratteristiche morfologiche che le rendono identificabili al microscopio. La colonia capostipite mieloide viene considerata la CFU-GEMM o CFU-Mix, essendo costituita da elementi cellulari con potenzialità maturative non ristrette, capaci di generare a loro volta colonie formate da cellule granulocitarie, eritroidie e megacariocitiche (Fauser et Messner, 1979; Ghio, 1989).

La cellula CFU-GM è il progenitore comune alle linee granulocitaria e monocitaria e, a seconda delle citochine presenti nel terreno di coltura, origina colonie costituite da piccole cellule di tipo granulocitario o colonie monocitarie formate da un minor numero di cellule, ma di grandi dimensioni.

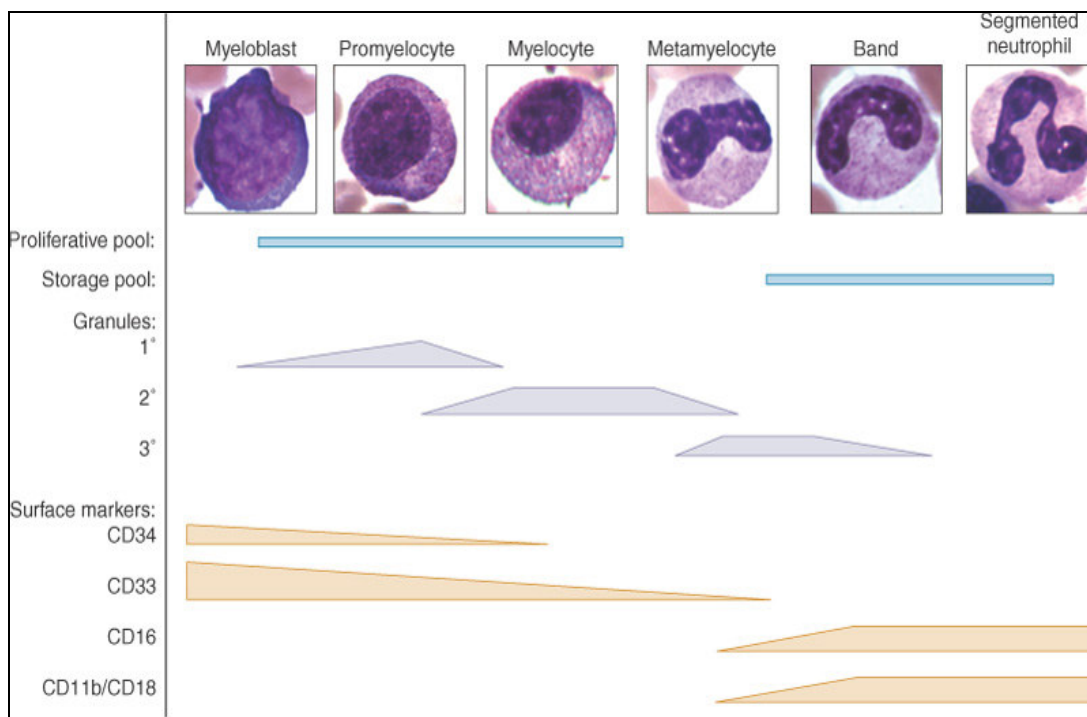
I progenitori commissionati in senso eritroide, in presenza di EPO (Eritropoietina), presentano *rate* di crescita clonogenica "esplosivi" e producono le colonie precoci BFU-E (Burst Forming Unit- Erythroid) costituite di cellule emoglobinizzate. In assenza di questo ormone, originano colonie più tardive CFU-E composte da ammassi di eritroblasti ben differenziati.

Le CFU-Meg sono progenitori megacariocitari coltivabili in metilcellulosa o su coagulo di plasma in colonie formate da poche e voluminose cellule.

Anche i progenitori *committed* sono stati ampiamente studiati mediante citofluorimetria. Allo stadio di CFU-Mix, fa la sua comparsa il marcatore mieloide-specifico CD33. Questo *marker* viene mantenuto sino alle fasi finali del differenziamento, ma si ritrova debolmente espresso anche a livello dei monociti maturi. In ultimo compaiono gli antigeni CD13 e CD15, acquisiti specificamente dalle cellule mieloidi allo stadio CFU-GM e mantenuti per il restante percorso maturativo. Complessivamente, gli studi fino ad oggi condotti hanno permesso di associare alla filiera differenziativa T-linfocitaria i marcatori TdT, CD10, CD7, CD5 e CD2, B-linfocitaria TdT, CD10, CD19, mieloide TdT, CD33, CD13, CD15, megacariocitica CD61, CD41, CD42a, eritrocitaria CD36 e CD71.

La maggior parte delle cellule del midollo osseo sono costituite da precursori. Queste cellule presentano caratteristiche morfologiche nucleari e citoplasmatiche, fenotipiche e funzionali che consentono una loro classificazione nelle differenti filiere maturative (Smith, 2003).

In particolare nella filiera granulocitaria il primo precursore identificabile microscopicamente è il Mieloblasto, cellula ad alto rapporto nucleo/citoplasma, nucleolo prominente e ridotta granulosità citoplasmatica. Ad esso segue lo stadio di Promielocita, contraddistinto dall'acquisizione di granuli primari contenenti numerose proteine antibatteriche. L'ultimo stadio differenziativo dotato di capacità proliferativa è costituito dal Mielocita: la cellula acquisisce granuli secondari che le conferiscono le caratteristiche colorazioni in grado di distinguerle, alla microscopia ottica, da eosinofili e basofili. L'acquisizione dei granuli terziari (contenenti gelatinasi), è appannaggio dei successivi stadi maturativi, Metamielocita e *Band Cell*. Il Neutrofilo segmentato rappresenta la tappa finale dell'intero processo di maturazione (Figura 2).



**Fig.2:** granulopoiesi

I precursori, pertanto, presentano scarsa capacità di automantenimento, ma a causa della loro elevata numerosità e di una notevole attività mitotica aumentano considerevolmente il loro numero assoluto. Conseguentemente, passando da una *stem cell* ad elementi funzionalmente differenziati, le cellule più primitive hanno la capacità di originare una progenie enorme.

L'equilibrio tra il *self-renewal* e la differenziazione terminale, garantisce l'omeostasi ematopoietica. Se una cellula staminale è indotta a differenziare i geni preposti al *self-renewal* vengono *down*-regolati e contemporaneamente i geni che determinano l'acquisizione di una specifica identità funzionale vengono *up*-regolati (Young et al., 2006).

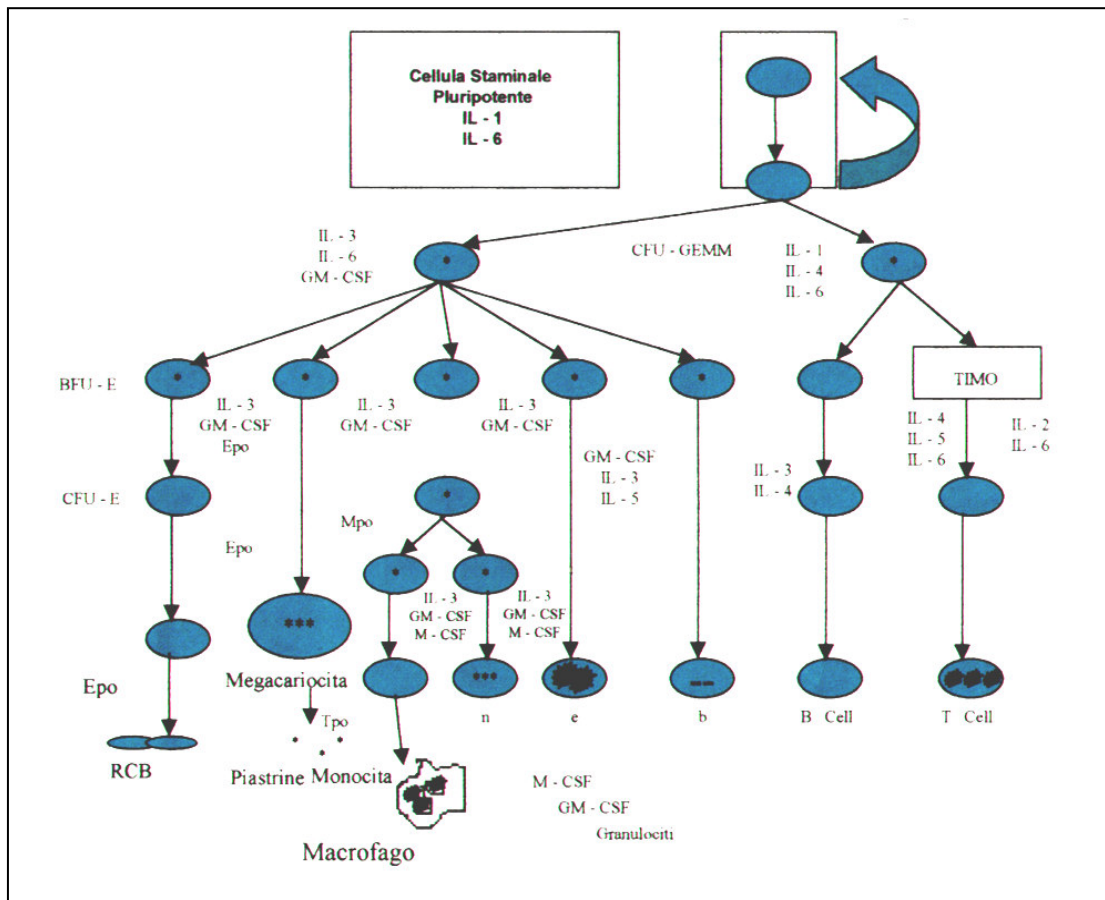
I fenomeni che sono alla base di tale *switch* sono ancora in gran parte oscuri. Si ritiene, comunque, che possano esistere sia meccanismi di regolazione intrinseci, basati sull'espressione di specifici geni *pivot* a monte della regolazione genica del *self-renewal*, sia meccanismi di regolazione estrinseci, costituiti da segnali e molecole modulatorie provenienti dall'ambiente extracellulare (Smith, 2003).

I segnali extracellulari che modulano la proliferazione e la differenziazione delle HSCs provengono principalmente dalla componente stromale del midollo osseo, caratterizzata da una struttura lassa, costituita da una delicata matrice extracellulare di origine connettivale, da cellule stromali e da un complesso sistema vascolare che fa da supporto al parenchima ematopoietico.

Probabilmente i segnali microambientali e di regolazione dell'ematopoiesi meglio caratterizzati sono le citochine, una grande ed eterogenea famiglia di fattori induttivi solubili. Questi peptidi, legandosi a specifici recettori espressi sulla superficie cellulare, attivano un'ampia gamma di *pathway* metabolici e di secondi messaggeri implicati nella modulazione dello stato di quiescenza, proliferazione e differenziazione delle cellule ematopoietiche stesse (Janowska-Wieczorek et al., 2001; Smith, 2003).

In base alle loro cellule *target* ed al loro differente potenziale induttivo è possibile dividere le citochine in tre grandi categorie funzionali: la prima comprende citochine ad azione induttiva precoce che concorrono al *reawakening* delle cellule pluri/multi potenti quiescenti, la seconda è costituita da citochine filiera-indipendenti esplicanti un'azione proliferativa e differenziativa intermedia sui progenitori *committed*, la terza è composta da citochine filiera dipendenti che agiscono sull'ematopoiesi tardiva inducendo la maturazione dei precursori in elementi ematici terminali (Figura 3) (Consolini et al., 2001).

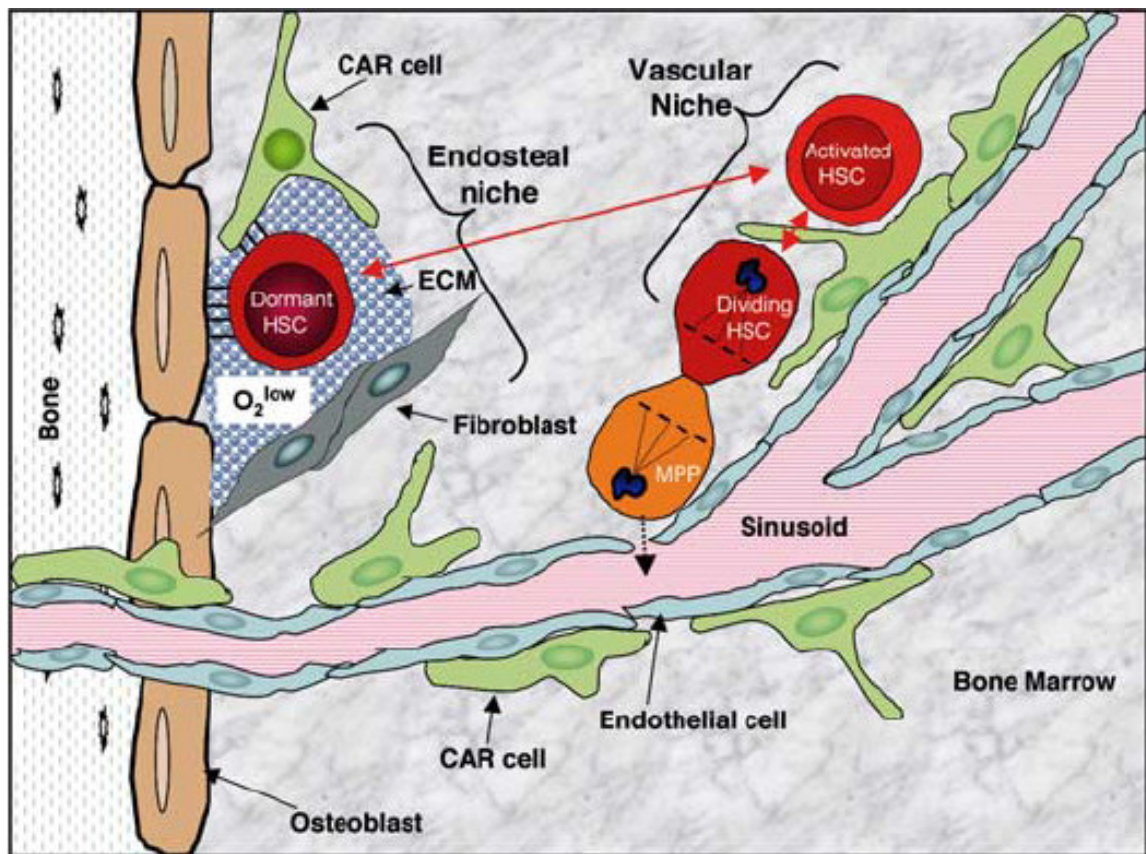
Al contrario il *self-renewal* è principalmente regolato dalla interazione diretta HSCs e cellule stromali ed endoteliali costituenti la nicchia ematopoietica.



**Fig. 3:** Compartimento ematopoietico: citochine che in condizioni fisiologiche intervengono nella differenziazione delle filiere maturative mieloidi e linfoidi.

## 2§. LA NICCHIA EMATOPOIETICA NORMALE

La nicchia ematopoietica, concetto introdotto per la prima volta da Lord nel 1975 (Lord et al., 1975) e successivamente da Scofield (1976) può essere considerata come una specifica area tissutale dove le cellule staminali risiedono per un periodo di tempo indefinito e nella quale possono proliferare per automantenersi o per generare cellule mature (Ohlstein et al., 2004) (Figura 4).



**Fig. 4:** la nicchia ematopoietica

Successivi studi hanno confermato la sua esistenza dimostrando che il numero delle HSCs in essa residenti è ben definito e regolato da un complesso *network* di segnali inibenti ed inducenti in equilibrio fra loro (Stier et al., 2005; Calvi et al., 2003). All'interno della nicchia, tali segnali bidirezionali sono critici per il mantenimento quiescente a lungo termine del pool HSCs (Fleming et al., 2008).

La frazione quiescente è correlata con le proprietà ripopolanti a lungo termine del midollo osseo (Gothot et al., 1998; Passegue et al., 2005) e la perdita di questa frazione è associata con l'incapacità di sostenere passaggi culturali multipli, condizione indispensabile per saggi di *self-renewal in vitro* (Fleming et al., 2008).

Anche la funzionalità staminale è mantenuta grazie all'interazione tra HSCs e cellule stromali poiché l'introduzione di cellule differenziate nella nicchia ne fa revertare il fenotipo ripristinando la staminalità (Adams & Scadden, 2006).

La nicchia fornisce, pertanto, un microambiente protetto che mantiene intatta la riserva di HSCs, impedendo loro di entrare in contatto con stimoli differenziativi o

pro apoptotici. Inoltre, regolando la proliferazione impedisce la sovrapproduzione cellulare che potrebbe originare neoplasie.

Sono noti due tipi di nicchia strettamente correlate tra di loro: quella osteoblastica (endosteale) e quella vascolare (Perry e Li, 2007).

La nicchia endosteale è definita anatomicamente dall'immediata prossimità all'osso trabecolare o corticale e può essere riprodotta *in vitro* con tecniche di co-coltura osteoblastiche (Mayack and Wagers, 2008; Mukherjee et al., 2008; Nilsson et al., 2001). Ospita HSCs CD150<sup>-</sup> quiescenti, lentamente ciclanti ed in grado di garantire l'ematopoiesi a lungo termine.

Le dimensioni della nicchia endosteale sono strettamente regolate dalla *proteina paratormone correlata* che, producendo l'espressione di Jagged-1 (ligando di Notch-1), induce gli osteoblasti N-cadherina<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> a proliferare e le HSCs ad automantenersi mediante un fine meccanismo omeostatico basato sull'interazione N-caderina/ $\beta$ -catenina tra questi due citotipi cellulari. La rottura di tale legame ad opera di metallo proteasi provoca nelle HSCs un accumulo di  $\beta$ -catenina intracitoplasmatica con conseguente attivazione delle vie metaboliche di Wnt necessarie per lo *start-up* dei programmi differenziativi delle cellule ematopoietiche e per la loro espansione clonale multi linea (Scadden, 2007). Al contrario, l'induzione delle vie metaboliche di Notch-1 sembrano determinati per il mantenimento della staminalità.

La nicchia vascolare è una struttura a diretto contatto con la superficie sinusoidale, costituita da cinque layer di Cellule Aventiziali Reticolari (CAR o periciti) che circondano le HSCs, come dimostrato dagli studi di Kiel et al. (2005), con metodi d'immunofluorescenza *in vivo*.

Le CAR, che per le loro proprietà di automantenimento e per la loro capacità di transdifferenziarsi in osteoblasti, condrociti ed adipociti si identificano nella cellula mesenchimale staminale, producono Angiopietina-1 (Ang-1) ed esprimono il CD146 e il CXCL12 (Stromal -derived factor-1, SDF-1). Quest'ultimo favorisce l'homing delle HSCs nella nicchia inducendole ad esprimere il *Vascular Cell Adhesion Molecole-1* (VCAM) e il *Very Late Antigen-4* (VLA-4). L'Ang-1 legandosi al proprio recettore Tie-2 ad attività tirosina chinasi, induce la quiescenza delle HSCs attraverso un meccanismo ancora non conosciuto.

La stretta cooperazione tra le due nicchie è regolata da gradienti di ossigeno e di Fibroblastic Growth Factor 4 (FGF4). Il loro incremento induce la proliferazione ed il passaggio delle HSCs dalla nicchia endosteale alla nicchia vascolare e successivamente al circolo. Al contrario, il decremento dei livelli di ossigeno e di

FGF4 inducono la migrazione transendoteliale delle HSCs dal circolo alla nicchia vascolare e da qui a quella endosteale.

Il passaggio delle HSCs quiescenti con fenotipo  $CD150^-CD34^-CD38^-Lin^-$  dalla nicchia endosteale alla nicchia vascolare si accompagna ad un'attivazione della proliferazione e delle *routine* cellulari differenziative con acquisizione del fenotipo più maturo  $CD150^+CD34^+CD38^-Lin^-$  tipico dei progenitori multipotenti (Wilson et al., 2007).

Alla costituzione di entrambe le nicchie partecipano anche le altre cellule stromali del midollo osseo quali gli osteoclasti, le cellule endoteliali, le cellule adipocitiche e le cellule dello stroma midollare, che, attraverso la produzione di citochine, chemochine e segnali intracellulari, a loro volta prodotti da fenomeni di adesione cellulare, svolgono un ruolo importante per la normale omeostasi midollare (Morrison and Spradling, 2008).

In particolare, gli osteoclasti giocano un ruolo importante nella mobilitazione delle HSCs (Calvi et al., 2003). Segnali di regolazione, inoltre, sono prodotti da componenti della matrice extracellulare, quali l'osteopontina e dagli ioni nei fluidi extra-cellulari (in particolare lo ione calcio) presenti nel microambiente (Adams and Scadden, 2006).

### **3§. LA LEUCEMIA MIELOIDE ACUTA**

Le leucemie mieloidi acute (LMA) costituiscono un gruppo eterogeneo di malattie neoplastiche clonali caratterizzate da un'abnorme produzione di cellule della linea granulo-monocitaria e originante da alterazioni genetiche od epigenetiche del genoma di una HSC o di un progenitore *committed*, che ne causano l'anormale differenziazione e l'acquisizione di un *self-renewal* disregolato.

Le LMA rappresentano il 30% di tutte le leucemie dell'adulto. Ogni anno in Europa sono diagnosticati circa 18.000 nuovi casi, lo 0.6% di tutti i tumori. Le LMA sono meno comuni delle leucemie linfatiche croniche, ma risultano essere cinque volte più frequenti al di sopra dei 50 anni di età. Infatti più del 30% dei pazienti colpiti ha un'età superiore a 60 anni (Pinto et al., 2001).

Le LMA si distinguono sul piano biologico, clinico e prognostico, in tre categorie. Le LMA *primarie* o *de novo*, compaiono acutamente in soggetti per i quali non è dimostrabile un'esposizione significativa ad agenti leucemogeni.

Le LMA secondarie ad esposizione nota ad agenti leucemogeni insorgono come secondo tumore in soggetti precedentemente trattati con chemioterapia per una pregressa neoplasia. Altre LMA sono secondarie a una precedente sindrome mielodisplastica della quale costituiscono l'evoluzione.

Il quadro clinico delle LMA dipende da insufficiente e difettiva produzione di cellule ematiche mature (eritrociti, granulociti neutrofili e piastrine), infiltrazione dei tessuti e degli organi non emopoietici da parte delle cellule leucemiche (organomegalia), liberazione, in parte dalle stesse cellule leucemiche e in parte dalle cellule del sistema linfatico e monocitomacrofagico, di mediatori chimici (citochine).

Il tempo che intercorre fra i primi sintomi e la diagnosi va da 2-3 settimane a 2-3 mesi. Quando la storia pre-diagnosi è più lunga, spesso si tratta di una LMA secondaria ad una sindrome mielodisplastica e non di una LMA insorta *de novo*.

L'insufficiente produzione di eritrociti si manifesta con i sintomi dell'anemia, mentre l'insufficienza piastrinica si concretizza in manifestazioni emorragiche come porpora, ecchimosi, epistassi o ipermenorrea. L'insufficiente produzione di granulociti neutrofili è causa di infezioni, che inizialmente sono quasi sempre batteriche e localizzate prevalentemente al cavo orale ed all'orofaringe, all'apparato respiratorio e alla cute. A questi sintomi se ne possono associare di generali, secondari all'espansione della massa leucemica e alla liberazione di mediatori chimici dell'infiammazione: dolori ossei e muscolari, sudorazioni profuse, calo ponderale. Relativamente poco frequente è il riscontro di epatomegalia, splenomegalia, linfadenomegalie e interessamento cutaneo. Molto rari sono i segni di interessamento del sistema nervoso centrale o dei nervi cranici (Lezioni di Ematologia di Sante Tura, 2003).

La diagnosi di LMA si esegue mediante esame emocitometrico e con formula leucocitaria eseguita su sangue periferico e da ago aspirato midollare completato con la biopsia ossea, se il primo è povero o privo di cellule (Löwenberg et al., 1999).

Il riconoscimento delle caratteristiche mieloidi dei blasti leucemici della LMA avviene primariamente su base morfologica ed è perfezionato mediante tecniche di immunocitometria con anticorpi monoclonali che riconoscono specifici *marker* di membrana.

Rispetto alle sindromi linfoproliferative acute e croniche, nelle LMA la fenotipizzazione immunologica riveste un'importanza clinica meno stringente diventando strettamente necessaria solo nello studio dei casi non facilmente classificabili mediante la morfologia e la citochimica, come ad esempio nella LMA con minimi segni di maturazione (M0), i cui i blasti sono perossidasi negativi e non presentano granulazioni (Catovsky, 1992; Bene et al., 1995; Sanz et al., 1996), o nella forma variante della leucemia promielocitica (M3) (Sanz et al., 1996) (Tabella I)



DIAGNOSI IMMUNOLOGICA DELLE LEUCEMIE MIELOIDI ACUTE							
	M0	M2 t(8;21)	M3 t(15;17)	M4Eo inv16	M5	M5 11q23	M7
MPO	+/-	+	+	+	-/+	-	-
CD2	-	-	-	+	-	-	-
CD13	+/-	+	+	+	+	-	+/-
CD14	-	-	+/-	+/-	+/-	-	+/-
CD15	-	+	-	+/-	-	+	-
CD19	-	+	-	-	-	-	-
CD33	+/-	+	+	+	+	+	+/-
CD34	+/-	+	-	-/+	-	-	-
CD56	-	+	-	-	-	-	-
CD61	-	-	-	-	-	-	+
CD64	-	-	+	+	+	+	-
CD65	+/-	+	-/+	+	+	+	+
CD117	+	+/-	-/+	+	+/-	-	-
HLA-DR	+/-	+	-	+	+	+	+/-

-: antigene non espresso; -/+: antigene espresso in meno della metà dei soggetti; +/-: antigene espresso nella maggioranza dei soggetti.

**Tab.I:** Diagnosi immunologica delle leucemie mieloidi acute

Negli ultimi anni è emersa una serie di associazioni tra quadri citomorfologici ed aspetti citogenetici. Nell'ambito di alcuni citotipi è possibile distinguere entità citologiche associate a particolari alterazioni cromosomiche. Le alterazioni citogenetiche possono essere numeriche e/o strutturali e possono essere presenti come anomalie singole o in associazione.

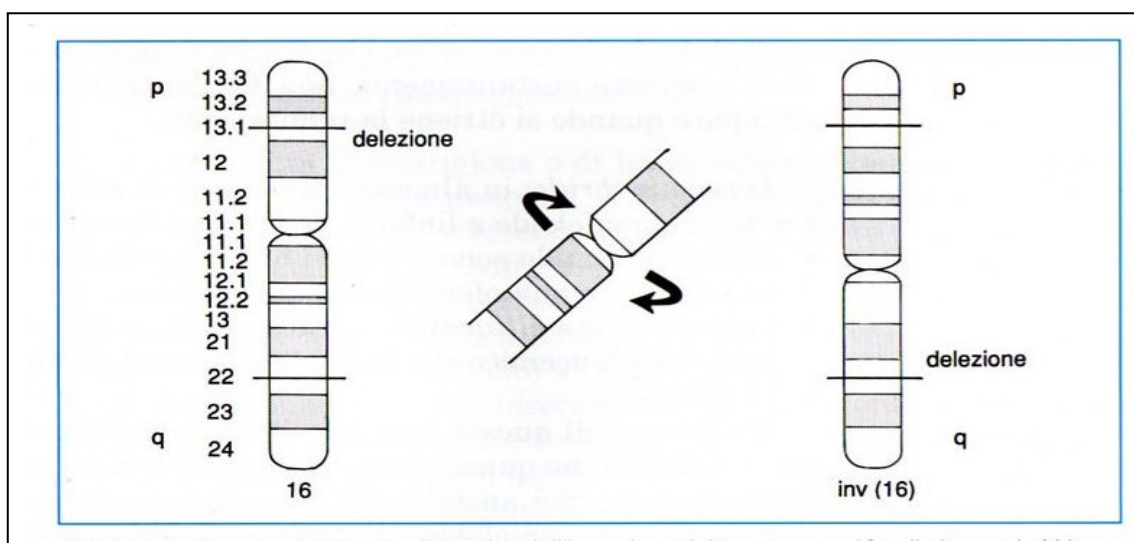
In molte leucemie acute, caratterizzate da particolari traslocazioni cromosomiche, mediante la tecnica della PCR è possibile l'amplificazione di sequenze di DNA tumore specifiche o amplificazione di mRNA chimerici tumore associati, spesso mediante una retrotrascrizione del loro mRNA a c-DNA (Tabella II).

Tipo	Geni coinvolti	Proteina di fusione	Malattia
inv(14)(q11;q32)	TCR- $\alpha$ (14q11) V $_H$ (14q32)	V $_H$ -TCR-C $\alpha$	Linfoma a cellule T/B
t(9;22)(q34;q11)	CABL(9q34) BCR(22q11)	serina+ tirosina kinasi	LMC/LAL
t(1;19)(q23;p13.3)	PBX1(1q23) E2A(19p13.3)	AD + HD	LAL- pre-B
t(17;19)(q22;p13)	HLF(17q22) E2A(19p13)	AD + bZIP	LAL- pro-B
t(15;17)(q21;q11-22)	PML(15q21) RARA(17q21)	ZN fingers + RAR DNA	LAM M3
t(11;17)(q23;q21.1)	PLZF(11q23) RARA (17q21)	ZN fingers + RAR DNA	LAM M3
t(4;11)(q21;q23)	MLL(11q23) AF4 (4q21)	A-T Hook	LAL/pre B-LAL/LAM
t(9;11)(q21;q23)	MLL(11q23) AF9/MLLT3 (9p22)	A-T Hook	LAL/LAL-pre-B/LAM
t(11;19)(q23;p13)	MLL(11q23) ENL(19p13)	A-T Hook	LAL-pre-B/LAL-T/LAM
t(X;11)(q13;q23)	MLL(11q23) AFX1 (Xq13)	A-T Hook	LAL-T
t(1;11)(p32;q23)	MLL(11q23) AF1P(1p32)	A-T Hook	LAL
t(6;11)(q27;q23)	MLL(11q23) AF6(6q27)	A-T Hook	LAL
t(11;17)(q23;q21)	MLL(11q23) AF17(17q21)	A-T Hook	LAM
t(8;21)(q22;q22)	AML1/CBF $\alpha$ (21q22) ETO/MTG8(8q22)	DNA binding - ZN fingers	LAM
t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22) EVI-1(3q26)	DNA binding - ZN fingers	LMC
t(3;21)(q26;q22)	AML1(21q22) EAP(3q26)	DNA binding	Mielodisplasia
t(16;21)(p11;q22)	FUS(16p11) ERG(21q22)	Gin-Ser-Tyr+DNA binding	LAM
t(6;9)(p23;q34)	DEK(6p23) CAN(9q34)	? + ZIP	LAM
9;9?	SET(9q34) CAN (9p34)	? + ZIP	LA ind.
t(4;16)(q26;p13)	IL-2(4q26) BCM(16p13.1)	IL-2/TM	Linfoma T
inv(2;2)(p13;p11.2-14)	REL (2p13) NRG(2p11.2-14)	DNA	LNH
inv(16)(p13q22)	Miosina MYH11(16p13) CBR-(16q22)	DNA	LAM
t(5;12)(q33;p13)	PDGF- $\beta$ (5q33) TEL (12p13)		LMMoC

LMC = Leucemia mieloide cronica; LAL = Leucemia acuta linfoide; LAM = Leucemia acuta mieloide; LMMoC = Leucemia mielo-monocitica cronica; LA ind. = Leucemia acuta indifferenziata; LNH = Linfoma non Hodgkin.

**Tab. II:** Principali traslocazioni cromosomiche associate a leucemie acute, croniche e linfomi

Appartiene a questo tipo di traslocazioni cromosomiche, associate all'espressione di *marker* e di mRNA tumore specifici, la traslocazione t(15;17)(q21;12) caratteristica della leucemia acuta promielocitica (APL). L'inversione pericentrica del cromosoma 16[inv(16)p13-q22] (Figura 5), è un'alterazione associata alle leucemia mieloblastica M4 con elevata presenza nel midollo osseo e nel sangue di precursori eosinofili e coinvolge sul 16q il gene PEBP2 chiamato anche CBF e sul cromosoma 16p il gene MYH11, che codifica per la catena pesante della miosina del muscolo liscio dando origine a un gene di fusione o mRNA chimerico.



**Fig. 5:** Rappresentazione schematica dell'inversione del cromosoma 16 nella leucemia M4 con eosinofilia. A sinistra il cromosoma 16 normale, a destra con l'inversione e al centro la porzione del cromosoma che viene invertita

Una translocazione cromosomica *non random*, caratterizzata da un particolare punto di rottura (*break point*) t(8;21) (q22;q22), avviene in circa l'8-18% dei pazienti con leucemia M2. Più recentemente, il *break point* associato alla translocazione è stato clonato e si è potuto così identificare un trascritto prodotto dal gene di fusione e denominato AML I/ETO.

In generale, nel 60% dei pazienti con LMA, analisi citogenetiche pre-trattamento rivelano cariotipi anomali. Pertanto, con analisi citogenetiche è possibile identificare sottopopolazioni distinte di LMA che richiedono un approccio terapeutico su misura (Grimwade, 2007). Le alterazioni citogenetiche presenti alla diagnosi scompaiono in remissione completa, per riapparire all'eventuale ricaduta con o senza anomalie addizionali. La presenza dell'inv(16) si associa a una buona prognosi.

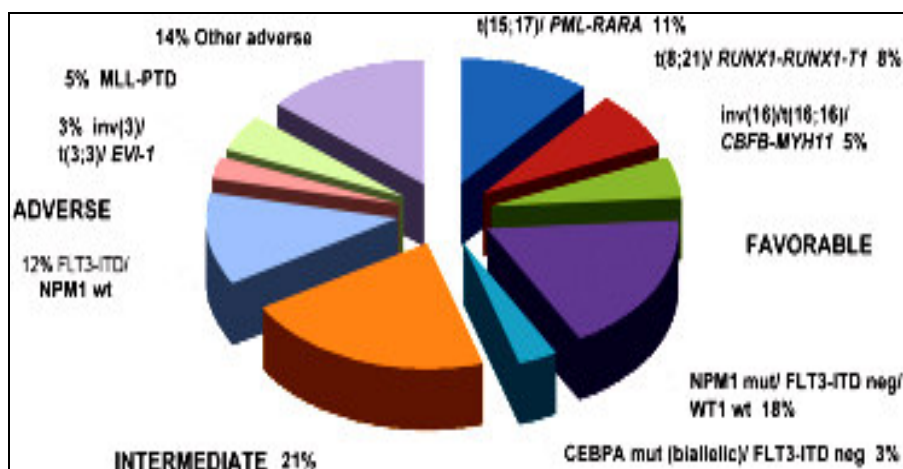
Analisi rapide citogenetiche identificano pazienti con LMA con caratteristiche cariotipiche avverse, che hanno una prognosi particolarmente negativa se trattati con chemioterapia convenzionale (meno del 5% di sopravvivenza a 5 anni) (Grimwade, 2007). Nei bambini e nei giovani adulti è importante distinguere da subito pazienti con alti rischi di ricaduta, per poter passare direttamente alla scelta del trapianto allogenico come terapia elettiva finalizzata ad ottenere la remissione completa.

Il *Medical Research Council* (MRC) ha considerato l'*outcome* di 5636 pazienti affetti da LAM, compresi tra i 16 e i 59 anni, con esami cariotipici positivi (Grimwade et al., 2009). In questa analisi multivariabile diverse anomalie sono state trovate essere predittive di un significativo *outcome* negativo: abn(3q) [escludendo t(3;5)(q21~25;q31~35)], inv(3)(q21q26) /t(3;3) (q21;q26), add(5q), del(5q), -5, -7, add(7q), t(6;11)(q27;q23), t(10;11) (p11~13;q23), t(9;22)(q34;q11), -17 e abn(17p). Anche pazienti che mancano di queste aberrazioni ma con più di tre anomalie indipendenti (cariotipo complicato) esibiscono una prognosi particolarmente negativa (Grimwade et al., 2009).

Comunque, l'utilizzo del cariotipo come strumento di identificazione del rischio presenta numerose limitazioni quali il *failure* delle analisi citogenetiche, la presenza di riarrangiamenti cromosomici criptici e LMA con cariotipo normale nel 40% dei casi (Grimwade, 2007). Per questo negli ultimi anni l'interesse si è spostato sullo studio delle mutazioni dei geni codificanti Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3), NPM1 (nucleophosmin) e CCAAT/enhancer binding protein alpha (CEBPA) (Mròzek et al., 2007).

La scoperta di queste mutazioni implica che è possibile distinguere gruppi di pazienti con *outcome* diversi dalla grande parte costituita da LMA con cariotipi normali o con anomalie citogenetiche varie. Per questo l'attenzione si è spostata

sullo studio delle interconnessioni tra mutazioni e la loro rilevanza prognostica (Figura 6)



**Fig. 6:** Frequenza dei sottogruppi citogenetici e molecolari rilevanti nella prognosi di LMA nei giovani adulti.

In particolare, casi di LAM con FLT3 non mutato in presenza di NPM1 o mutazioni bialleliche di C/EBPA, esibiscono prognosi simile alle forme di leucemia con coinvolgimento del CBF (*core-binding factor*), fattore di trascrizione coinvolto nella differenziazione staminale (Schlenk et al., 2008; Green et al., 2009; Haferlach et al., 2009; Renneville et al., 2009). Questo spiega perché i pazienti con tali mutazioni non beneficiano di un trapianto allogenico (Schlenk et al., 2008; Green et al., 2009; Haferlach et al., 2009; Renneville et al., 2009).

Nei pazienti affetti da LMA sono state identificate anche altre numerose mutazioni: mutazioni del gene RAS sono relativamente comuni, manifestandosi nel 15% dei casi (Mrozek et al., 2007); mutazioni nel gene TET2 sono state identificate nel 10% dei pazienti (Abel-Wahab et al., 2009) e in percentuali simili sono state riscontrate mutazioni anche nel gene IDH1 (Mardis et al., 2009). Al contrario, relativamente rare sono le mutazioni di KIT, PTPN11, RUNX1 e CBL identificate in meno del 5% dei pazienti affetti da LMA (Ley et al., 2008).

Nel 2007 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha proposto un nuovo sistema classificativo dei disordini mieloproliferativi che adotta, accanto ai criteri clinici e morfologici della precedente classificazione FAB (Gruppo Cooperativo Franco-Americano-Britannico: vedi Tabella III), caratteristiche immunofenotipiche, citogenetiche e biologico-molecolari: la classificazione WHO (Swerdlow et al., 2008) (Tabella IV).

SIGLA	CATEGORIA	CRITERI MORFOLOGICI
M0 *	INDIFFERENZIATA	MPO <3% ma mostra granulazioni caratteristiche al microscopio elettronico; NAE negativa
M1	MIELOBLASTICA SENZA MATURAZIONE	Blasti >90% nel midollo esclusi eritroblasti; <10% componente monocitaria; <10% granulociti, MPO >3%
M2	MIELOBLASTICA CON MATURAZIONE	Blasti 30<90%; granulociti >10%; monociti <20% (NE), MPO >3%
M3 **	PROMIELOCITICA (APL)	>20% promielociti anomali ipergranulari (corpi di Auer), MPO>3%;
M3V**	PROMIELOCITICA VARIANTE IPOGRANULARE (APLv)	Nuclei reniformi, granulazioni fini nel citoplasma, poco visibili al MO, ma MPO +++ , MPO >3%
M4	MIELOMONOCITICA	Blasti >30%, NE componente granulocitaria 20<80%, componente monocitaria 20<80%, >5x10 <sup>9</sup> /l monociti nel sangue periferico o lisozima elevato, MPO >3%
M4 eo	MIELOMONOCITICA CON IPEREOSINOFILIA	Criteri per M4 associati a eosinofili anormali con granuli eosinofili e basofili, MPO >3%
M5	MONOCITICA	>80% NE componente monocitaria; NAE positiva
M5a	MONOCITICA SENZA DIFFERENZIAZIONE (MONOBLASTICA)	>80% NE componente monocitaria; monoblasti >80% della componente monocitaria, NAE positiva
M5b	MONOCITICA CON DIFFERENZIAZIONE	>80% NE componente monocitaria; monoblasti <80% della componente monocitaria NAE positiva
M6	ERITROLEUCEMIA	Cellule eritroidi >50% delle cellule midollari; blasti >30% NE
M7***	MEGACARIOBLASTICA	Blasti >30% NE; megacarioblasti, <i>blebs</i> , (mielofibrosi)

**Tab. III:** Classificazione istochimica-morfologica FAB

Nel 50-60% dei casi di bambini affetti da LMA, la malattia può essere classificata come forma M1, M2, M3, M6 o M7, mentre nel restante 40% dei casi la LMA si presenta con i sottotipi M4 o M5. Al contrario, sotto ai due anni di età, circa l'80% delle LMA appartengono al sottotipo M4 o M5 a cui si associano riarrangiamenti della banda 11q23 coinvolgenti il gene MLL (Swerdlow et al., 2007).

LAM con anomalie genetiche ricorrenti	LAM con t(8;21)(q22;q22); (AML1 [CBFA]/ETO)	
	LAM con anomalie eosinofile midollari con	inv(16)(p13q22)
		t(16;16)(p13;q22) (CBFB/MYH11)
	LAP = LAM t(15;17)(q22;q12) (PML/RARA) e relative varianti	
LAM con anomalie 11q23 (MLL)		
LAM con displasia multipla (de novo o secondarie a MDS specie AREB o AREBt)		
LAM, correlate alla terapia	da agenti alchilanti.	
	da inibitori della topoisomerasi II	
LAM di derivazione ambigua	LAM indifferenziata	
	LA bilineare (presenza contemporanea di più cloni trasformati)	
	LA bifenotipica (singola popolazione di cellule leucemiche con simultanea espressione di differenti origine emopoietica)	
LAM non altrimenti caratterizzata	LAM con minima differenziazione (FAB M0)	
	LAM senza maturazione (FAB M1)	
	LAM con maturazione (FAB M2)	
	AMML (FAB M4)	
	FAB M5a and M5b	
	LAM eritrocitaria (FAB M6)	Eritroleucemia (FAB M6a)
		Leucemia Eritroide Pura (FAB M6b)
	Leucemia Acuta Megacariocitica (FAB M7)	
	Leucemia Acuta Basofila	
	Panmielosi acuta con mielofibrosi	
Sarcoma mieloide (granulocitico)		

**Tabella IV:** Classificazione WHO della leucemia mieloide acuta

Le probabilità di una lunga sopravvivenza o di guarigione sono attorno al 25%, ma l'età avanzata del paziente condiziona la prognosi, il decorso e l'atteggiamento terapeutico da tenere.

Inoltre, la capacità dell'organismo di sopportare la terapia antileucemica (chemioterapia di diversa intensità e durata e trapianto di midollo) si riduce con il progredire dell'età. D'altro canto, le LMA dell'anziano sono intrinsecamente più resistenti alla terapia antileucemica e hanno caratteristiche cliniche e biologiche più vicine alle LMA secondarie che a quelle *de novo*.

L'obiettivo primario del trattamento dei pazienti con l'LMA è di raggiungere e mantenere la remissione completa (RC) (Freireich et al., 1961). Per remissione completa si intende una normalizzazione della conta a un valore pari o maggiore di  $100 \times 10^9/l$  per le piastrine, di  $1.5 \times 10^9/l$  per i leucociti ed una presenza di blasti nel midollo osseo inferiore al 5% (Cheson, 2004). Dopo 3 anni di remissione completa

la probabilità di recidiva è inferiore al 10% e i pazienti possono essere considerati potenzialmente guariti (De Lima et al., 1997).

La terapia della LMA si basa sulla somministrazione di agenti citotossici finalizzata a ridurre ai minimi termini e, possibilmente, ad eradicare la popolazione leucemica, consentendo alle cellule staminali normali residue di ripopolare il midollo. I farmaci principali sono la Citosina Arabinoside, che può essere usata a dosi standard (200 mg/m<sup>2</sup>/die in perfusione continua) o a dosi medio-alte (1-2 g/m<sup>2</sup> ogni 12-24 ore, per un totale di 6-12 dosi) e le antracicline o similari (Daunomicina, Adriamicina, Idarubicina, Mitoxantrone). Lo schema classico di riferimento è definito 3/7 costituito da un'antraciclina (somministrata per tre giorni) e Citosina Arabinoside in perfusione continua per 7 giorni. Questo schema, variato con la Citosina Arabinoside ad alte dosi e con l'aggiunta o la sostituzione, di volta in volta, degli altri farmaci, viene ripetuto per uno o più cicli per ottenere la remissione.

A raggiungimento della remissione completa, l'interruzione delle terapie assicura un periodo libero da malattia variabile tra 6 e 12 mesi e solo il 10-20% dei pazienti sopravvive più di 5 anni. Al contrario, la prosecuzione della polichemioterapia assicura da 8 a 24 mesi di remissione ed una sopravvivenza a cinque anni del 10-30% dei casi. Nel trapianto di midollo autologo la durata media della remissione è, invece, superiore a 24 mesi e il numero di pazienti che sopravvivono oltre i cinque anni incrementa al 30-50% dei casi. Il trapianto di midollo allogenico assicura una remissione superiore ai 24 mesi e una percentuale di sopravvivenza a cinque anni compresa tra il 30 e il 60% dei casi, ma il 10-30% dei pazienti muore a causa degli effetti tossici del trapianto stesso (Lezioni di Ematologia di Sante Tura).

#### **4§. LA LEUKEMIC STEM CELL E LA NICCHIA NEOPLASTICA**

Si è già riferito che l'ematopoiesi leucemica è la copia dell'ematopoiesi normale con un'organizzazione gerarchica che prevede al vertice una cellula leucemica staminale (LSC) (Bonnet and Dick, 1997) e a valle sottopopolazioni cellulari con potenziale autoreplicativo limitato.

I *subset* più primitivi delle LSC, similmente ai *subset* staminali normali, hanno fenotipo CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>Thy1<sup>-</sup> e sono costituiti da cellule per la maggior parte quiescenti, chemioresistenti, dotate di autorinnovamento e tumoregenicità in topi SCID (Several Combined ImmunoDeficiency) e NOD-SCID (Non-Obese Diabetic/SCID).

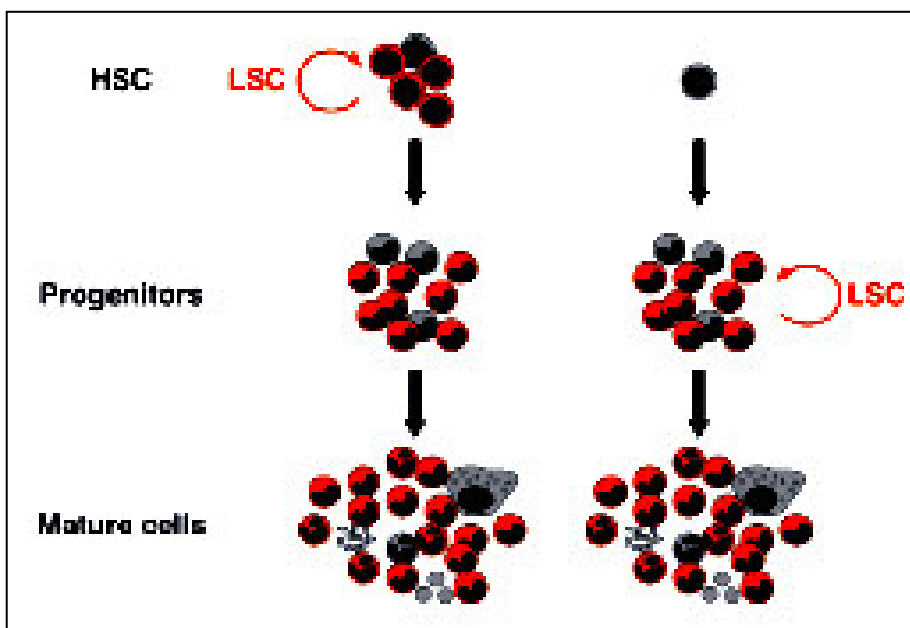
Come per le HSCs normali, la loro progenie è composta da popolazioni eterogenee per caratteristiche fenotipiche, capacità proliferative e potenziale leucemiogeno. Esperimenti *in vivo* ed *in vitro* hanno evidenziato che la frequenza delle cellule

leucemiogene varia dallo 0.2 all'1% nell'intera popolazione neoplastica, mentre la maggior parte dei blasti costituisce il *bulk* neoplastico caratterizzato da un'aberrante differenziazione, ma incapace di trasferire negli animali da esperimento la leucemia (Dalerba et al., 2007).

Le indagini citogenetiche e di biologia molecolare condotte sulle LSC CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>Thy1<sup>-</sup> hanno individuato mutazioni multiple dei domini chinasi, dei fattori di trascrizione e dei geni oncosoppressori. Tali mutazioni sono associate ad alterazioni dei meccanismi di crescita e di sopravvivenza mediati da NF-kappa B (NF-κB) e PI3 chinasi, a modificazioni del metabolismo del glucosio e della risposta agli stress ossidativi.

Al contrario, nella progenie più differenziata segnali epigenetici, quali la modificazione della struttura cromatinica e la deacetilazione degli istoni, sembrano svolgere un ruolo importante nella limitazione del potenziale leucemiogeno e di autorinnovamento.

L'origine delle LSCs appare ancora controversa. Poiché la cellula staminale normale e quella leucemica sono accumulate dalle capacità di autorinnovamento e di differenziare in progenie pluriclone, appare plausibile l'ipotesi che le HSCs siano il *target* della trasformazione leucemica che si realizza per l'accumulo progressivo di mutazioni. Comunque, anche cellule prive di *self-renewal* quali i progenitori *committed* potrebbero essere il *target* di mutazioni leucemogene capaci di riattivare la loro staminalità, come dimostrerebbero gli studi di So et al. (2003) (Figura 7).



**Fig. 7:** Origine della cellula staminale leucemica.



Se l'accumulo di mutazioni pro-oncogeniche è la condizione necessaria per il processo di leucemiogenesi, il suo *triggering* dipende in larga misura anche da alterazioni del microambiente midollare. Quest'ultimo, interagendo con le cellule mutate, attiva una cascata di segnali extra ed intracellulari in grado di promuovere la sopravvivenza e la crescita delle LSCs.

Recenti studi, infatti, hanno dimostrato che il completo silenziamento, in modelli murini, del gene del retinoblastoma (Rb) induce un'ematopoiesi extramidollare ed un disordine mieloproliferativo (Walkley et al., 2007). Al contrario, il trapianto in topi sani di cellule leucemiche inattivate per Rb non sviluppa la malattia. Conseguentemente questa osservazione indica che nei topi mutati il disordine mieloproliferativo è causato da un alterato rapporto tra progenitori ematopoietici e il microambiente midollare. Tali osservazioni sono state confermate anche nei topi mutati per il recettore gamma dell'acido retinoico ( $RAR\gamma^{-/-}$ ) la cui alterazione determina un'analogha malattia mieloproliferativa associata a carenza osteoblastica.

Anche l'inattivazione del gene PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) sia a livello delle cellule stromali che dei progenitori ematopoietici è responsabile di una sindrome mieloproliferativa che evolve in leucemia acuta (Yilmaz et al., 2006). Comunque, il trapianto in topi singenici di progenitori ematopoietici PTEN- non è di per sé un fattore scatenante la sindrome.

Rispetto alle HSCs normali, le LSC presentano un'aumentata adesività allo stroma midollare mediata dall'interazione tra VLA-4 espresso dalle cellule leucemiche e la fibronectina prodotta dalle cellule dello stroma che facilita la permanenza delle LSC nella nicchia e la persistenza della malattia minima residua. Anche la proteina transmembrana altamente glicosiliata CD44 svolge un ruolo fondamentale nell'ancoraggio delle LSC alle strutture stromali mediando le interazioni cellula-cellula e il legame alle componenti della matrice extracellulare midollare. Infatti, la somministrazione dell'anticorpo monoclonale anti-CD44 in topi NOD/SCID sottoposti a trapianto con cellule leucemiche umane, riduce la massa leucemica impedendo alle LSC di accasarsi nella nicchia.

Le LMA presentano, inoltre, alti livelli di CXCR4 significativamente correlati a prognosi non favorevole. In xenotrapianti in topi NOD/SCID è stato dimostrato che il CXCR4 è indispensabile per l'*homing* midollare delle LSCs. Inoltre, evidenze sperimentali indicano che il ligando CXCL12 è responsabile della chemiotassi delle cellule leucemiche CXCR4 positive. Elevati livelli di espressione di CXCR4 sono osservabili nelle LMA che presentano il difetto di espressione molecolare "*internal tandem duplication*" (ITD) a carico di FIt3 e ciò indica come tale citochina sia implicata nei fenomeni di *trafficking* ed *homing* delle LSC (Romboust et al., 2004). L'importanza dell'asse CXCL12/CXCR4 nell'accasamento delle cellule leucemiche è

stata recentemente sottolineata da Colmone et al. (2008). Cellule leucemiche trapiantate nel topo inizialmente migrano verso la nicchia vascolare CXCL12 positiva. Ad un mese dal trapianto, comunque, i livelli di CXCL12 nella nicchia decrescono e questa può essere colonizzata, a seguito di reinfusione di cellule staminali normali CD34<sup>+</sup>, mediante un meccanismo CXCL12 indipendente ma correlato ai livelli di *Stem Cell Factor* (SCF) secreto dai blasti leucemici. Ciò dimostra che la cellula leucemica può *by-passare* i normali meccanismi di *signaling* della nicchia ematopoietica fisiologicamente utilizzati dalle HSCs per il proprio *homing*.

L'asservimento della nicchia al metabolismo della cellula leucemica è dimostrato anche dalla capacità delle LCS di proliferare in condizioni di ipossia. In queste condizioni i *cluster* neoplastici sviluppati producono elevati livelli del fattore trascrizionale 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) che a sua volta mediante *loop* paracrini incrementa l'espressione di CXCL12 sulla superficie delle cellule endoteliali e mediante induzione autocrina l'espressione CXCR4 nelle LMA. Con meccanismi analoghi HIF-1 $\alpha$  aumenta l'espressione di VEGF da parte delle LSCs.

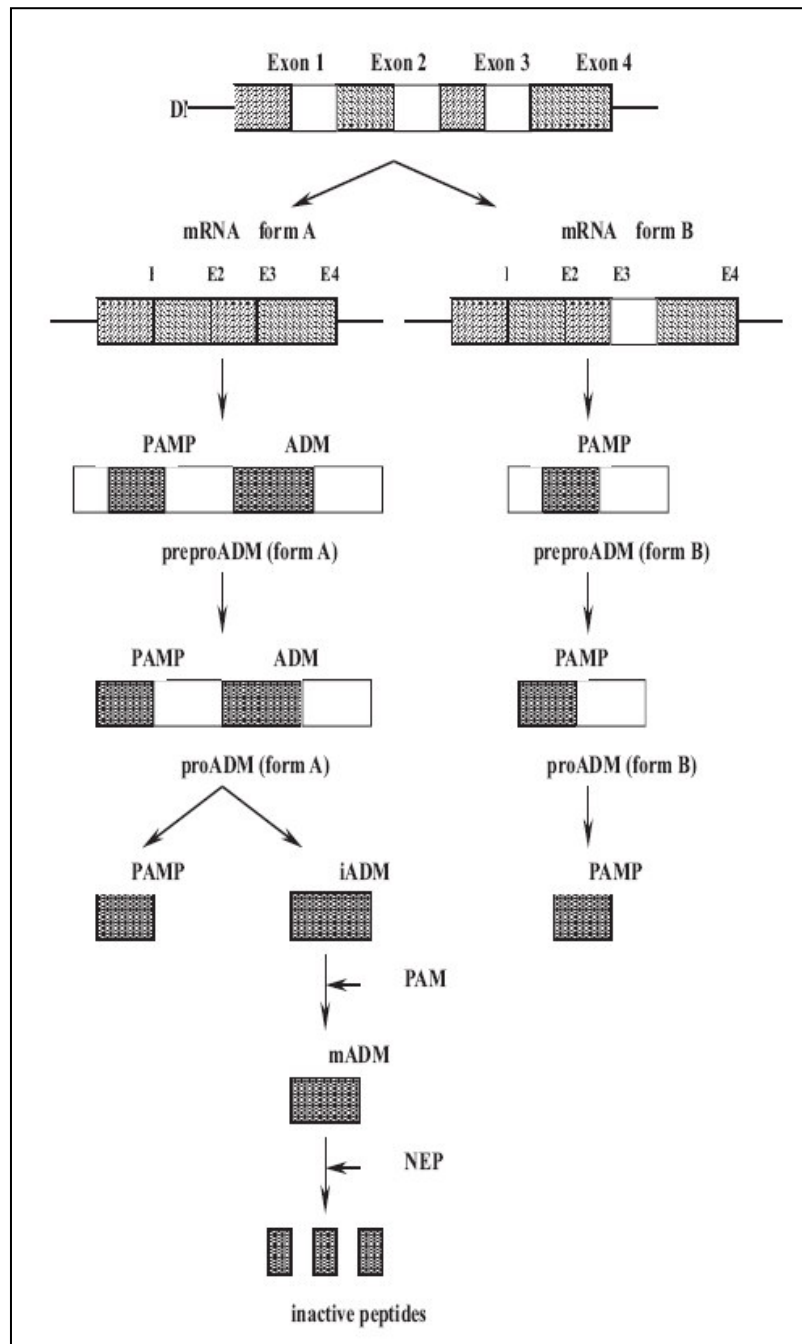
Pertanto, considerati globalmente, questi dati evidenziano come le integrine e in particolare l'asse CXCR4/CXCL12 potrebbero costituire un bersaglio per terapie antiblastiche innovative.

## **5§. ADRENOMEDULLINA**

L'adrenomedullina (ADM) è un peptide noto soprattutto per le sue capacità ipotensive che funziona come un ormone circolante e come mediatore paracrino locale con diverse attività biologiche (Hinson et al., 2000). ADM è stata isolata per la prima volta dal feocromocitoma umano dal gruppo di Kitamura (Kitamura et al., 1993). In seguito, gli stessi Autori dimostrarono che ADM deriva dal taglio proteolitico di un pro-ormone, la preadrenomedullina (ppADM), che all'estremità amino-terminale presenta una sequenza di 20 residui aminoacidici, definita proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP), in grado di esercitare un effetto ipotensivo transiente (Kitamura et al., 1994).

Il gene umano per la ppADM è localizzato sul cromosoma 11 ed è costituito da quattro esoni e da tre introni (Ishimitsu et al., 1994) con TATA, CAAT e GC *boxes* all'estremità 5'. Inizialmente la ppADM è un pro-ormone lungo 185 aminoacidi, che successivamente viene ridotto a preadrenomedullina (pADM), lunga 164 aminoacidi, grazie a un taglio operato a livello del legame Thr -Ala . Il peptide PAMP si origina in seguito ad un ulteriore taglio a livello del legame Lys -Arg . Infine, nella pADM, vengono scissi i legami Lys -Arg e Arg -Arg per dare origine all'ADM, che

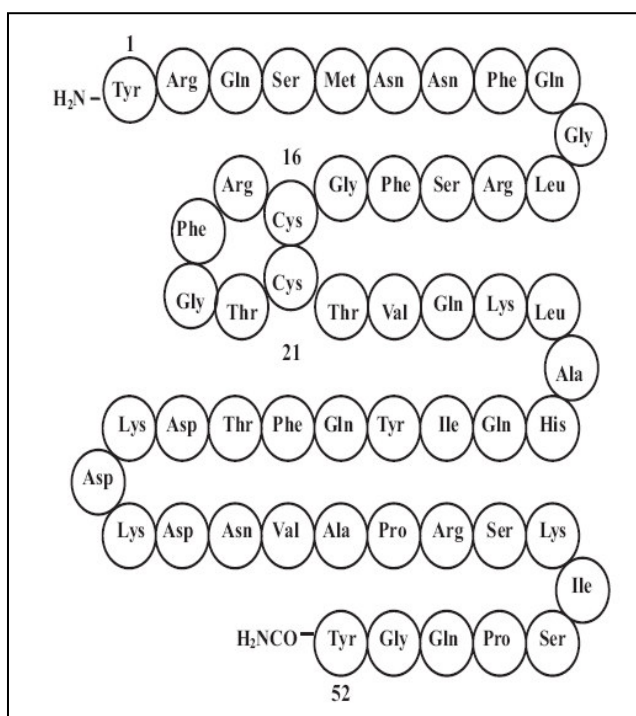
nell'uomo è un peptide lungo 52 aminoacidi (Champion et al., 1999; Nussdorfer et al., 1997b) (Figura 8).



**Fig.8:** Sintesi e metabolismo di ADM e PAMP (PAM-peptidylglycine  $\alpha$ -monooxygenase, NEP- neutral endopeptidase).

ADM è un peptide contenente un anello di sei residui, formato da un ponte disulfuro tra i residui di cisteina nelle posizioni 16 e 21 e questo anello sembra essere essenziale per la sua attività biologica (Belloni et al., 2001). La parte C-terminale

ha un residuo di tirosina amidato (-CONH<sub>2</sub>), struttura altrettanto fondamentale per la sua funzione (Figura 9).



**Fig. 9:** Struttura di ADM umana.

ADM appartiene ad una famiglia di peptidi che comprende la calcitonina (CT), i peptidi correlati al gene della calcitonina (calcitonin gene-related peptides, CGRP) e l'amilina (Muff et al., 2001). Inizialmente erano stati identificati due probabili recettori per l'ADM, il recettore L1 ad alta affinità e selettività per ADM (Kapas et al., 1995) e il chemokine-like receptor RDC1 a bassa affinità per ADM (Kapas et Clark, 1995).

Molte evidenze indicano che ADM agisce attraverso un recettore derivato dalla combinazione di due proteine, CRLR (calcitonin-receptor-like receptor) e RAMP (receptor-activity-modifying protein). La famiglia di proteine RAMP comprende tre membri che possono cambiare la specificità del recettore: RAMP1 genera con CRLR recettori per i CGRP (calcitonin gene-related peptide), mentre RAMP2 e RAMP3 generano recettori per ADM (McLatchie et al., 1998; Foord et Marshall, 1999; Chakravarty et al., 2000). La sequenza C terminale e la struttura dell'anello servono entrambe per il legame e l'attivazione del recettore. Perciò, ADM (22-52) che manca della sequenza N terminale e della struttura dell'anello agisce come un antagonista selettivo di ADM (Belloni et al., 1998).

Oltre i feocromocitomi e la midollare della ghiandola surrenale, anche il sistema cardiovascolare, i reni, i polmoni, la milza, l'apparato digestivo, l'utero, l'ovaia, la prostata, la tiroide, l'ipofisi e il cervello producono ADM. L'espressione più alta sembra avvenire nelle cellule cromaffini della midollare della ghiandola adrenale, nell'endotelio e nelle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC, vascular smooth muscle cells) (Samson, 1999; Hinson et al., 2000).

ADM e PAMP circolano entrambi in quantità misurabili nel sangue dei mammiferi e le loro concentrazioni basali sono dell'ordine delle pM. Nell'uomo, i livelli ematici di ADM variano tra  $2 \times 10^{-12} \text{M}$  e  $4 \times 10^{-12} \text{M}$ . Tale concentrazione nel plasma può incrementare in seguito a numerose patologie, quali l'insufficienza cardiaca, l'infarto del miocardio, lo *shock* settico (Nussdorfer, 2001) e disordini endocrini e renali (Hinson et al., 2000). Tuttavia, anche in condizioni patologiche, la concentrazione plasmatica dei peptidi derivati da pADM non supera mai  $10^{-11} \text{M}$ , perciò essa rimane ben sotto la soglia per la maggior parte delle loro azioni biologiche fino ad ora note (circa da  $10^{-10} \text{M}$  a  $10^{-7} \text{M}$ ) (Nussdorfer et al., 1997; Samson, 1999; Hinson et al., 2000). Il gene di pADM e i siti di legame per i peptidi derivati da pADM sono espressi in tutti i tessuti dove essi esercitano i loro effetti modulatori ed è stato calcolato che le loro concentrazioni locali possono raggiungere facilmente  $10^{-7} \text{M}$  e  $10^{-8} \text{M}$  (Nussdorfer et al., 1997b). Per questo motivo, è comunemente accettato che i peptidi derivati da pADM agiscano come fattori locali autocrini o paracrini entro i tessuti e gli organi dove essi sono sintetizzati. L'emivita di ADM nel plasma è di 22 minuti e viene degradata inizialmente da metalloproteasi per generare ADM2-52, 27-52 e 28-52 (Lewis et al., 1997).

Le azioni biologiche principali di ADM riguardano i vasi sanguigni e l'omeostasi. ADM evoca una ipotensione dovuta alla diminuzione della resistenza vascolare. Il rilassamento vascolare è attribuito all'attivazione di recettori accoppiati a proteine G, il cui meccanismo di segnale coinvolge la stimolazione della cascata adenilato ciclasi (AC)/protein-chinasi A (PKA).

Il segnale del recettore di ADM può anche coinvolgere l'attivazione della via fosfolipasi C (PLC)/ PKC-dipendente e canali calcio voltaggio dipendenti, portando ad un aumento della concentrazione di Ca intracellulare. ADM può aumentare l'attività della NO-sintasi evocando la vasodilatazione attraverso la via NO/cGMP. Questo avviene con un doppio meccanismo: l'aumento della concentrazione del calcio intracellulare e l'attivazione delle NOS associate a proteine G (Samson, 1999; Hinson et al., 2000; Jougasaki et Burnett, 2000). Altri effetti periferici di ADM comprendono l'inibizione del rilascio di ACTH, la diminuzione del rilascio di arginina-vasopressina evocato dall' iperosmolalità, la modulazione della funzione utero-placentare-fetale che potrebbe essere associata all'azione di ADM sul tono

vascolare, la depressione dell'attività contrattile dell'utero, la regolazione della secrezione di insulina, la modulazione della funzione tubulare del rene, la stimolazione del rilascio di renina, la depressione della secrezione e della mobilità gastrica, l'inibizione della broncocostrizione indotta da istamina e acetilcolina e l'attività antimicrobica (Samson, 1999; Hinson et al., 2000; Nussdorfer, 2001).

Si sono accumulate evidenze che i peptidi derivati da pADM giocano ruoli importanti nella regolazione della proliferazione cellulare, della differenziazione e dell'apoptosi, attraverso la modulazione delle cascate delle proteine chinasi attivate dai mitogeni, MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) (Belloni et al., 2001). Sembra ben dimostrato che ADM favorisce il rimodellamento del sistema cardiovascolare, inibisce la crescita delle cellule mesangiali del glomerulo, aumenta la crescita della corticale della ghiandola adrenale, stimola la proliferazione delle cellule epiteliali e dei fibroblasti e agisce come promotore della crescita in parecchi tessuti neoplastici e linee cellulari. Inoltre si suppone che ADM e PAMP giochino entrambe ruoli regolatori durante l'embriogenesi. E' stato scoperto, infatti, che l'espressione del gene pADM raggiunge il massimo durante le fasi cruciali della crescita e differenziazione degli organi. ADM è coinvolta nei complessi meccanismi regolatori dello sviluppo dei mammiferi. Durante l'embriogenesi dei roditori, ADM è espressa all'inizio nel cuore e successivamente nei tessuti vascolari, neurali e in quelli che formano lo scheletro, come anche nei principali organi embrionali interni (Belloni et al., 2001) .

E' stato dimostrato che ADM gioca un ruolo critico nella divisione delle cellule tumorali e nella riduzione della morte cellulare programmata. E' stato documentato anche che una varietà di tumori neuronali ed epiteliali produce quantità abbondanti di ADM. Inoltre, Adrenomedullina e parecchi dei suoi recettori sono *up*-regolati durante l'ipossia. Studi sperimentali dimostrano che una sovraespressione di ADM porta ad un aumento della grandezza del tumore (Zudaire et al., 2003).

Cellule di Ishikawa (cellule di tumore dell'endometrio) trattate con ADM o transfettate e sovraesprimenti ADM mostrano un aumento nella resistenza alla apoptosi indotta dall'ipossia. Poiché queste cellule esprimono il recettore per ADM CRLR-RAMP2, la produzione e la secrezione di ADM possono stabilire un meccanismo autocrino/paracrino (Oehler et al., 2001). Withers e collaboratori hanno dimostrato che, in cellule Swiss 3T3, l'ADM stimola la proliferazione cellulare e questo effetto è incrementato dall'aggiunta di insulina. Questi effetti si attuano attraverso il legame dell'ADM a recettori specifici presenti sulle cellule Swiss 3T3, che porta ad un rapido aumento dei livelli di cAMP intracellulari, ma non a un aumento della concentrazione di calcio intracellulare, né all'attivazione della protein

chinasi C o alla fosforilazione di substrati tirosinici intracellulari (Withers et al., 1996).

Tuttavia Chini e collaboratori hanno osservato che *in vitro* l'ADM inibisce la proliferazione cellulare delle cellule mesangiali attraverso un aumento dei livelli di cAMP intracellulari e l'attivazione della protein chinasi A. Inoltre, si nota una minor attivazione della cascata MAPK attivata da PDGF (Platelet Derived Growth Factor, fattore di crescita derivante dalle piastrine) (Chini et al., 1995). Ricerche ulteriori sono richieste per stabilire in quali circostanze ADM è un fattore mitogeno o antimitogeno. Kato e collaboratori (1997) e Sata e collaboratori (2000) isolarono cellule endoteliali (EC) da arterie di ratto e dalla vena ombelicale umana. Attraverso indagini di tipo morfologico e biochimico, dimostrarono che l'aggiunta di ADM ai terreni di coltura inibiva l'apoptosi dovuta a deprivazione del siero, senza tuttavia indurre la proliferazione cellulare. Inoltre una sovraespressione di ADM è stata rilevata nei tumori al polmone (Ehlenz et al., 1997), nel tumore al tratto gastrointestinale (Ehlenz et al., 1997) e nell'adenoma ACTH-secrente (Murakami et al., 1998).

In Letteratura numerosi lavori indicano che questo peptide viene espresso da tutte le cellule terminali, sia della filiera mieloide che linfoide (Hojo et al., 2001; Kubo et al., 1998; Nakayama et al., 1999). Nakayama e collaboratori (1999) hanno analizzato la produzione e la secrezione di ADM in monociti e macrofagi, dimostrando che questo peptide viene espresso dai monociti del sangue periferico umano e dai macrofagi derivanti da monociti. Questi ultimi, inoltre, esprimono livelli di mRNA per ADM cinque volte superiori rispetto ai monociti. In entrambi i tipi cellulari, l'espressione di ADM può essere incrementata esponendo per 24 ore queste cellule a lipopolisaccaridi (LPS).

Inoltre, è stato dimostrato che la secrezione di ADM dalle cellule endoteliali (EC) e dalle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) di ratto viene stimolata dall'aggiunta di IL-1, TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ), LPS (lipopolisaccaridi) (Isumi et al., 1998; Sugo et al., 1995), Angiotensina II ed ET-1 (Chun et al., 2000; Sugo et al., 1995). L'effetto dello shear stress è controverso: sono stati descritti effetti inibitori (Shinoki et al., 1998) e stimolatori (Chun et al., 2000).

Il gruppo di Hojo ha, invece, investigato l'espressione dell'ADM indotta dall'interazione tra cellule endoteliali umane della vena del cordone ombelicale (HUVEC) e cellule THP-1 (una linea monocitica umana). Questi ricercatori osservarono che la co-coltura di cellule THP-1 con cellule HUVEC provocava in queste ultime, a 48 ore dalla semina, un aumento di 16 volte dell'espressione di ADM. Anche aggiungendo alle HUVEC frammenti di membrana delle cellule THP-1, si osservava un aumento dei livelli di ADM. In queste co-culture l'aggiunta di un

anticorpo anti-IL-1 e del recettore per IL-1 portavano a una diminuzione dell'espressione di ADM (Hojo et al., 2001).

Nel 1998 Kubo e collaboratori hanno dimostrato che l'ADM viene secreta da granulociti, linfociti, monociti e macrofagi isolati da sangue periferico. Dal momento che il CGRP inibisce la capacità delle cellule B primitive di rispondere all'effetto espansivo indotto dall'IL-7, Fernandez e collaboratori (2000) hanno analizzato, per mezzo del saggio clonogenico pre-B cell colony-forming assay, gli eventuali effetti esercitati dall'ADM sui precursori delle cellule B, evidenziando che tale peptide non inibisce l'espansione IL-7 dipendente.

## **6§. ENDOTELINA**

L'isolamento dell' endotelina-1 (ET-1) dalle cellule endoteliali dell'aorta del maiale (Yanagisawa et al., 1988) è stato la diretta conseguenza della scoperta da parte di Gillespie et al. (1986) che i surnatanti endoteliali possono esplicare una potente azione vasocostrittiva. Studi ulteriori hanno dimostrato l'esistenza, in aggiunta ad ET-1, di due altre endoteline, ET-2 ed ET-3, che differiscono da ET-1 di 2 e 6 aminoacidi rispettivamente (Inoue et al., 1989). La maggior parte dei tessuti contiene più ET-1 che ET-2 o ET-3, con i livelli più alti di ET-1 trovati nei polmoni.

L'ET-1 è considerata uno dei più potenti vasocostrittori conosciuti coinvolti nella patofisiologia di molti tumori umani (Levin, 1995; Masaki, 2000).

Le endoteline sono sintetizzate da precursori noti come preproendoteline (pp-ET), che contengono 212 aminoacidi. Il precursore subisce un taglio intermedio per formare le proendoteline di 38 aminoacidi non attive biologicamente, chiamate anche *big endothelins*. Gli enzimi che convertono l'endotelina (ECE) sono metalloendopeptidasi legate alla membrana. Nell'uomo si conoscono quattro isoforme (ECE-1a-1d) derivati da un singolo gene tramite l'attivazione di promotori alternativi. La forma matura di ET-1 è secreta direttamente nel flusso sanguigno e accumulata momentaneamente nel fegato e nei polmoni.

Le endoteline attive biologicamente sono peptidi di 21 aminoacidi ricchi in cisteina, caratterizzate da una singola  $\alpha$ -elica e due ponti disolfuro che uniscono cisteine nelle posizioni 1-15 e 3-11 nella metà N terminale, e un *cluster* di aminoacidi idrofobici alla fine della parte C terminale della struttura. La struttura del dominio N-terminale determina l'affinità per il recettore, mentre il dominio C-terminale contiene il sito di legame del peptide al recettore (Ortega Mateo et de Artinano, 1997).

ET-1 è secreta dalle cellule endoteliali (Yanagisawa et al., 1988; Matsumura et al., 1989), dalle cellule epiteliali (Mattoli et al., 1990; Giaid et al., 1991), dai macrofagi



alveolari (Ehrenreich et al., 1990), dalle cellule del muscololiscio (Resink et al., 1990), dai neuroni (Giaid et al., 1989), dai leucociti polimorfonucleati (Sessa et al., 1991) e dai fibroblasti (Gu et al., 1991); ET-2 è sintetizzato primariamente nell'intestino ed ET-3 nel cervello, nei polmoni e nell'intestino (Rubanyi et al., 1994). E' stata evidenziata una stretta correlazione tra la distribuzione tissutale di ADM e PAMP e quella delle endoteline, che permette di ipotizzare un'importante interazione tra questi peptidi vasoregolatori (Rubanyi et Polokoff 1994).

E' stato dimostrato che nel cervello e nel cuore esistono due diverse molecole di mRNA per preproET-1, che si differenziano a livello della regione non tradotta in 5' e questo porta a concludere che l'espressione di ET-1 è tessuto-specifica (Benatti et al., 1993). Il fattore fisiologico più potente nella regolazione della produzione di ET-1 e del rilascio dalle cellule endoteliali sembra essere il flusso sanguigno.

Approssimativamente l'80% della quantità di ET-1 sintetizzata è secreta a livello della porzione basolaterale delle cellule endoteliali verso le cellule muscolari lisce circostanti e l'*interstitium* dove agisce in modo paracrino e autocrino.

La concentrazione individuata nei tessuti vascolari è circa 100 volte più alta di quella nel plasma, con la maggior parte di ET-1 legata ai recettori e solo quantità esigue rimanenti in una forma libera.

La concentrazione plasmatica di ET-1 nell'adulto è normalmente compresa tra 0.4-8.1 pg/ml (Glowinska et al., 2004; Tomic et al., 2008). ET-1 ha una emivita di approssimativamente 4-7 minuti nel sangue, a causa del veloce legame ai tessuti e del metabolismo rapido da parte di un enzima specifico che degrada l'endotelina (Ortega-Mateo et De Artinano, 1997; Rubin and Levin, 1994).

Il rilascio di endoteline è regolato a livello di espressione genica e sintesi peptidica in quanto le cellule non immagazzinano le endoteline. L'espressione del gene è indotta da una varietà di fattori, compresi trombina, angiotensina II, adrenalina, citochine e fattori di crescita (Ortega-Mateo et de Artinano, 1997). *In vitro*, nelle cellule mesangiali umane, i livelli di mRNA codificanti per l'ET-1 possono essere modulati da molti fattori, quali il TGF, la trombina e un analogo della tramboxina A (Zoja et al., 1991). Nelle cellule endoteliali i livelli di trascrizione vengono incrementati con l'aggiunta di angiotensina II (ang II) (Yanagisawa et al., 1988; Emori et al., 1989, Teplyakov et al., 2004). Inoltre, PDGF-A, TGF, ang II, arginino-vasopressina e la stessa ET-1 stimolano, *in vitro*, la trascrizione di mRNA di preproET-1 nelle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) (Hahn et al., 1990). Meglio conosciuti sono gli inibitori della sintesi di ET-1 che includono le prostaciline, l'ossido nitrico (NO), il peptide natriuretico atriale (Nelson et al., 2003), eparina, prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) e PGI<sub>2</sub> (Wagner et al., 2004).

Sono stati clonati due recettori specifici per l'endotelina nell'uomo: uno, ET<sub>A</sub>, selettivo per le isoforme ET-1 e ET-2 (Arai et al., 1990) e l'altro, ET<sub>B</sub>, non selettivo per l'isoforma (Sakurai et al., 1990). L'omologia tra questi due recettori è del 60% ed entrambi hanno due sottotipi. L'affinità dei tre isopeptidi per il recettore ET può essere descritta come ET-1>ET-2>ET-3. Nell'uomo, l'affinità di ET-1 per questo recettore è 1.000 volte più alta in confronto a quella di ET-3 (Hosoda et al., 1991). Entrambi i recettori sono associati con la vasocostrizione quando sono localizzati sulle cellule muscolari lisce, mentre ET<sub>A</sub> media la vasodilatazione quando è localizzato sull'endotelio. Un terzo recettore ET<sub>C</sub> è stato isolato in *Xenopus laevis* ed ha l'affinità più alta per ET-3 (Karne et al., 1993; Teder et Noble, 2000).

La caratteristica principale dell'endotelina-1 consiste in una potente azione vasocostrittrice, ma in aggiunta a tale azione, ET-1 esercita molti effetti, compresi la stimolazione della mitogenesi e dell'espressione dei proto-oncogeni e la regolazione di parecchi sistemi ormonali.

Di questi effetti, alcuni, compresi l'inibizione della secrezione di renina e la stimolazione di secrezione di catecolamine, peptide natriuretico atriale, vasopressina e aldosterone (Rubanyi et Polokoff, 1994), sono importanti per la regolazione della pressione sanguigna e possono contribuire all'ipertensione arteriosa e alle malattie cardiovascolari connesse. Nelle colture di cellule mesangiali di ratto, basse concentrazioni di questo peptide esercitano un'azione mitogena presumibilmente attraverso l'attivazione della fosfolipasi C e l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare. Inoltre, attivando lo scambio Na/H e provocando l'alcalinizzazione del citosol, ET-1 induce l'attivazione del proto-oncogene c-fos (Simonson et al., 1989).

Nelle cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) di ratto l'ET-1 provoca l'entrata del calcio nella cellula, agendo su un canale situato nella membrana cellulare, induce la sintesi di DNA e stimola la rapida e transiente espressione del mRNA per i proto-oncogeni c-myc e c-fos (Komuro et al., 1988). Inoltre, l'ET-1 agisce come un potente fattore mitogeno sui fibroblasti Swiss 3T3, legandosi a uno specifico recettore che traduce il segnale attraverso la via dei secondi messaggeri inositolici: questo provoca un innalzamento dei livelli di calcio intracellulari, la fosforilazione della protein chinasi C e la transiente attivazione di c-fos e c-myc (Takuwa et al., 1989).

E' stato dimostrato che ET-1 ha attività mitogena per le cellule muscolari lisce, i monociti e i fibroblasti. Studi *in vitro* sostengono un ruolo di ET-1 come fattore che promuove la crescita per le cellule muscolari lisce bronchiali (Glassberg et al., 1994). ET-1 può agire in sinergia con il fattore di crescita derivato dalle piastrine, il fattore di crescita epidermico, il fattore di crescita dei fibroblasti fondamentale,

TGF- $\beta$ , insulina e altri per potenziare la trasformazione cellulare o la replicazione. ET-1 ed ET-2 sono equipotenti nella promozione della sintesi di DNA, mentre ET-3 è meno attivo (Battistini et al., 1993; Teder et Noble, 2000). E' stato osservato che ET-1 è in grado di sostenere *in vitro* la proliferazione di melanociti umani e che questo effetto induttivo di ET-1 è sinergizzato dallo *stem cell factor* (SCF), attraverso un comune meccanismo di legame ai rispettivi recettori (Imokawa et al., 2000).

ET-1 è considerata una delle sostanze cardiotoniche più potenti (Ishikawa et al., 1988a; Ishikawa et al., 1988b) poiché induce effetti inotropici e cronotropici positivi, agendo su canali per il calcio voltaggio-dipendenti. ET-1 provoca ipertrofia delle cellule di miocardio di ratto, nelle cellule ventricolari induce l'espressione e il rilascio del peptide natriuretico atriale (ANP) e può attivare la trascrizione di geni cardio-specifici. Queste osservazioni permettono di ipotizzare che la stimolazione ET-1 dipendente costituisca un meccanismo paracrino per la regolazione *in vivo* della crescita e dell'ipertrofia delle cellule cardiache (Fukuda et al., 1988; Shubeita et al., 1990). Nei ratti un'infusione prolungata di ET-1 conduce a un'ipertrofia notevole della zona glomerulosa (ZG) della ghiandola adrenale ed ET-1 stimola l'attività mitotica in questa zona (Nussdorfer et al., 1997). Poiché il recettore del sottotipo di ET<sub>A</sub> media la risposta della crescita in tipi cellulari diversi (Battistini et al., 1993), è stata ipotizzata una implicazione di questo sottotipo di recettore nella crescita della adrenocorticale. Questa ipotesi è stata confermata e si è dimostrato che ET<sub>A</sub> è il sottotipo che media la sintesi di DNA e la risposta proliferativa delle cellule nella zona glomerulosa. L'inibitore della proteinchinasi C e l'inibitore della tirosinchinasi sono entrambi capaci, secondo la concentrazione, di diminuire l'aumento dell'incorporazione di [3H]timidina indotta da ET-1, indicando il coinvolgimento di entrambe le vie della PKC e della TK in quest'effetto (Mazzocchi et al., 1997).

E' concepibile postulare che il bilancio tra il grado di attivazione dei recettori ET<sub>A</sub> vs ET<sub>B</sub> nella corteccia adrenale sia cruciale nel determinare se avviene un cambiamento da un fenotipo secretorio ad uno proliferante, e da ciò se la risposta ad ET-1 sia un aumento nella secrezione di aldosterone o un effetto ipertrofico/iperplastico. La zona glomerulosa è considerata come lo strato di cambio coinvolto nel rinnovamento cellulare della adrenocorticale ed è la regione dell'adrenocorticale più abbondante di recettori ET<sub>A</sub> (Rossi et al., 2000).

L'asse endotelinico, costituito da ET-1 e i suoi recettori, è stato indagato in diversi tipi di tumori solidi, dimostrandone un suo forte coinvolgimento nella progressione della malattia. In particolare: nel carcinoma dell'ovaio (Bagnato et al., 2005; Donninger et al., 2004; Jazaeri et al., 2005; Rosanò et al., 2003 e 2007); nel

carcinoma della prostata (Kopetz et al., 2002; Carducci and Jimeno 2006; James et al., 2007); nel carcinoma della cervice (Venuti et al., 2000; Bagnato et al., 2002); nel tumore al seno (Smollich et al., 2007; Smollich and Wulfing, 2007; Hagemann et al., 2005); nel sarcoma di Kaposi (Bagnato et al., 2001; Rosanò et al., 2003); nel carcinoma nasofaringeo (Mai et al., 2006); nel melanoma (Bittner et al., 2000; Demunter et al., 2001; Lahav et al., 1999); nel tumore al polmone (Arun et al., 2004; Ahmed et al., 2000; Boldrini et al., 2005; Carpagnano et al., 2004); nel tumore alla vescica (Titus et al., 2005); nel neuroblastoma (Fisk et al., 2006; Berry and Burchill, 2002; nell'osteosarcoma (Felx et al., 2006); nel tumore all'endometrio (Economos et al., 1992; Arun et al., 2001) e nel tumore al colon (Egidyet et al., 2000; Hoosein et al., 2007; Kim et al., 2005).

## **7§. EPIDERMAL GROWTH FACTOR**

Nel 1962 Cohen riportò l'isolamento del polipeptide chiamato fattore di crescita dell'epidermide (EGF *Epidermal Growth Factor*) dalla ghiandola sottomassillare del topo. Questo fattore di crescita è stato individuato successivamente come il responsabile della proliferazione e della cheratinizzazione dell'epidermide nel topo *in vivo* (Cohen et al., 1963) e la crescita dell'epidermide embrionale nel pollo *in vitro* (Cohen, 1965).

Come fattore di crescita svolge un ruolo importante nel regolare la crescita, la proliferazione e la differenziazione cellulare legandosi con alta affinità al recettore del fattore di crescita dell'epidermide (EGF-R). Il legame avviene a livello della membrana cellulare e stimola l'attività tirosin chinasi intrinseca del recettore.

Inoltre agisce da segnale induttivo nello sviluppo embrionale e modula la sintesi di un diverso numero di ormoni, come la secrezione della prolattina da parte dei tumori pituitari o della gonadotropina corionica da parte delle cellule del carcinoma del chorion. Nel sistema nervoso centrale l'EGF influenza l'attività di alcuni tipi di neuroni dopaminergici e GABAergici.

EGF è un singolo polipeptide di 53 residui aminoacidici sintetizzato prima in forma immatura prepro-EGF di 1200 residui (Gray et al., 1983; Scott et al., 1983). La sequenza di questo precursore include non solo la sequenza di EGF ma anche otto unità EGF-simili e, vicino al terminale carbossilico, una sequenza idrofoba caratteristica di proteine di membrana integrali. Studi successivi con cellule trasfettate hanno dimostrato che prepro-EGF può esistere come proteina di membrana glicosilata (Mroczkowski et al., 1989).

Con il progredire della caratterizzazione biologica delle neoplasie, i diversi compartimenti e le diverse funzioni della cellula tumorale sono diventati il bersaglio

di terapie sempre più specifiche (Artega et al., 2003). Lo studio di alcuni aspetti della biologia tumorale (fattori di crescita e segnali di trasduzione, invasività e angiogenesi, apoptosi, ciclo cellulare, sistemi di controllo della fedeltà di replicazione del DNA) ha fornito nuove indicazioni per l'ideazione di farmaci che interferiscono direttamente con eventi chiave della cellula neoplastica (Baselga, 2000).

La mancanza di specificità d'azione dei chemioterapici è causa della loro considerevole tossicità (mielosoppressione, mucosite, alopecia, astenia, alterazioni delle funzioni cardiache, neurologiche, renali e gastroenteriche) la quale non sempre è controbilanciata da una soddisfacente remissione della malattia neoplastica. Per questo, negli ultimi anni si è cercato di sviluppare terapie antitumorali mirate, piuttosto che ottimizzare le terapie con i convenzionali chemioterapici (Siegel-Lakhai et al., 2005).

Un ideale bersaglio molecolare deve presentare diversità espressive o funzionali nelle cellule tumorali rispetto a quelle sane e alcune tirosin-chinasi sono un *target* ideale. Nelle cellule sane, infatti, l'attivazione delle tirosin-chinasi è ben controllata, ma nelle cellule tumorali le vie che traducono il segnale sono disregolate, aumentando eccessivamente il segnale di proliferazione cellulare (Slamon et al., 1987).

Il recettore dell'EGF (*Epidermal Growth Factor Receptor*, EGFR, HER1 o ERB1) fa parte della classe HER o ERB dei recettori dei fattori di crescita della tirosin-chinasi (TK), alla quale appartengono anche HER2, HER3 e HER4, tutti importanti mediatori dei processi di crescita, differenziazione e sopravvivenza cellulare.

L'EGFR e i suoi ligandi, l'Epidermal Growth Factor (EGF) e lo Transforming Growth Factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) sono tra i primi membri della famiglia dei recettori dei fattori di crescita della tirosin-chinasi ad essere stati caratterizzati (Plowman et al., 1993).

L'EGFR è una glicoproteina di membrana ed è costituita da un dominio extracellulare N-terminale dove è presente il sito di legame per i fattori di crescita, una regione transmembrana e un dominio citoplasmatico C-terminale con attività tirosin-chinasica. In questa regione intracellulare ci sono i siti di legame per l'ATP (Stamos et al., 2002). L'interazione del recettore con i suoi ligandi conduce alla omodimerizzazione con altri EGFR o alla eterodimerizzazione con altri recettori della famiglia degli EGFR con conseguente fosforilazione del dominio intracellulare tirosin-chinasico, solo successivamente il recettore è in grado di fosforilare le proteine di trasduzione del segnale (Salomon et al., 1995).

L'attivazione del recettore e la conseguente autofosforilazione può, quindi, avvenire mediante l'interazione con i specifici ligandi e mediante omo ed etero dimerizzazione con altri recettori. Una sovra-espressione del recettore, spesso associata ad una amplificazione genica codificante per il recettore, o una eccessiva produzione e disponibilità di ligandi per il recettore, comporta un aumento del segnale dell'EGFR con conseguente aumento della proliferazione, angiogenesi, metastasi e inibizione dell'apoptosi (Slamon et al., 1987).

Molteplici studi hanno evidenziato che un aumento del livello di espressione dell'EGFR si correla con una progressione della malattia, una minor sopravvivenza, una scarsa risposta alla terapia e allo sviluppo di resistenza verso i farmaci citotossici (Arteaga, 2003; Veale et al., 1993). Diversi studi *in vitro* e *in vivo* hanno dimostrato che l'interruzione del segnale dell'EGFR comporta una inibizione della proliferazione delle cellule tumorali e/o della vitalità (Woodburn et al., 1999).

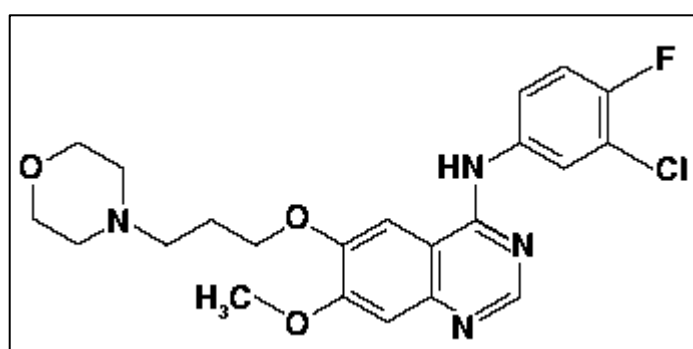
Basandosi sulla struttura e sulla funzione del recettore EGFR sono state sviluppate due differenti strategie terapeutiche. La prima si basa sull'impiego di anticorpi monoclonali (come ad esempio cetuximab) in grado di legarsi in modo specifico alla componente extracellulare del recettore. Questi anticorpi competono con il TGF- $\alpha$ , l'EGF e altri ligandi naturali prevenendo l'autofosforilazione della regione intracellulare (Baselga, 2000). La seconda strategia invece è rivolta ad inibire l'attività intracellulare della tirosin-chinasi. I più importanti farmaci antitumorali sviluppati per inibire la tirosin-chinasi sono Erlotinib (Tarceva<sup>®</sup>; OSI Pharmaceuticals) e il Gefitinib (Iressa<sup>®</sup>; AstraZeneca Pharmaceuticaks). Il meccanismo d'azione del Gefitinib non è ancora stato completamente definito. La sua piccola struttura molecolare è in grado di interferire con il sito di legame dell'ATP nella regione intracellulare del recettore. Il Gefitinib viene spesso definito come inibitore "specifico" o "selettivo" dell'EGFR, ma alcuni studi hanno dimostrato la capacità del composto di inibire l'attività di altri tipi di recettori tirosin-chinasici con concentrazione simile a quella con cui inibisce l'EGFR (Barker et al., 2001).

Il proto-oncogene *erb-B* codifica per EGF-R e quando EGF si lega al dominio extracellulare del recettore, il dominio intracellulare genera un segnale che trasmette uno stimolo all'interno della cellula. Una mutazione in c-erbB può trasformarlo in un oncogene attraverso una delezione del dominio extracellulare che si lega all'EGF, così che il segnale di stimolo intracellulare viene prodotto in modo costante anche se non è presente EGF.

## 8§. GEFITINIB

Gefitinib (Iressa®; Astra Zeneca Pharmaceuticaks, Wilmington, DE) fa parte di un nuovo gruppo di farmaci anti-tumorali conosciuti come gli inibitori dell'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) ed è stato approvato nel luglio del 2002 dal Ministero giapponese della Sanità, del Lavoro e del Welfare per la cura del carcinoma polmonare a grandi cellule (non-small cell lung cancer, NSCLC) in fase locale avanzata, metastatica, ricorrente o inoperabile.

Il gefitinib è un derivato sintetico dell'anilinochinazolina con il nome chimico di 4-quinazolinammine,N-(3-chloro-4-fluorophenyl)-7-methoxy-6-[3-(4-morpholinyl)propoxy].



**Fig. 10:** Struttura del Gefitinib

Il Gefitinib si presenta come una polvere di color bianco, con un  $pK_a$  di 5.4 e 7.2, quindi si ionizza progressivamente in soluzioni a pH inferiori. E' parzialmente solubile in acqua a pH 1 ed è praticamente insolubile a pH uguale o superiore a 7, per valori intermedi presenta una solubilità *dropping sharply*. In solventi non acquosi, Gefitinib è molto solubile in acido acetico glaciale e dimetilsolfossido, solubile in piridina, poco solubile in tetraidrofurano e scarsamente solubile in metanolo, etanolo (99,5%), acetato etilico, propanolo e acetonitrile.

Questo composto contiene tutti gli elementi necessari per esplicare un elevato potere inibente enzimatico: un sostituente elettron-donatore in posizione 6- e 7- della chinazolina, un piccolo sostituente lipofilo in posizione meta dell'anilina; un gruppo amminico libero in posizione 4- e gruppi CH liberi nelle posizioni 2-, 5- e 8-. Iressa® è disponibile in pastiglie da 250mg da assumere una volta al giorno. Dopo una singola somministrazione orale in un paziente oncologico, il picco di concentrazione plasmatica è raggiunto entro 3-7 ore. L'assorbimento del farmaco avviene lentamente con una biodisponibilità assoluta del 60% che non viene significativamente modificata dalla presenza di cibo, il tempo di emivita è di circa 48 ore. Lo *steady-state* nel plasma viene raggiunto dopo 10 giorni di somministrazione orale e risulta essere doppio rispetto a quello raggiunto da una

singola somministrazione. L'enzima citocromo P450, CYP3A4, è il maggior responsabile del metabolismo del Gefitinib: le principali reazioni metaboliche comprendono la *orto*-demetilazione, dealchilazione e la defluorurazione ossidativa. Il metabolita principale identificato nel plasma è *O*-desmethyl Gefitinib che ha un potere inibente della tirosin-chinasi 14 volte inferiore rispetto al Gefitinib. Il Gefitinib ha un'alta affinità di legame con le proteine plasmatiche (90%), soprattutto con albumina e con la glicoproteina  $\alpha$ . (Cohen et al., 2004).

Gli studi clinici in fase I sono stati condotti con pazienti che presentavano diverse tipologie di tumori solidi, tra cui il carcinoma del polmone, con lo scopo di determinare la dose giornaliera di farmaco da somministrare per avere concentrazioni plasmatiche tali da garantire un'attività antitumorale clinicamente significativa. Vennero stabilite due concentrazioni: 250 mg/die e 500 mg/die. La prima è la dose più bassa che induce una regressione tumorale significativa, la seconda è la dose più alta ben tollerata dai pazienti in una terapia cronica. I più frequenti effetti collaterali osservati, diarrea ed eruzione cutanea, erano dose dipendente.

Con queste due concentrazioni in fase II sono stati svolti due studi randomizzati su pazienti affetti da cancro del polmone (IDEAL-1 e IDEAL-2 Iressa Dose Evaluation in Advance Lung cancer). Nel primo "trial" i pazienti avevano ricevuto precedentemente uno o due regimi chemioterapici, mentre nel secondo i pazienti avevano ricevuto due o più regimi chemioterapici (Fukuoka et al., 2003; Kris et al., 2003). I risultati degli studi sono riassunti in Tabella V (Fukuoka et al., 2003; Kris et al., 2003; Pao et al., 2004). In ciascun studio la risposta dei gruppi trattati con 500 mg/die era simile a quella dei gruppi trattati con 250 mg/die (Fukuoka et al., 2003). Una risposta obiettiva del tumore con 250 mg/die di gefitinib si osservava nel 18% dei pazienti nell'IDEAL-1 e nel 12% nell'IDEAL-2, il miglioramento dei sintomi per i pazienti trattati si aggira per entrambi gli studi attorno a un 40%. Il dosaggio di 250 mg/die è risultato essere quello con un indice terapeutico più favorevole, poiché il trattamento con 500mg/die comportava un aumento degli effetti collaterali senza significativi benefici. Tali studi hanno quindi evidenziato l'efficacia del Gefitinib in pazienti con NSCLC che non avevano avuto risposte positive con la chemioterapia con agenti derivati del platino. (Fukuoka et al., 2003)



Variabili	Gefitinib IDEAL-1 (n=210)		Gefitinib IDEAL-2 (n=216)	
	250 mg/die	500 mg/die	250 mg/die	500 mg/die
Pazienti n.	104	106	102	114
Risposta obiettiva %	18.4	19.0	11.8	8.8
Percentuali di controllo della malattia (risposta obiettiva e stabilizzata della malattia)	54.4	51.4	42	36
Mediana della sopravvivenza, mesi	7.6	8	7	6
Sopravvivenza a 1 anno %	3	3	27	24
Miglioramento dei sintomi, %	40	37	43	35

**Tab. V:** Efficacia della monoterapia con gefitinib negli studi IDEAL di fase I

Gefitinib è un farmaco ben tollerato, gli effetti collaterali più comuni sono dermatologici (rash acneiforme e pelle secca) e gastrointestinali (diarrea, associata a volte a disidratazione). Non c'è evidenza che la tossicità da Gefitinib sia cumulativa con cicli successivi di trattamento. Effetti collaterali meno frequenti riguardano: disturbi della vista, aumento della pressione con cefalea, vertigini, confusione mentale e mancanza del respiro (Ranson et al., 2002). Dopo l'introduzione sul mercato in Giappone è emerso che l'interstiziopatia polmonare (ILD) rappresenta una complicazione rara ma molto grave legata all'uso del Gefitinib. La percentuale di comparsa di questa patologia in associazione con il Gefitinib è di circa l'1% e la mortalità è inferiore allo 0.3% (Ochs et al., 2004). Negli studi di fase III (INTACT) che confrontavano la chemioterapia *standard* associata o meno al Gefitinib, la percentuale di ILD non era significativamente diversa rispetto al placebo (Giaccone et al., 2004; Johnson et al., 2002). È stato anche notato che il trattamento standard delle neoplasie polmonari con chemioterapia o radioterapia è associato ad una incidenza di ILD di circa l'1% (Giaccone et al., 2004). L'ILD dovrebbe sempre essere presa in considerazione in ogni paziente trattato per il cancro del polmone con insorgenza improvvisa o peggioramento della dispnea non spiegabile altrimenti o nuovi infiltrati alla radiografia e i trattamenti con chemioterapici, incluso il Gefitinib, dovrebbero essere sospesi, mentre si prendono i provvedimenti necessari per la gestione della complicanza (Silvestri e Rivera, 2005).

Recentemente Stegmaier et Al. (2005) hanno cercato di individuare all'interno di una libreria selezionata, molecole in grado di promuovere il *pattern* d'espressione

genica che si associa a differenziazione mieloide. Tra gli agenti identificati essi riportano DAPH1 (4,5 dianilinophthalimide), un inibitore dell'EGFR del quale non è riconosciuto l'uso clinico. Analogo inibitore il cui impiego terapeutico è, invece, approvato è Gefitinib: Stegmaier e colleghi hanno dimostrato differenziazione mieloide e inibizione della proliferazione su blasti di leucemia acuta mieloide di linea (HL60, Kasumi-1, U937) ed *ex vivo* dopo esposizione a concentrazioni di Gefitinib considerate terapeutiche nel trattamento di neoplasie solide (1-10  $\mu$ M).

L'attività *in vitro* di Gefitinib è stata studiata in vari tumori solidi (mammella, ovaio, colon, rene e polmone) e in diverse neoplasie ematologiche (leucemia linfoblastica acuta, leucemia mieloide acuta, leucemia linfatica cronica, leucemia mieloide cronica, linfoma Non Hodgkin): tra tutti, Gefitinib ha mostrato la maggior attività citotossica su blasti di leucemia acuta mieloide.

La citotossicità osservata *in vitro* sembra dovuta ad induzione dell'apoptosi mediata, almeno in parte, dall'attivazione della caspasi-3/7: l'inibizione farmacologica della caspasi-3/7 è infatti in grado di abolire parzialmente la morte cellulare programmata indotta dal gefitinib (Lindhagen et al., 2008).

L'effetto pro-apoptotico su blasti LMA di linea (KG-1) è stato riconosciuto anche per Erlotinib, molecola appartenete, come il Gefitinib, agli inibitori dell'EGFR. Erlotinib sembra inoltre indurre differenziazione cellulare su linee di blasti derivanti da sindrome mielodisplastica ad alto rischio (P39) (Boehrer et al. 2008 a).

Dati emersi da singole esperienze con ciascuno dei due farmaci sono stati messi a confronto in uno studio comparativo (Boehrer et al. 2008 a): apoptosi e differenziazione possono essere indotte su blasti *ex vivo* e su linee cellulari di LMA (KG-1 e HL60) e sindrome mielodisplastica (P39) tanto da Gefitinib quanto da Erlotinib pur mostrando quest'ultimo una maggiore efficacia d'azione.

Nei blasti *ex-vivo* la capacità di Erlotinib di indurre apoptosi è equivalente a quella di Gefitinib: esiste invece una diversa efficacia d'azione su linee cellulari a favore di Erlotinib. Inoltre cellule di pazienti che rispondono a uno dei due agenti, rispondono anche all'altro così come tra i due farmaci è stata documentata *cross-resistenza*.

Ne deriva che Erlotinib e Gefitinib agiscono sullo stesso *target* molecolare con possibile impatto clinico su LMA e mielodisplasia ad alto rischio (Boehrer et al. 2008 b).

In quest'ottica l'effetto di Gefitinib è stato studiato anche in combinazione con i più comuni agenti chemioterapici utilizzati nella terapia di prima linea della leucemia acuta mieloide, Citosina Arabinoside, antracicline (Doxorubicina) ed Etoposide. Tutti i farmaci sono stati testati in singola associazione o in combinazione simultanea o sequenziale con Gefitinib. L'effetto dimostrato è stato sinergico (Etoposide) o

additivo (Citarabina e Doxorubicina), indipendentemente dalla sequenza di somministrazione (Lindhagen et al., 2008).

E' stato osservato come Gefitinib sia in grado di promuovere drammaticamente la differenziazione ATRA-indotta su linee cellulari HL60, NB-4 e U937. Lo stesso effetto si verifica anche quando Gefitinib viene introdotto in terapia 24 ore dopo l'inizio del trattamento con ATRA e ciò suggerisce come sia importante anche l'inibizione di segnali chinasi-dipendenti che intervengono in un secondo momento (Miranda et al., 2008).

L'azione dimostrata per Gefitinib nelle leucemie acute mieloidi potrebbe ragionevolmente indurre a credere che l'inibizione dell'EGFR rivesta un ruolo importante nel processo di differenziazione mieloide: tuttavia blasti LMA non esprimono EGFR, né in termini di trascritto, né conseguentemente di proteina (Stegmaier et al., 2005; Lindhagen et al., 2008; Boehrer et al. 2008 a; Boehrer et al. 2008 b). Pertanto molto verosimilmente non è l'EGFR il *target* del Gefitinib nelle malattie mieloproliferative acute. Del resto diverse evidenze sostengono la capacità di gefitinib di inibire a concentrazioni micromolari svariate chinasi cellulari (Miranda et al., 2008): Stegmaier et al. (2005) hanno dimostrato la capacità di legame del Gefitinib con almeno 18 protein-chinasi. Lo stesso hanno dimostrato Brehmer et al. (2005) arrivando a identificare 20 possibili *targets* tirosin-chinasi non-EGFR di Gefitinib.

L'identità del reale bersaglio rimane al momento sconosciuta: è chiaro che la sua identificazione potrebbe offrire un significativo contributo per lo sviluppo di approcci terapeutici sempre più specifici e potrebbe altresì permettere la selezione di pazienti in grado di trarne reale beneficio.

## **9§. C/EBPA**

La cooperazione tra varie molecole sembra essere il maggior determinante della granulopoiesi, con una serie di fattori di trascrizione che regolano il processo di differenziazione cellulare (Ward et al., 2000). Si distinguono fattori di trascrizione coinvolti in tutte le linee maturative, SCL e AML1, e fattori di trascrizione lineage-specifici: GATA1, PU.1, C/EBP $\alpha$  (CCAAT/enhancer binding protein alpha). La funzione dei primi è cruciale per la formazione del pool HSC e quindi per lo sviluppo delle cellule emopoietiche a partire dal mesoderma: una loro regolazione aberrante comporta alterazioni nella normale maturazione di tutte le cellule del sangue. La variazione nell'espressione di fattori GATA1, PU.1, C/EBP $\alpha$  risulta dannosa per una specifica (Rosenbauer et al., 2007; Tenen et al., 2003; Bjerregaard et al., 2003; Siegel-Lakhai et al., 2005).

Transcription factor	Site of expression	Haematopoietic phenotype in knockout mice and conditional knockout mice
RUNX1	Haematopoietic cells, nervous tissue, skeletal muscle, reproductive tissue	Knockout: lack of all definitive haematopoiesis Conditional knockout: impaired megakaryocytic maturation, defective B-cell and T-cell development, myeloid proliferation
SCL	Haematopoietic cells ('haemangioblasts', HSCs, multipotential progenitors, erythrocytes, megakaryocytes and mast cells), endothelial cells, brain tissue	Knockout: complete absence of yolk sac haematopoiesis, lack of angiogenesis Conditional knockout: decreased erythrocytes and megakaryocytes, impaired ST-HSCs, normal LT-HSCs
PU.1	Haematopoietic cells (HSCs, CMPs, CLPs, GMPs, monocytes, granulocytes and B cells)	Knockout: lack of mature myeloid cells and B cells Conditional knockout: block prior to CMP and CLP stages, increased granulopoiesis, defective HSCs
C/EBP $\alpha$	Haematopoietic cells (HSCs, CMPs, GMPs and granulocytes), liver, adipose tissue	Knockout: lack of GMPs and granulocytes, impaired monocytes, increased immature myeloid cells Conditional knockout: same as knockout mice, plus increased HSC self-renewal
IRF8	Haematopoietic cells (B cells, macrophages, dendritic cells and stimulated T cells)	Knockout: increased susceptibility to viral infections, increased granulocytic cells, CML-like disease
GFI1	Sensory epithelial cells in the inner ear, neuroendocrine cells of the lungs, neutrophils, B and T cells, HSCs	Knockout: reduction in earliest lymphoid progenitors, complete block in late neutrophil maturation, defective HSCs
C/EBP $\epsilon$	Preferentially in myeloid and lymphoid cells	Knockout: abnormal late neutrophil maturation, block in eosinophil development, defective macrophage function

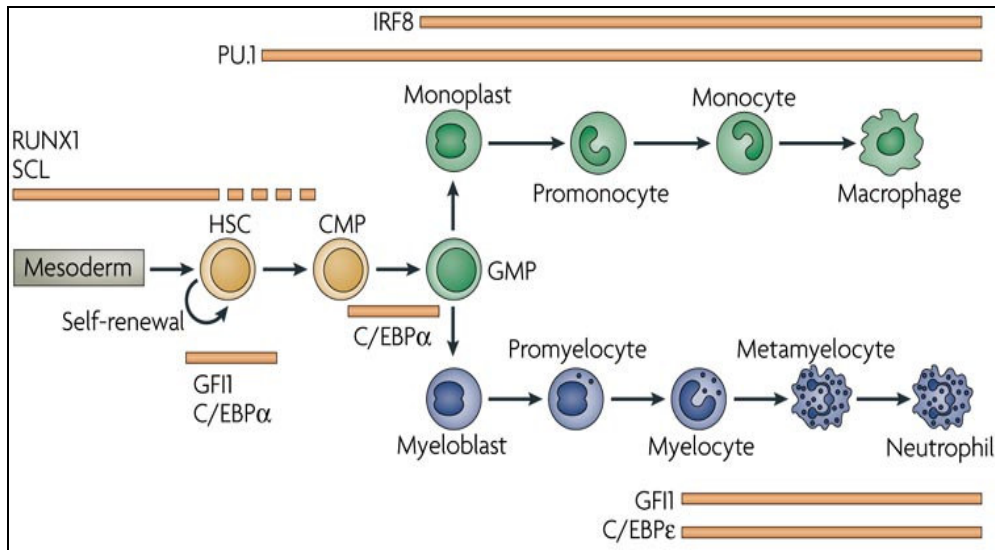
**Tab. VI:** Fenotipo di topi *knockout* per fattori di trascrizione lineage-specifici implicati nella mielopoiesi. (Rosenbauer F and Tenen DG. Nature Reviews 2007)

C/EBP $\alpha$  è importante per il *commitment* e lo sviluppo emopoietico in senso granulocitario: è una proteina appartenente alla famiglia dei fattori di trascrizione bzip (basic leucine zipper protein), che forma omodimeri o eterodimeri con altre proteine C/EBP, attivando la trascrizione di geni *target* (G-CSF receptor, mieloperossidasi) (Tenen et al., 1997). Consiste di un dominio C-terminale altamente conservato che lega il DNA, caratterizzato da una cerniera di leucine che consentono la dimerizzazione e due domini di transattivazione N-terminali meno conservati. Esiste in due isoforme, p42 e p30 e il suo gene mappa sul cromosoma 19q13.1 (Frohling et al., 2004; Smith et al., 2004; Ho PA et al., 2009).

Il trascritto primario del gene C/EBPA codifica per una CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP $\alpha$ ), fattore di trascrizione di 358 aminoacidi, proteina di 42kd. Un trascritto alternativo più corto viene generato quando il codone AUG nella posizione 120 viene utilizzato come sito alternativo di start. Questo trascritto codifica per una proteina di 30 kd che perde il primo dominio di transattivazione, mentre la parte C-terminale è intatta (Pabst and Mueller, 2007; Pabst et al., 2009).

E' stato isolato per la prima volta nel fegato e nel tessuto adiposo e successivamente è stato ritrovato anche a livello di cellule mieloidi immature, mielomonocitiche, mentre risulta assente in cellule eritroidi e linfoidi B e T. La funzione di questa proteina sembra essere quella di bilanciare la proliferazione e la differenziazione cellulare: diversi studi confermano che agisce in generale come inibitore del ciclo cellulare e oncosoppressore. Il membro più abbondante della famiglia è C/EBP $\alpha$  ma ne sono state identificate altre isoforme: C/EBP $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  e  $\zeta$ . Le isoforme  $\beta$ ,  $\delta$  e  $\zeta$  sono maggiormente espresse negli stadi più differenziati, mentre i

massimi livelli di C/EBP $\epsilon$  mRNA sono rilevabili negli stadi di mielocita e metamielocita (Ward et al., 2000; Zhang et al., 2002; Bjerregaard et al., 2003; Tenen et al., 1997).



**Fig. 11:** Ordine gerarchico dei fattori di trascrizione durante lo sviluppo mieloidi: mentre C/EBP $\alpha$  è necessario per la transizione da HSC a CMP e di qui a GMP, C/EBP $\epsilon$  ha un ruolo cruciale nella fase finale della differenziazione neutrofila (Rosenbauer F and Tenen DG. Nature Review 2007).

C/EBP $\alpha$  è espresso in grande quantità nelle cellule mieloblastiche e promielocitiche e viene progressivamente sotto regolato nel corso della maturazione mieloidi: viene attivato durante il *commitment* del precursore multipotente in senso mieloidi. L'espressione è invece ridotta durante la differenziazione megacariocitaria ed eritroide ed abolita del tutto in quella linfoidi (Schepers et al., 2007).

E' stato suggerito un duplice ruolo di C/EBP $\alpha$ : *precoce*, nel favorire la differenziazione granulocitaria su quella monocitica, *tardivo*, nell'esibire un effetto antiproliferativo su granulociti maturi (Radomska et al., 1998).

Topi *knockout* per C/EBP $\alpha$  non producono neutrofili maturi e mostrano un accumulo di mieloblasti nel sangue periferico e nel midollo: questo suggerisce un suo ruolo regolatorio nella granulopoiesi. Conservano però la capacità di produrre monociti e linfociti (Ward et al., 2000; Cammenga et al., 2003; Tavor et al., 2003).

C/EBP $\alpha$  può interagire con numerosi fattori di trascrizione, per esempio AML1, Rb, NF-kB e PU.1, oltre che per i membri della stessa famiglia. Molti geni che presiedono alla regolazione del ciclo cellulare sono sotto lo stretto controllo di C/EBP $\alpha$ : come la Ciclina D1, Ciclina D2, E2F, CDK2/CDK4 (cycline-dependent kinase

2/4), p21 e p57 (cell cycle-dependent kinase inhibitors) (Rosenbauer et al., 2007; Schepers et al., 2007).

Inoltre è implicato anche nel *self-renewal* del *pool* staminale ematopoietico: modelli murini C/EBP $\alpha$ -null presentano precursori ematopoietici dalle alte potenzialità di *self-renewal* che concorrono all'accumulo di blasti mieloidi nel midollo.

E' sufficiente a inibire sia la proliferazione (inducendo maturazione terminale) che la potenzialità autoreplicativa della cellula staminale leucemica: in condizioni fisiologiche l'*over*-espressione di C/EBP $\alpha$  determina l'uscita dal ciclo cellulare, l'esaurimento del *pool* staminale e promuove la mielopoiesi a spese dell'eritropoiesi.

La prognosi positiva associata a pazienti malati di LMA con mutazioni nel gene C/EBPA può essere confinata a persone con mutazioni bialleliche del gene (Pabst et al., 2009; Green et al., 2009). Individui con LMA familiare con gene C/EBPA mutato che sono stati curati per i primi sintomi hanno maggiore probabilità di sviluppare cloni maligni addizionali rispetto persone che non hanno mutazioni del gene C/EBPA ( Pabst et al., 2008).

Un fattore di trascrizione implicato in molti processi di tumorigenesi e apoptosi è c-MYC, inizialmente identificato come oncogene la cui disregolazione è in grado di indurre trasformazione *in vitro* di cellule mieloidi e sviluppo di leucemie/linfomi (Crans et al., 2001; Tenen et al., 1997). Indispensabile per il corretto funzionamento del ciclo cellulare è altamente espresso in cellule proliferanti ed è minimo in cellule mature. L'azione proliferativa di c-MYC e quella differenziativa promossa da C/EBP $\alpha$  sono opposte ed è noto che ciascuno di questi fattori di trascrizione è in grado di regolare l'espressione genica dell'altro (Johansen et al., 2001). Questo rende c-MYC uno dei bersagli più critici di C/EBP $\alpha$ : probabilmente la sua repressione è la principale azione svolta da C/EBP $\alpha$  nel processo di differenziazione granulocitaria (Tenen, 2003).

Nelle LMA si osservano frequentemente alterazioni citogenetiche a carico di elementi deputati al controllo trascrizionale: in un significativo numero di pazienti che non presentano traslocazioni cromosomiche all'analisi citogenetica è possibile supporre mutazioni o aberrazioni a livello delle proteine regolatorie (Tenen, 2001).

C/EBP $\alpha$  è un regolatore trascrizionale di cui sono state caratterizzate specifiche mutazioni: si ritrovano in una quota variabile tra il 5 e il 10% di pazienti affetti da leucemia acuta mieloide a cariotipo normale (Frohling et al., 2004; Smith et al., 2004; Hasemann et al., 2008) e si esprimono essenzialmente nei sottotipi FAB M1 e M2, arrivando più precisamente a raggiungere il 16% delle leucemia acute mieloidi M2 negative per la traslocazione t(8;21) (Pabst et al., 2001; Tenen, 2001).

Per l'estremità N-terminale possiamo avere mutazioni che originano una proteina tronca di 20 KDa (anziché 42 KDa) che ha ridotta capacità di legame col DNA, o che portano alla sovra-espressione dell' isoforma p30 che ne antagonizza l'effetto mancando di attività antiproliferativa e della capacità di transattivazione del DNA. Per l'estremità C-terminale le mutazioni comportano la totale incapacità di C/EBP $\alpha$  di legare il DNA (Frohling et al., 2004; Ho et al., 2009; Hasemann et al., 2008; Pabst et al., 2001).

Un recettore appartenente alla famiglia delle *tyrosine kinase*, espresso a livello di progenitori emopoietici dove riveste un ruolo sia nella differenziazione che nella proliferazione cellulare, è FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3). Mutazioni somatiche di FLT3 che coinvolgono l'*internal tandem duplication* del dominio juxta-membrana (ITD) sono state identificate approssimativamente nel 17-34% delle leucemia acute mieloidi (Frohling et al., 2004; Zheng et al., 2004; Radomska et al., 2006). Studi recenti dimostrano come FLT3-ITD sia in grado di sopprimere l'espressione di C/EBP $\alpha$ : uno dei probabili meccanismi mediante cui ciò avviene è la fosforilazione di C/EBP $\alpha$  da parte di FLT3 attivato. L'inibizione di FLT3 o alternativamente la corretta ricostituzione funzionale di C/EBP $\alpha$  in cellule mutate permette di superare il blocco maturativo (Zheng et al., 2004; Radomska et al., 2006).

Nel 10-15% dei casi di leucemia acuta mieloide M2 è stata riscontrata la traslocazione cromosomica t(8;21). Ne risulta una proteina di fusione AML1-ETO che è in grado di sotto regolare l'espressione di C/EBP $\alpha$  (Smith et al., 2004; Tenen, 2001; Pabst et al., 2001; Boehrer et al., 2007). Nel lavoro di Pabst et al. (2001) viene messa in evidenza sia la diretta interazione tra le proteine C/EBP $\alpha$  e AML1-ETO, sia la completa abolizione dell'autoregolazione di C/EBP $\alpha$  da parte di AML1-ETO, dimostrando anche come l'espressione di C/EBP $\alpha$  in blasti leucemici di linea AML1-ETO positivi (Kasumi-1), sia sufficiente a indurre differenziazione granulocitaria.





## **OBIETTIVI DELLA TESI**

Se dalla revisione della Letteratura Scientifica, riportata nell'introduzione, emerge ampiamente il ruolo svolto dall' Adrenomedullina, Endotelina-1 e dell'Epidermal Growth Factor nella progressione neoplastica dei tumori solidi, il loro coinvolgimento nelle patologie oncoematologiche ed in particolare nella leucemia mieloide acuta, rimane ancora completamente inesplorato.

In base a tali considerazioni, queste ricerche si propongono di indagare gli effetti esercitati da EGF, ADM ed ET-1 sulla crescita e sulla differenziazione di cellule di LAM e di verificarne il possibile *targeting* delle loro vie metaboliche mediante inibitori specifici.

Come modello sperimentale sono state utilizzate linee stabilizzate di LAM che hanno consentito di indagare i seguenti obiettivi specifici:

- 1) Verificare il possibile ruolo favorente o inibente esercitato da EGF, ADM ed ET-1 sulla proliferazione cellulare neoplastica, mediante saggi di crescita dose-risposta e tempo-risposta.
- 2) Valutare le potenzialità differenziative dei peptidi sulla morfologia, fenotipo cellulare ed espressione di molecole regolative.
- 3) Indagare la presenza di *loop* autocrini mediante indagini di proteomica e di biologia molecolare.
- 4) Verificare il possibile *targeting* dei recettori EGFR, RAMP, ET<sub>A</sub> ed ET<sub>B</sub> mediante specifici inibitori.



# MATERIALI E METODI

## §1. LINEE CELLULARI

In queste sperimentazioni sono stati utilizzati tre diversi ceppi della linea promielocitica HL-60 e uno della linea promielocitica KASUMI-1:

1. Il ceppo cellulare HL-60 TV (originariamente fornito dal Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università degli Studi di Padova), è stato isolato presso il nostro Laboratorio per adattamento alla crescita in terreno *serum-free* della linea HL-60 che viene routinariamente mantenuta in coltura nel medium nutritivo RPMI 1640 addittivato con il 20% di FCS. Come terreno *serum-free* è stato impiegato lo *Stemline Hematopoietic Expansion Medium* (SIGMA), addizionato con glutammina 200mM, penicillina (100UI/ml), streptomicina (100µg/ml), fungizone (2,5µg/ml) e kanamicina (100µg/ml). L'adattamento è stato condotto miscelando il terreno completo di mantenimento con quello *serum-free* in proporzioni differenti, riducendo progressivamente il primo (RPMI 1640-FCS). Viene seminato alla concentrazione di  $1 \times 10^5$  cellule/ml. Proliferano in coltura in sospensione con singole cellule rotondeggianti e grossi *cluster*.
2. Il secondo ceppo, definito HL-60 CRO (Fornito dall'ospedale CRO di Aviano), è strettamente siero dipendente e viene coltivato in ISCOVE Medium supplementato con il 20% FBS, penicillina (100UI/ml), streptomicina (100µg/ml), fungizone (2,5µg/ml) e kanamicina (100µg/ml). Viene seminato alla concentrazione di  $1 \times 10^5$  cellule/ml. Proliferano in coltura in sospensione con singole cellule rotondeggianti.
3. Il terzo ceppo, definito HL-60 BANCA, proviene dalla banca tedesca DSMZ e viene coltivato in terreno RPMI1640 supplementato con il 20% di FBS, penicillina (100UI/ml), streptomicina (100µg/ml), fungizone (2,5µg/ml) e kanamicina (100µg/ml). Viene seminato alla concentrazione di  $2 \times 10^5$  cellule/ml. Proliferano in coltura in sospensione con singole cellule rotondeggianti e piccoli *cluster*.
4. Il ceppo KASUMI-1, acquistato presso la banca tedesca DSMZ, viene coltivato in terreno RPMI1640 supplementato con il 20% di FBS, penicillina (100UI/ml), streptomicina (100µg/ml), fungizone (2,5µg/ml) e kanamicina (100µg/ml) e seminato alla concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/ml. Proliferano in coltura in sospensione con singole cellule rotondeggianti o piccoli *clumps*.

Tutti i ceppi, prima del loro utilizzo sperimentale, sono stati sottoposti ad indagini fenotipiche, morfologiche ed immunofenotipiche in citometria a flusso.

## **§2. ESPRESSIONE FENOTIPICA BASALE DI ADM, ET-1, EGF E DEI LORO RECETTORI**

Le cellule di ciascuna linea, dopo coltura nei rispettivi terreni, sono state citocentrifugate e fissate per 10' con Metanolo (Carlo Erba), contenente il 5% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40vol. La colorazione dei preparati è stata eseguita mediante la tecnica dell'immunoperossidasi in accordo con Makin et al. (1984), utilizzando il *kit* di marcatura biotina/avidina Large Volume Dako LSAB+Kit, Perossidase (Dako). Nella Tabella VII sono riportati il pannello degli anticorpi primari utilizzati in questa sperimentazione, le loro diluizioni ed il tipo di diluente impiegato (soluzione fisiologica tamponata albuminata PBS/BSA).

Alle istruzioni del *kit* sono state apportate le seguenti modifiche: a) le incubazioni con gli anticorpi primari e secondari sono state eseguite a 37°C e in camera umida; b) i preparati sono stati incubati per 1h con l'anticorpo primario diluito e per 30' con l'anticorpo secondario biotinilato e con l'avidina marcata; c) la reazione enzimatica è stata condotta per 10' con una soluzione di 0.6 mg/ml di DAB in tampone TRIS 0.05M additivata, immediatamente prima dell'uso, con 0.03% di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ; d) i preparati sono stati sottoposti ad intensificazione con 5 gr/l di CuSO<sub>4</sub> in una soluzione di NaCl 0.85 gr/l, ed a colorazione di contrasto con Ematossilina di Harris per 30'.

I controlli negativi senza anticorpi primari (Bianco) sono stati eseguiti per ogni singola linea per verificare la disattivazione delle perossidasi endogene e per controllare la specificità degli anticorpi secondari. Inoltre è stato eseguito un controllo positivo per ogni anticorpo per verificarne la funzionalità.

I preparati, dopo osservazione al microscopio, sono stati definiti omogenei (O), eterogenei (E) e con rare cellule positive (R) quando il numero di cellule positive era rispettivamente dell'80-100%, 20-80% e inferiore al 20%. L'intensità della positività della colorazione è stata valutata assegnando alle sole cellule colorate uno score compreso tra 1+ e 3+.

<b>ANTICORPI</b>	<b>DILUIZIONI</b>
Anti EGF policlonale Rabbit IgG	1:10 in PBS/BSA
Anti EGF-R (recettore EGF) clone 29.1	1:50 in PBS/BSA
Anti ADM (adrenomedullina) policlonale Goat IgG	1:5 in PBS/BSA
Anti-RAMP2 (recettore ADM) policlonale Goat IgG	1:5 in PBS/BSA
Anti-ET-1 (endotelina-1)	1:50 in PBS/BSA
Anti-ETAR (recettore ET-1) policlonale Goat IgG	1:5 in PBS/BSA
Anti-ETBR (recettore ET-1) policlonale Goat IgG	1:50 in PBS/BSA

**Tab. VII:** Pannello anticorpale primario utilizzato per le indagini fenotipiche.

### **§3. CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA**

I preparati per l'analisi morfologica sono stati allestiti per citocentrifugazione utilizzando le sospensioni cellulari madri al tempo zero e all'*end-point* di ciascun saggio citotossico. In breve, i preparati sono stati spottati per 5' a 500 rpm con aliquote cellulari di  $10^5$ , asciugati all'aria, fissati per 3' in metanolo, colorati con il metodo May-Grunwald Giemsa e successivamente montati con coprioggetto mediante balsamo sintetico DdMount. Le immagini dei test colturali a breve termine sono state ottenute per mezzo di una macchina fotografica digitale (Nikon COOLPIX995-3.34 Mpxel-Zoom 4x- Area Multi AF %) applicata ad un microscopio invertito Axiovert 100 (Zeiss) con un in gradimento 40X.

### **§4. ESPRESSIONE DEI MARKER DI DIFFERENZIAZIONE GRANULOCITARIA**

La caratterizzazione immunocitometrica è stata eseguita nel Laboratorio di Citofluorimetria del Servizio Trasfusionale di Treviso mediante citometria a flusso in analisi multiparametrica a quattro fluorescenze.

Le indagini sono state condotte su campioni basali non trattati di tutte le linee, su aliquote delle colture di controllo (Contr e Contr1), sulle colture esposte ai dosaggi  $D_4$  e  $D_5$  per il Gefitinib, e all'*end-point* dei test di stimolazione per ADM, ET-1 ed EGF. Per l'analisi dell'espressione dei *marker* di differenziazione granulocitaria basale i preparati sono stati definiti positivi (+) quando il numero di cellule marcate risultava superiore al 30% (General Haematology Task Force of the BCSH, 2002).

I campioni sono stati lavati per centrifugazione e risospesi in PBS, incubati con opportune combinazioni di anticorpi monoclonali anti HLA-DR (clone L243, ready to use, BD), CD33 (clone P67.6, ready to use, BD), CD14 (clone M $\phi$ P9, ready to use, BD), CD44 (clone L178, ready to use, BD), CD11b (clone M1/70, ready to use, BD), CD16 (clone 3G8 ready to use, BD), CD15 (clone MMA, ready to use, BD), CD4 (clone RPA-T4, ready to use, BD) e CD45(clone 2D1, ready to use, BD), coniugati con isotiocianato di fluorescenza (FITC), ficoeritrina (PE), peridindlorofilla, (PerCP) e allofococianina (APC).

La determinazione è stata effettuata usando il software FACSDiva dopo aver creato un adeguato pannello di acquisizione ed analisi dei dati.

#### **§5. PREPARAZIONE DI GEFITINIB (SOL. MADRE $2.2645 \times 10^{-3} \text{M}$ )** **[MW=446.9]**

Il Gefitinib (Iressa<sup>®</sup>), gentilmente fornito in forma pura dalla AstraZeneca, è stato portato in soluzione con DMSO (CryoSure, WAK-Chemie Medical GMBH) alla concentrazione di 22.64mM. Questa soluzione intermedia è stata successivamente diluita con alcool etilico al 70% per ottenere una soluzione madre di 2.264mM (1.012mg/ml) usata negli esperimenti. La soluzione madre è stata aliquotata in vial e conservata al buio a -20°C fino al momento dell'uso.

#### **§6. PREPARAZIONE DI ADRENOMEDULLINA<sub>52</sub> (SOL. MADRE $5 \times 10^{-7} \text{M}$ )** **[MW=6028.80]**

Sono stati disciolti 0.1mg di Adrenomedullin<sub>52</sub> in 33.174ml di RPMI 1640 Dutch Modification, sterilizzati su filtri Millipore da 0.22 $\mu\text{m}$  e suddivisi in aliquote da 500 $\mu\text{l}$  in vial. Utilizzati 100  $\mu\text{l}$  di soluzione madre per ogni ml di terreno corrispondente al dosaggio di  $5 \times 10^{-8} \text{M}$ , concentrazione di massima capacità stimolante.

#### **§7. PREPARAZIONE DI ENDOTHELIN-1 HUMAN PORCINE (SOL. MADRE $5 \times 10^{-7} \text{M}$ )** **[MW=2432.00]**

Sono stati disciolti 0.1mg di Endothelin-1 in 80.256ml di RPMI 1640 Dutch Modification, sterilizzati su filtri millipore da 0.22 $\mu\text{m}$  e suddivisi in aliquote da 500 $\mu\text{l}$  in vial. Utilizzati 100 $\mu\text{l}$  di soluzione madre per ogni ml di terreno corrispondente al dosaggio di  $5 \times 10^{-8} \text{M}$ , concentrazione di massima capacità stimolante.

**§8. PREPARAZIONE DI ARENOMEDULLIN FRAGMENT<sub>22-52</sub> (SOL. MADRE  $5 \times 10^{-6}$ )**  
**[MW=3576.00]**

Sono stati disciolti 50µg di Adrenomedullin fragment<sub>22-52</sub> in 2.7964ml di RPMI 1640 Dutch Modification, sterilizzati su filtri Millipore da 0.22µm e suddivisi in aliquote da 300µl in vial. Utilizzati 100µl di soluzione madre per ogni ml di terreno corrispondente al dosaggio di  $5 \times 10^{-7}$ M, concentrazione di massima capacità inibente.

**§9. PREPARAZIONE DI ENDOTHELIN-1 INHIBITOR BQ123 (SOL. MADRE  $5 \times 10^{-5}$ )**  
**[MW=610.71]**

Sono stati disciolti 0.5mg di Endothelin-1 inhibitor BQ123 in 16.3743ml di RPMI 1640 Dutch Modification, sterilizzati su filtri millipore da 0.22µm e suddivisi in aliquote da 300µl in vial. Utilizzati 10µl di soluzione madre per ogni ml di terreno corrispondente al dosaggio di  $5 \times 10^{-7}$ M, concentrazione di massima capacità inibente.

**§10. PREPARAZIONE DI ENDOTHELIN-1 INHIBITOR BQ788 (SOL. MADRE  $5 \times 10^{-5}$ )**  
**[MW=663.79]**

Disciolti 0.5mg di Endothelin-1 inhibitor BQ123 in 15.065ml di RPMI 1640 Dutch Modification, sterilizzati su filtri millipore da 0.22µm e suddivisi in aliquote da 330µl in vials. Utilizzati 10 µl di soluzione madre per ogni ml di terreno corrispondente al dosaggio di  $5 \times 10^{-7}$ M, concentrazione di massima capacità inibente.

**§11. PROPRIETÀ INDUTTIVE DI ADRENOMEDULLINA ED ENDOTELINA-1**

**§11.1 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ INDUTTIVE DI ADM ED ET-1 MEDIANTE SAGGI CLONOGENICI IN TERRENO SEMISOLIDO**

Questa sperimentazione è stata condotta su tutte le linee cellulari sopra descritte, raccolte da fiasche da coltura all'80% di confluenza.

In breve, 500 cellule sono state diluite 1:100 in Iscove Medium addittivato del 10% di Calcio Gluconato 1000mg/10ml (Bioindustria L.I.M.) e seminate in duplicato in terreno semisolido, precedentemente ripartito in piastre Beal da 24 pozzetti (500 µl/pozzetto), in presenza/assenza di ADM alla concentrazione finale di  $5 \times 10^{-8}$ M (D1),  $2.5 \times 10^{-8}$ M (D2),  $1.25 \times 10^{-8}$ M (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}$ M (D4) ed ET-1 alla

concentrazione finale di  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D5),  $2.5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D6),  $1.25 \times 10^{-8} \text{M}$  (D7) e  $0.625 \times 10^{-8} \text{M}$  (D8).

I test clonogenici sono stati condotti nel terreno Methocult H4100 (Stemcell Technologies) addittivato con Glutamina 200mM,  $\text{CaCl}_2$  100mM e con terreno di coltura (Stemline Medium, Iscove Medium o RPMI) specifico di ciascuna linea. Dopo incubazione per 14 giorni a  $37^\circ\text{C}$ , in presenza di  $\text{CO}_2$  al 5% e di umidità al 95%, si è proceduto al conteggio delle Colony Forming Unit (CFU) mediante osservazione con microscopio ottico a luce invertita.

### **§11.2 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ INDUTTIVE DI ADM ED ET-1 MEDIANTE TEST DI CRESCITA A BREVE TERMINE IN TERRENO LIQUIDO**

Per valutare l'effetto diretto di Adrenomedullina<sub>52</sub> ed Endotelina-1 sulle linee cellulari, sono stati effettuati test colturali a breve termine in terreno liquido seguiti da conta all'emocitometro (Micros 60, ABX), caratterizzazione morfologica mediante citospin colorati con metodica May Grunwald-Giemsa e caratterizzazione immunofenotipica in citometria, utilizzando il Citometro a flusso (FACSCanto) della ditta Becton Dickinson (San Jose, California).

Per questa sperimentazione sono state condotte 5 prove per ogni linea cellulare, seminando  $5 \times 10^5$  cellule per HL-60 TV e CRO,  $1 \times 10^6$  cellule per HL-60 BANCA e  $5 \times 10^6$  cellule per le KASUMI-1 in fiasche da  $25 \text{cm}^2$  in presenza/assenza di ADM alla concentrazione finale di  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8} \text{M}$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8} \text{M}$  (D4) ed E T-1 alla concentrazione finale di  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D5),  $2.5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D6),  $1.25 \times 10^{-8} \text{M}$  (D7) e  $0.625 \times 10^{-8} \text{M}$  (D8).

Per ogni esperimento è stato allestito un controllo (Contr) seminando le sole cellule nel corrispettivo terreno di crescita.

Le colture sono state incubate per 24h, 48h e 72 h a  $37^\circ\text{C}$ , in presenza del 95% di umidità e 5% di  $\text{CO}_2$ , correggendo, se necessario, il pH con una soluzione di Bicarbonato Sodico al 7%.

Al termine degli *end point*, le cellule sono state recuperate e il peptide in eccesso è stato allontanato mediante due lavaggi con Iscove Medium (non supplementato) per centrifugazione a 1200 rpm per 10' a  $4^\circ\text{C}$ . I pellet sono stati risospesi in 1ml di Iscove Medium e sottoposti a conta cellulare mediante emocitometro (Micros 60, ABX).



### **§11.3 VERIFICA DELLE PROPRIETÀ INDUTTIVE DI ADM ED ET-1 MEDIANTE INIBITORI**

Per valutare l'effetto degli inibitori sulle linee cellulari sono stati effettuati test colturali a breve termine, in terreno liquido, in piastre Beal da 24 pozzetti, esponendo le cellule alle concentrazioni massime stimolanti di peptide e alle concentrazioni massime inibenti degli inibitori.

Dopo 72h a 37°C, in presenza del 95% di umidità e 5% di CO<sub>2</sub>, e correggendo se necessario il pH con una soluzione di bicarbonato sodico al 7%, le cellule sono state raccolte, lavate in PBS1x, contate all'emocitometro (Micros 60, ABX), caratterizzate morfologicamente mediante citospin colorati con metodica May Grunwald-Giemsa e immunofenotipicamente utilizzando il Citometro a flusso (FACSCanto) della ditta Becton Dickinson (San Jose, California).

Cinque esperimenti sono stati allestiti in duplicato, sottoponendo le linee ai peptidi e agli inibitori singolarmente e ai peptidi assieme ai loro inibitori, adottando il seguente protocollo di semina:

- **Controllo:** semina delle sole linee cellulari ( $4 \times 10^5$  cellule pozzetto).
- **AM:** semina delle linee cellulari in presenza di  $5 \times 10^{-8}$ M di ADM.
- **ET-1:** semina delle aliquote cellulari in presenza di  $5 \times 10^{-8}$ M di ET-1.
- **AM fr22-52 Inhib:** semina delle aliquote cellulari in presenza di  $5 \times 10^{-7}$ M di ADRENOMEDULLIN fragment<sub>22-52</sub> Inhibitor.
- **BQ788 Inhib:** semina delle aliquote cellulari in presenza di  $5 \times 10^{-7}$ M di BQ788 Inhibitor.
- **BQ123 Inhib:** semina delle aliquote cellulari in presenza di  $5 \times 10^{-7}$ M di BQ123 Inhibitor.
- **ADM/ADM fr<sub>22-52</sub> Inhib:** semina delle aliquote cellulari in presenza di  $5 \times 10^{-8}$ M di ADM e di  $5 \times 10^{-7}$ M di ADRENOMEDULLIN fragment<sub>22-52</sub> Inhibitor.
- **ET-1/BQ788 Inhib:** semina delle aliquote cellulari in presenza di  $5 \times 10^{-8}$ M di ET-1 e di  $5 \times 10^{-7}$ M di BQ788 Inhibitor.
- **ET-1/ BQ123 Inhib:** semina delle aliquote cellulari in presenza di  $5 \times 10^{-8}$ M di ET-1 e di  $5 \times 10^{-7}$ M di BQ123 Inhibitor.

## **§12. PROPRIETÀ INDUTTIVE DELL'EPIDERMAL GROWTH FACTOR**

### **§12.1 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ INDUTTIVE DI EGF MEDIANTE SAGGI CLONOGENICI IN TERRENO SEMISOLIDO**

Questa sperimentazione è stata condotta sulle quattro linee cellulari raccolte da fiasche da coltura all'80% di confluenza.

In breve, 500 cellule sono state diluite 1:100 in Iscove Medium addittivato del 10% di Calcio Gluconato 1000mg/10ml (Bioindustria L.I.M.) e seminate in duplicato in terreno semisolido, precedentemente ripartito in piastre Beal da 24 pozzetti (500 µl/pozzetto), in presenza ed assenza di EGF alla concentrazione finale di 10mg/µl (D1), 5mg/µl (D2), 2.5µg/ml (D3) e 1.25µg/ml (D4).

I test clonogenici sono stati condotti nel terreno Methocult H4100 (Stemcell Technologies) addittivato con glutamina 200mM, CaCl<sub>2</sub> 100 mM e con terreno di coltura (Stemline Medium, Iscove Medium o RPMI supplementati) specifico di ciascun ceppo. Dopo incubazione per 14 giorni a 37°C, in presenza di CO<sub>2</sub> al 5% e di umidità al 95%, si è proceduto al conteggio delle Colony Forming Unit (CFU) mediante osservazione con microscopio ottico a luce invertita.

### **§12.2 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ INDUTTIVE DI EGF MEDIANTE TEST DI CRESCITA A BREVE TERMINE IN TERRENO LIQUIDO**

Per valutare l'effetto diretto di EGF sui ceppi cellulari, sono stati effettuati test colturali a breve termine in terreno liquido seguiti da conta all'emocitometro (Micros 60,ABX), caratterizzazione morfologica mediante citospin colorati con metodica May Grunwald-Giemsa e caratterizzazione immunofenotipica utilizzando il Citometro a flusso (FACSCanto) della ditta Becton Dickinson (San Jose, California).

Per questa sperimentazione sono state condotte 5 prove per ogni linea cellulare, seminando  $5 \times 10^5$  cellule per HL-60 TV e CRO,  $1 \times 10^6$  cellule per HL-60 BANCA e  $5 \times 10^6$  cellule per le KASUMI-1 in fiasche da 25cm<sup>2</sup> in presenza di EGF alla concentrazione finale di 10mg/µl (D1), 5mg/µl (D2), 2.5µg/ml(D3) e 1.25µg/ml (D4).

Per ogni esperimento è stato allestito un controllo (Contr) seminando le sole cellule nel corrispettivo terreno di crescita. Le colture sono state incubate per 24h, 48h e 72 h a 37°C, in presenza del 95% di umidità e 5% di CO<sub>2</sub>, correggendo, se necessario, il pH con una soluzione di bicarbonato sodico al 7%.

Al termine degli *end-point*, le cellule sono state recuperate e il peptide in eccesso è stato allontanato mediante due lavaggi con Iscove Medium (non supplementato) per centrifugazione a 1200 rpm per 10' a 4°C. I pellet sono stati risospesi in 1 ml di Iscove Medium e sottoposti a conta cellulare mediante emocitometro (Micros 60, ABX).

### **§12.3 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI GEFITINIB**

Per valutare l'effetto diretto del Gefitinib sui ceppi cellulari sono stati effettuati test colturali a breve termine in terreno liquido seguiti da test di recupero funzionale a medio termine in terreno semisolido.

Per questa sperimentazione sono state condotte 10 prove con tutte le linee cellulari, seminando aliquote di  $5 \times 10^5$  cellule per HL-60 TV e CRO,  $1 \times 10^6$  cellule per HL-60 BANCA e  $5 \times 10^6$  cellule per le KASUMI-1 in fiasche da 25cm<sup>2</sup>. Le cellule sono state esposte alle concentrazioni decrescenti di Gefitinib indicate nel piano di semina di Tabella VIII. Tali concentrazioni sono state scelte in quanto riportate in Letteratura come in grado di indurre differenziazione su blasti di linea ed *ex vivo* e comprese in *range* terapeuticamente raggiungibili quando il farmaco viene impiegato, al dosaggio consolidato, per il trattamento delle neoplasie di origine epiteliale (Stegmaier et al, 2005).

Per ogni esperimento è stato allestito, oltre al normale controllo (Contr) nel corrispondente terreno di crescita, anche un secondo controllo (Contr<sub>1</sub>) costituito dalle cellule esposte al massimo volume di solvente usato per la preparazione della dose D1.

Le colture sono state incubate per 72 h a 37°C, in presenza del 95% di umidità e 5% di CO<sub>2</sub>, correggendo il pH, se necessario, con una soluzione di bicarbonato sodico al 7%.

Al termine dell'*end point*, le cellule sono state recuperate e il farmaco in eccesso è stato allontanato mediante due lavaggi con Iscove Medium (non supplementato) per centrifugazione a 1200 rpm per 10' a 4°C. I *pellet* sono stati risospesi in 1 ml di Iscove Medium e sottoposti a conta cellulare mediante emocitometro (Micros 60, ABX). Queste sospensioni madri, successivamente, sono state diluite 1:100 con Iscove Medium addittivato con il 10% di Calcio Gluconato 1000mg/10ml (Bioindustria L.I.M.).

Il test di recupero è stato condotto in piastre Beal da 24 pozzetti, seminando in duplicato per ciascuna sospensione cellulare aliquote di 500 cellule/pozzetto in terreno semisolido Methocult H4100 (Stemcell Technologies) addittivato con

Glutamina 200mM, CaCl<sub>2</sub> 100mM e con terreno di coltura (Stemline Medium, Iscove o RPMI1640 Medium supplementati) specifico di ciascun ceppo.

Dopo incubazione per 14 giorni a 37°C, in presenza di CO<sub>2</sub> al 5% e di umidità al 95%, si è proceduto al conteggio delle *Colony Forming Unit* (CFU) mediante osservazione con microscopio ottico a luce invertita.

	<b>CONC. FINALE FARMACO</b>	<b>VOLUME FARMACO (D<sub>1</sub>)</b>	<b>VOLUME TERRENO</b>	<b>VOLUME SOSPENSIONE CELLULARE OPERATIVA</b>
<b>D<sub>1</sub></b>	0.040 mM	2.500 ml	-	2.500 ml
<b>D<sub>2</sub></b>	0.035 mM	2.187 ml	0.313 ml	2.500 ml
<b>D<sub>3</sub></b>	0.030 mM	1.875 ml	0.625 ml	2.500 ml
<b>D<sub>4</sub></b>	0.025 mM	1.562 ml	0.938 ml	2.500 ml
<b>D<sub>5</sub></b>	0.020 mM	1.250 ml	1.250 ml	2.500 ml

**Tabella VIII:** piano di semina per i test colturali a breve termine

### **§13. CARATTERIZZAZIONE PROTEOMICA BASALE DI EGF-R MEDIANTE WESTERN BLOTTING**

I lisati cellulari delle quattro linee sono stati ottenuti mediante *buffer* di lisi composto da Triton X-100, Sodiodiossicolato, Cloruro di Sodio, Tris HCl e un *cocktail* inibitore delle proteasi. Sono seguite due centrifughe per ottenere il surnatante avente il contenuto proteico ricercato.

Successivamente è stata eseguita la quantificazione del surnatante tramite BCA Protein Assay, tecnica che si basa sulla compatibilità dell'acido bicinonico (BCA) per il rilevamento colorimetrico e la quantificazione delle proteine totali. La reazione prevede la riduzione di Cu<sup>2+</sup> in Cu<sup>1+</sup> da parte delle proteine, in un *medium* alcalino, combinata con l'elevata sensibilità e selettività colorimetrica dei cationi rameici usando un unico reagente contenente acido bicinonico. La colorazione porpora data in questo saggio è dovuta alla chelazione di due molecole di BCA con uno ione

rame. Questo complesso, solubile in acqua, esibisce una dura assorbenza a 562nm, valore linearmente vicino alla concentrazione proteica di un ampio intervallo di lavoro (20-2,000µg/ml).

Alla quantificazione è seguita la separazione su gel di Poliacrilamide (SDS-PAGE) e successivo Western Blotting per valutare quanto e dove sono espresse le proteine di interesse, attraverso l'utilizzo di anticorpi specifici per i seguenti *marker*: EGF (Epidermal Growth Factor), EGF-R (Receptor), FGF (Fibroblast Growth Factor), FGF-R (Receptor), ADM (Adrenomedullin), RAMP2 (ADM Receptor), ET-1 (Endothelin-1), ET<sub>A</sub>R (Endothelin Receptor A), ET<sub>B</sub>R (Endothelin Receptor B).

Per prima è stata eseguita una elettroforesi denaturante (SDS-Page) per far separare le varie proteine in funzione della massa, su un gel di poliacrilammide, annullando le cariche degli amminoacidi che influenzerebbero la migrazione. Dopo la corsa su gel, le proteine sono state fisicamente trasferite su una membrana di Nitrocellulosa grazie ad un campo elettrico.

Terminato il trasferimento, la membrana è stata incubata attraverso anticorpi radioattivi creati per la proteina di interesse. L'anticorpo secondario è coniugato con una perossidasi che è in grado di emettere luce qualora si leghi all'anticorpo primario. In fine, la membrana è stata esposta su lastra autoradiografica con successivo sviluppo.

#### **§14. ESPRESSIONE BASALE DI RNA MESSAGGERI DI ADM ED EGF-R**

La RT-PCR consente l'amplificazione di frammenti di acidi nucleici (RNA estratto con Trizol Reagent) dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali.

Da pellet cellulare di HL60 (TV, CRO e BANCA) e delle cellule KASUMI-1 è stata eseguita l'estrazione di mRNA. I campioni sono stati centrifugati a 1200rpm per cinque minuti, risciacquati in PBS freddo ed infine trattati con 1ml di soluzione Trizol Reagent (Invitrogen). Il lisato cellulare è stato incubato per 5 minuti in un tubo senza RNase. Dopo l'aggiunta di 0,2ml di Cloroformio, i campioni sono stati agitati per 15 secondi, incubati per 10 minuti a temperatura ambiente ed infine centrifugati a 12000g per 15 minuti a 4°C. La fase acquosa è stata prelevata, trasferita in un tubo sterile e trattata con 0,5ml di isopropanolo per 10 minuti a temperatura ambiente.

Dopo centrifugazione a 12000g per 10 minuti a 4°C, il *pellet* è stato risospeso in 50µl di acqua senza RNase, dopo un lavaggio in etanolo (75%) e centrifugazione per 5 minuti a 7500g a 4°C.

Dopo l'estrazione l'RNA è stato quantificato mediante spettrofotometro Nano Drop.

Successivamente, tramite reazione di retrotrascrizione, è stato ottenuto il cDNA grazie al *Kit* M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma), dal quale sono state amplificate le porzioni comprese tra i *primer forward* e *reverse* corrispondenti alle sequenze per **EGF-R** (Senso: CGG GAC ATA GTC AGC AGT GA – Antisenso: ACT GGT TGT GGC AGCAGT C), **ADM** (Senso: AAG AAG TGG AAT AAG TGG GCT – Antisenso: TGG CTT AGA AGA CAC CAG AGT) e **GAPD** utilizzato come controllo positivo (Senso: AGC CAC ATC GCT CAG ACA C – Antisenso: CTC CAT GGT GGT GAA GAC G)(Kimberly, et al., 2008).

Per l'amplificazione è stato utilizzato il *Kit* Ready Mix Taq PCR Reaction Mix with MgCl<sub>2</sub> (Sigma).

La reazione di PCR è iniziata con un primo *step* a 94°C per 9 minuti seguito da 40 cicli di denaturazione a 94°C per 1 minuto, *annealing* a 60°C per EGF-R e GAPD, 53,9°C per ADM e 50,65°C per ET-1 per 1 minuto e infine l'estensione a 72°C per 1 minuto.

Il controllo dei risultati è avvenuto mediante elettroforesi su gel di agarosio.

## **§15. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI C/EBP**

### **§15.1 ESTRAZIONE DELL'RNA E RETROTRASCRIZIONE**

L'espressione del gene C/EBPA (*gene target*) è stata determinata con metodica Real Time PCR sul ceppo HL-60 TV per quattro campioni: cellule in condizioni basali, dopo incubazione a breve termine con Gefitinib alla concentrazione di 2.5 µM (D4, la più alta in grado di dare effetto citostatico, ma non citotossicità) e nei due controlli incubati con DMSO (Contr1) e in coltura di mantenimento (Contr).

La quantificazione del *gene target* è stata valutata utilizzando G6PDH come *gene reference*.

Da ciascun campione è stata eseguita l'estrazione di RNA utilizzando 5x10<sup>6</sup> cellule in sospensione, mediante il kit QIAamp® RNA Blood Mini (Quiagen). La purezza dell'RNA, successivamente valutata con tecnica spettrofotometrica, è risultata buona in tutti gli esperimenti (rapporto A260 /A280 compreso tra 1.9 e 2.1).

L'RNA totale (1µg) è stato retrotrascritto mediante l'impiego di Random Esameri e di enzima trascrittasi inversa (SuperScript II, Invitrogen), come da protocollo indicato dal produttore.

### **§15.2 REAL TIME PCR PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI C/EBP**

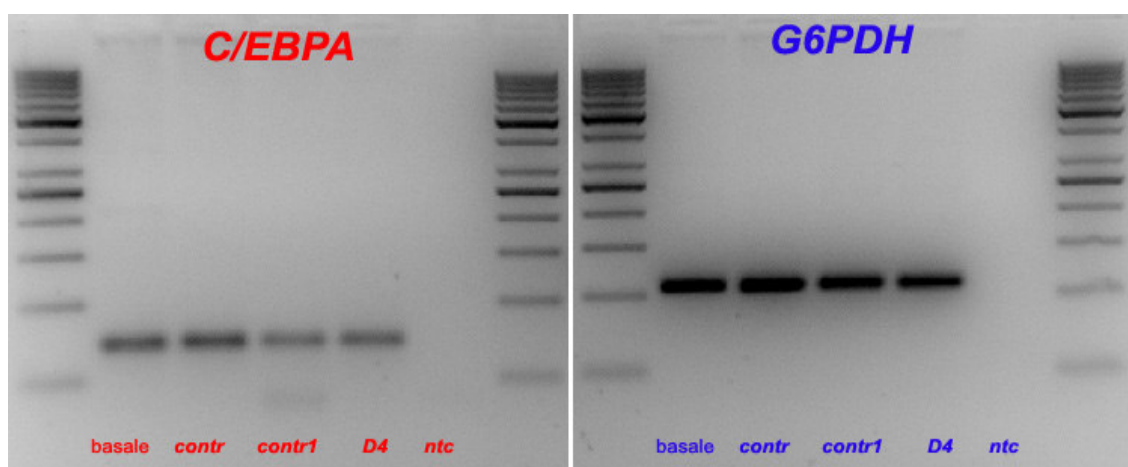
Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione è stato amplificato utilizzando i seguenti

*primer* specifici per C/EBPA: senso 5'-TGGACAAGAACAGCAACGAG-3', antisenso 5'TTGTCACCTGGTCAG-CTCCAG-3'. Per G6PDH sono stati invece usati i seguenti *primer*: senso 5'-ATTGGGCGCCTGGTTCAC-3', antisenso 5'-AAGATGTAAACCATGTAG TTGAGGTCA-3'.

La specificità dei *primer* è stata testata con metodica Real Time PCR qualitativa, che ha escluso la presenza di prodotti di amplificazione aspecifici (Figura 12).

Ogni reazione di amplificazione è stata eseguita in triplicato utilizzando per ciascun esperimento un controllo negativo NTC (*no template control*) contenente tutti i reagenti, ma non il cDNA, allo scopo di escludere la possibilità di contaminazioni.

Nella reazione di Real Time PCR il c-DNA è stato amplificato in 12.50µl con la mix Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystem, CA) e i *primers* specifici per 40 cicli (95°C per 15 secondi, 60°C per 60 secondi). E' stato utilizzato un apparecchio STEPOne PLUS (Applied Biosystem) dotato di uno specifico *software* che al termine della reazione è in grado di fornire la curva di amplificazione per ciascun campione e i valori di Ct necessari a quantificare l'espressione del gene target.



**Fig.12:** elettroforesi su gel d'agarosio al 3% del prodotto di RT PCR qualitativa effettuata per testare la specificità dei primer. Ampiezza degli amplificati: C/EBPA 90bp, G6PDH 115bp.

## **§16. ANALISI DEI DATI ED ELABORAZIONE STATISTICA**

I dati delle differenti sperimentazioni sono stati sottoposti ai test statistici di Curtosi, Sweknees e Barlett per valutarne la distribuzione normale. In base a questi test, per comparare i differenti gruppi di dati sperimentali sono stati applicati sia i metodi parametrici dell'ANOVA e del Tukey post test che i metodi non parametrici del Friedman e di Wilcoxon, utilizzando come livello di significatività  $p < 0.05$ .

Per l'elaborazione di tali calcoli e per la preparazione dei grafici si è ricorsi al software GraphPad Prism Version 4.0.

I dati ottenuti dai test citotossici a breve termine per Gefitinib sono stati espressi come efficienza di piastramento (EP), valore ottenuto dal rapporto tra il numero di cellule rilevato dopo 72 h di incubazione e numero di cellule seminate.

I dati delle analisi immunocitometriche vengono riportati in tabelle espressi in percentuale di espressione del marcatore antigenico  $\pm$  deviazione standard.

I test di recupero per Gefitinib e i test clonogenici in terreno semisolido per ADM, ET-1 ed EGF sono, invece, espressi come numero totale di *Colony Forming Unit* (CFU) per pozzetto.



# RISULTATI

## §1. CARATTERIZZAZIONE BASALE DELLE LINEE CELLULARI

### §1.1 ESPRESSIONE FENOTIPICA BASALE DI ADM, ET-1, EGF E DEI LORO RECETTORI

I risultati della caratterizzazione fenotipica condotta con metodi immunocitochimici su tutte le linee dopo 72 ore di coltura sono riportati nella Tabella IX.

- *LINEA HL-60 CEPPO TV*

Alle normali condizioni di mantenimento della linea, le cellule risultano positive per: EGF<sup>3+0</sup>; EGF-R<sup>1+0</sup>; ADM<sup>3+0</sup>; RAMP2<sup>2+E</sup>; ET-1<sup>2+0</sup>; ET<sub>A</sub>R<sup>2+E</sup>; ET<sub>B</sub>R<sup>3+0</sup>.

- *LINEA HL-60 CEPPO CRO*

I pattern fenotipici espressi da queste cellule differiscono da quelli descritti nella precedente linea per la negatività agli anticorpi anti EGF e anti EGF-R. Risultano positive a tutti gli altri antigeni studiati con score diversi, in particolare: ADM<sup>2+0</sup>; RAMP2<sup>3+E</sup>; ET-1<sup>2+0</sup>; ET<sub>A</sub>R<sup>2+E</sup>; ET<sub>B</sub>R<sup>3+0</sup>.

- *LINEA HL-60 CEPPO BANCA*

Questa linea risulta EGF-R, ET<sub>A</sub>R ed ET<sub>B</sub>R negativa. Rispetto alle linee precedenti esprimono con intensità diversa gli altri anticorpi indagati: EGF<sup>1+R</sup>; ADM<sup>1+0</sup>; RAMP2<sup>2+R</sup>; ET-1<sup>3+0</sup>.

- *LINEA KASUMI-1*

Le cellule sono risultate negative a tutti gli anticorpi del pannello utilizzato, ad eccezione RAMP2<sup>2+0</sup>, ET-1<sup>2+0</sup> e ADM<sup>2+R</sup>.

<b>Pannello Anticorpi</b>	<b>HL-60 ceppo TV</b>	<b>HL-60 ceppo CRO</b>	<b>HL-60 ceppo BANCA</b>	<b>KASUMI-1</b>
Blank	—	—	—	—
Anti EGF policlonale Rabbit IgG	3+O	—	1+R	—
Anti EGF-R (recettore EGF) clone 29.1	—	—	—	—
Anti ADM (Adrenomedullina) policlonale Goat IgG	3+O	2+O	1+O	2+R
Anti-RAMP2 (recettore ADM) policlonale Goat IgG	2+E	3+E	2+R	2+O
Anti-ET-1 (endotelina-1)	2+O	2+O	3+O	2+O
Anti-ETAR (recettore ET-1) policlonale Goat IgG	2+E	2+E	—	—
Anti-ETBR (recettore ET-1) policlonale Goat IgG	3+O	3+O	—	—

**Tab. IX :** Risultati dell'espressione fenotipica basale di ADM, ET-1, EGF e dei loro recettori condotta sulle linee HL-60 ceppo TV, CRO e BANCA e sulla linea KASUMI-1 dopo tre giorni di coltura alla temperatura di incubazione di 37°C. I preparati sono stati definiti omogenei (O) quando il numero delle cellule marcate era compreso tra 80-100%, eterogenee (E) tra 20-80% e con rare cellule (R) meno del 20%. L'intensità della colorazione è stata valutata assegnando alle cellule colorate uno score compreso tra 1+ e 3+.

## §1.2 GROWTH RATE BASALI DELLE LINEE CELLULARI

Nella Figura 13 sono riportati i risultati dei saggi di crescita condotti sulle quattro linee cellulari a 24h, 48h e 72h di coltura nei corrispettivi terreni nutritivi.

Il confronto dei grafici di queste Figure evidenzia la differente velocità di crescita che caratterizza ciascuna linea. In particolare il tempo di raddoppiamento è 15.14 ore per HL-60 ceppo TV (area sotto la curva 309.4), 19.65 ore per HL-60 ceppo CRO (area sotto la curva 184.2), 18.56 ore per HL-60 ceppo BANCA (area sotto la curva 362.1) e 59.70 ore per le KASUMI-1 (area sotto la curva 415.1).

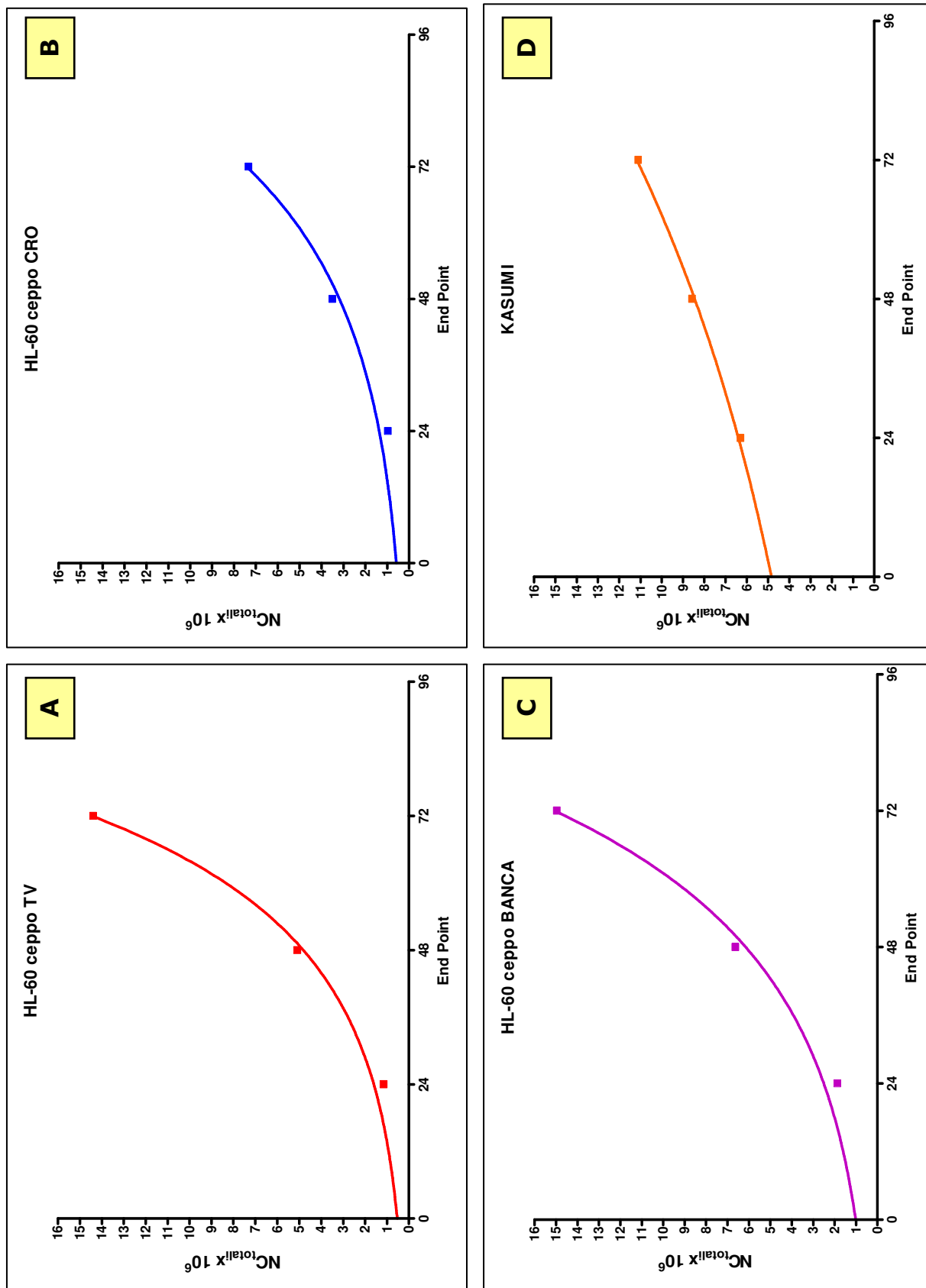
## §1.3 ESPRESSIONE BASALE DEI MARKER DI DIFFERENZIAZIONE GRANULOCITARIA

I risultati per la caratterizzazione immunocitometrica dell'espressione dei *marker* di differenziazione granulocitaria sono riportati nella Tabella X. In base alle indicazioni della General Haematology Task Force of the BCSH (2002), che pongono come *cut-off* minimo di positività il 30% dell'espressione all'antigene, tutte le quattro linee sono risultate positive per l'espressione di CD11b, CD33 e CD45, mentre differiscono tra di loro per l'espressione degli altri *marker*. L'antigene HLA-DR è espresso dalle cellule HL-60 ceppo CRO e KASUMI-1. L'antigene CD4, il CD15 e il CD44 sono espressi in tutte le linee ad eccezione delle HL-60 ceppo TV. L'antigene CD14 è comune nei tre ceppi di HL-60 e il CD16 nel ceppo BANCA e nella linea KASUMI-1.

ANTICORPI	HL-60 ceppo TV	HL-60 ceppo CRO	HL-60 ceppo BANCA	KASUMI-1
HLA-DR	1.7 ± 0.41	73.2 ± 1.90	3.9 ± 0.92	99.2 ± 0.04
CD 4	1.0 ± 0.64	85.6 ± 2.50	99.0 ± 0.02	99.8 ± 0.01
CD 11B	73.1 ± 1.90	99.6 ± 0.02	97.5 ± 0.12	75.0 ± 0.28
CD 14	83.7 ± 0.51	99.5 ± 0.07	44.2 ± 0.51	6.2 ± 1.3
CD 15	7.9 ± 1.60	99.9 ± 0.00	99.4 ± 0.06	84.7 ± 1.9
CD 16	3.5 ± 0.42	28.3 ± 0.61	82.5 ± 0.71	32.8 ± 1.65
CD 33	99.7 ± 0.02	99.4 ± 0.07	98.9 ± 0.44	89.7 ± 1.71
CD 44	0.6 ± 0.01	99.9 ± 0.00	99.2 ± 0.03	99.6 ± 0.07
CD 45	67.9 ± 1.12	99.7 ± 0.02	99.3 ± 0.04	98.9 ± 0.09

**Tab. X :** risultati della caratterizzazione immunofenotipica condotta sulla linea HL-60 ceppo TV, CRO, BANCA e sulla linea KASUMI-1 dopo 72 ore di coltura alla temperatura di incubazione di 37°C. I preparati sono stati definiti positivi (+) quando il numero delle cellule marcate risultava superiore al 30% (General Haematology Task Force of the BCSH, 2002).



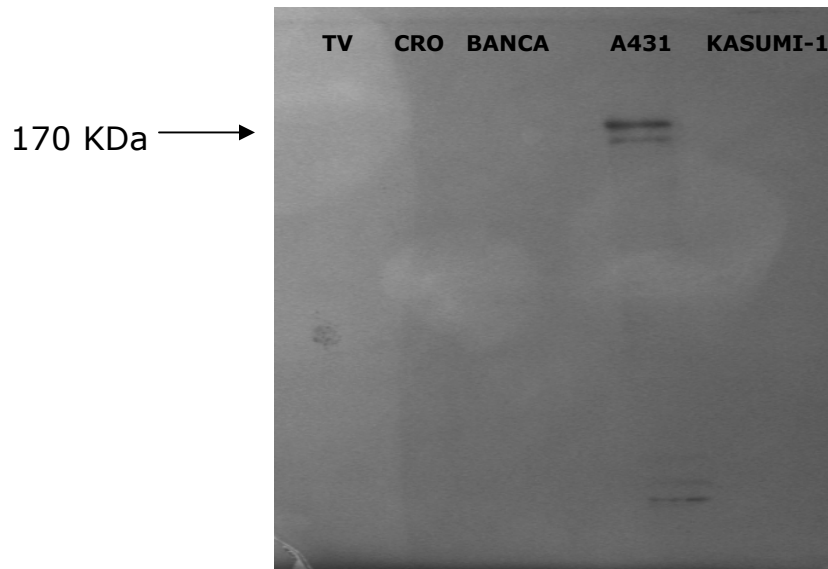


**Fig. 13:** curve di crescita delle linee: A) HL-60 ceppo TV, B) HL-60 ceppo CRO, C) HL-60 ceppo BANCA, D) KASUMI-1. I saggi sono stati ripetuti dieci volte ed i risultati sono espressi come  $NC_{totali} \times 10^6$ .



#### **§1.4 CARATTERIZZAZIONE PROTEOMICA BASALE DI EGF-R**

La sperimentazione condotta mediante Western Blotting non ha rilevato la presenza di EGF-R nei lisati cellulari provenienti da tutte e quattro linee, come evidenziato nella Figura 14.

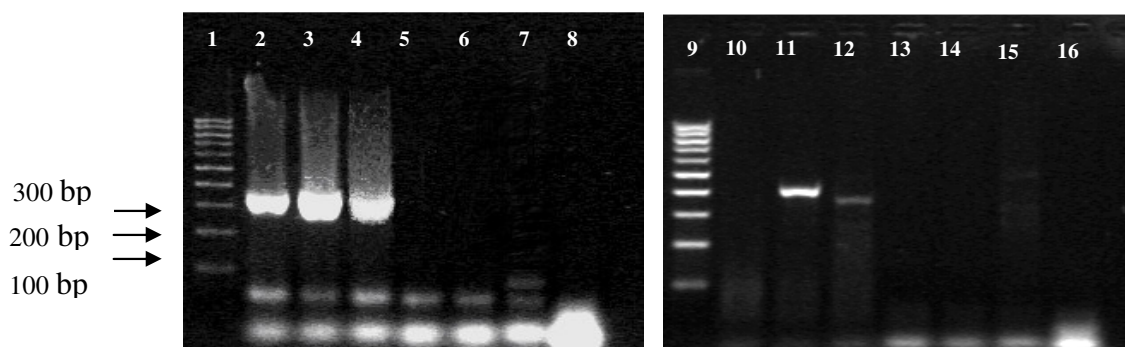


**Fig. 14:** western Blotting per la ricercata della proteina EGF-R sui campioni delle linee HL-60 ceppo TV, ceppo CRO, ceppo BANCA e sulla linea KASUMI-1: i lisati cellulari sono stati separati su gel di Poliacrilamide al 10% dopo essere stati caricati nella quantità di 50µg/pozzetto. Delle A431 ne sono stati caricati 30µg. Il recettore per EGF è stato rilevato con Mouse Anti-Human Epidermal Grow Factor alla diluizione di 1:5000. Come anticorpo secondario è stato utilizzato Anti-Mouse coniugato con Enzima Perossidasi (HRP) diluito 1:5000.

#### **§1.5 ESPRESSIONE BASALE DI RNA MESSAGGERI DI ADM ED EGF-R**

L'espressione di ADM ed EGF-R è stata indagata mediante RT-PCR nelle linee HL-60 ceppo TV, CRO e BANCA e nella linea KASUMI-1.

In Figura 15 sono mostrate come esempio le corse elettroforetiche su gel di agarosio dei prodotti di RT-PCR per l'mRNA di ADM ed EGF-R delle linee HL-60 ceppo TV, CRO e BANCA. In particolare nella corsia 11 e 12 sono presenti i prodotti di RT-PCR della linea HL-60 ceppo CRO e ceppo TV, positive per ADM.



**Fig. 15:** analisi di RT-PCR su RNA estratto da HL60 ceppo BANCA, CRO e TV per rilevare la presenza di EGF-R, ADM, e GAPD utilizzato come controllo positivo. Al termine della reazione di amplificazione sono stati caricati su gel di Agarosio al 2%, 18 $\mu$ l per ogni campione. Per le linee **1** e **9** Marker molecolare 100 bp (Sigma Aldrich), **2** GAPD per HL60 ceppo BANCA, **3** GAPD per HL60 ceppo CRO, **4** GAPD per HL60 ceppo TV, **5** EGF-R per HL60 ceppo BANCA, **6** EGF-R per HL60 ceppo CRO, **7** EGF-R per HL60 ceppo TV, **8** e **16** controlli negativi, **10** ADM per HL60 ceppo BANCA, **11** ADM per HL60 ceppo CRO, **12** ADM per HL60 ceppo TV, **13**, **14** e **15** pozzetti vuoti.



## **§2. PROPRIETÀ INDUTTIVE DI ADRENOMEDULLINA ED ENDOTELINA-1**

### **§2.1 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ INDUTTIVE DI ADM ED ET-1 MEDIANTE TEST DI CRESCITA A BREVE TERMINE IN TERRENO LIQUIDO**

Le Figure 16, 17, 18, e 19 riassumono i risultati delle prove a breve termine eseguite per valutare gli effetti induttivi di ADM sulla crescita delle quattro linee in esame. Analogamente nelle figure 20, 21, 22 e 23 sono riportati i dati riguardanti ET-1.

In ciascuna figura gli istogrammi riportano l' $NC_{totale} \pm$  deviazione standard delle cellule sviluppatesi in ciascuna coltura agli *end-point* e sono affiancati da tabelle con indicate le significatività statistiche tra i differenti gruppi sperimentali.

- *LINEA HL-60 CEPPO TV (FIGURA 16 PER ADM, FIGURA 20 PER ET-1)*

La conta cellulare media delle colture di controllo è pari a  $1.18 \pm 0.002 \times 10^6$  per le 24 ore,  $5.27 \pm 0.007 \times 10^6$  per le 48 ore e  $14.42 \pm 0.023 \times 10^6$  per le 72 ore.

Nelle colture trattate con ADM, le conte cellulari medie sono per le 24 ore:  $4.86 \pm 0.031 \times 10^6$  per D1,  $3.87 \pm 0.018 \times 10^6$  per D2,  $3.43 \pm 0.014 \times 10^6$  per D3 e  $2.58 \pm 0.016 \times 10^6$  per D4. Anche nel secondo end-point (48 ore) il conteggio emocitometrico evidenzia un aumento dosaggio dipendente:  $16.37 \pm 0.044 \times 10^6$  in D1,  $15.56 \pm 0.059 \times 10^6$  in D2,  $13.41 \pm 0.039 \times 10^6$  in D3 e  $11.97 \pm 0.012 \times 10^6$  in D4. I risultati si confermano alle 72 ore rilevando un incremento nella conta cellulare dipendente dalla quantità di peptide fornito:  $19.96 \pm 0.029 \times 10^6$  per D1,  $19.07 \pm 0.037 \times 10^6$  per D2,  $18.43 \pm 0.152 \times 10^6$  per D3 e  $17.86 \pm 0.027 \times 10^6$  per D4.

I confronti statistici tra i controlli e i trattati evidenziano che ADM induce incrementi significativi, dose e tempo dipendente, dell' $NC_{totali}$  presenti nelle colture trattate (Figura 16).

Anche nei saggi di crescita con ET-1 le conte cellulari evidenziano un aumento rispetto ai controlli, in particolare nelle 24 ore:  $4.43 \pm 0.019 \times 10^6$  per D5,  $3.73 \pm 0.018 \times 10^6$  per D6,  $2.52 \pm 0.017 \times 10^6$  per D7 e  $2.08 \pm 0.005 \times 10^6$  per D8. Allo stesso modo alle 48 ore l' $NC_{totali}$  contate corrisponde a:  $15.70 \pm 0.005 \times 10^6$  in D5,  $15.15 \pm 0.027 \times 10^6$  in D6,  $12.86 \pm 0.021 \times 10^6$  in D7 e  $11.38 \pm 0.011 \times 10^6$  in D8. Nell'ultimo end-point al dosaggio maggiore (D5) la conta cellulare media è pari a  $18.54 \pm 0.034 \times 10^6$  seguita da  $17.86 \pm 0.023 \times 10^6$  per D6,  $17.75 \pm 0.019 \times 10^6$  per D7 e  $17.25 \pm 0.035 \times 10^6$  per D8.

I confronti statistici per ET-1 tra i diversi campioni dimostrano una significatività per tutte le coppie di raffronti effettuati, evidenziando un effetto stimolatorio del peptide in relazione alla concentrazione fornita e al tempo di esposizione.

- *LINEA HL-60 CEPPO CRO (FIGURA 17 PER ADM, FIGURA 21 PER ET-1)*

Nelle colture in assenza dei peptidi (controllo) le conte cellulari medie corrispondono a  $0.90 \pm 0.001 \times 10^6$  per le 24 ore,  $3.52 \pm 0.027 \times 10^6$  per le 48 ore e  $7.35 \pm 0.018 \times 10^6$  per le 72 ore.

Le conte cellulari medie nelle colture trattate con ADM sono per le 24 ore:  $3.46 \pm 0.023 \times 10^6$  per D1,  $3.09 \pm 0.057 \times 10^6$  per D2,  $2.51 \pm 0.043 \times 10^6$  per D3 e  $2.30 \pm 0.064 \times 10^6$  per D4. Anche per questa linea, nel secondo end-point (48ore) il conteggio emocitometrico conferma un aumento dose-dipendente:  $9.12 \pm 0.049 \times 10^6$  in D1,  $8.45 \pm 0.119 \times 10^6$  in D2,  $7.61 \pm 0.175 \times 10^6$  in D3 e  $7.27 \pm 0.049 \times 10^6$  in D4. I risultati si ripetono alle 72 ore rilevando un incremento nella conta cellulare dipendente dalla quantità di peptide fornito:  $17.60 \pm 0.089 \times 10^6$  per D1,  $15.31 \pm 0.185 \times 10^6$  per D2,  $13.81 \pm 0.115 \times 10^6$  per D3 e  $12.11 \pm 0.066 \times 10^6$  per D4.

I confronti statistici tra i controlli e i trattati evidenziano che ADM ha effetti induttivi significativi per tutte le coppie di confronti effettuati (Figura 17), con una risposta dose-dipendente e tempo-dipendente.

Nei saggi di crescita con ET-1 le conte cellulari evidenziano un aumento rispetto ai controlli, in particolare nelle 24 ore:  $3.49 \pm 0.043 \times 10^6$  per D5,  $3.05 \pm 0.036 \times 10^6$  per D6,  $2.41 \pm 0.075 \times 10^6$  per D7 e  $2.22 \pm 0.045 \times 10^6$  per D8. Allo stesso modo alle 48 ore l'NC<sub>totali</sub> contate corrisponde a:  $8.85 \pm 0.015 \times 10^6$  in D5,  $7.82 \pm 0.016 \times 10^6$  in D6,  $7.40 \pm 0.036 \times 10^6$  in D7 e  $6.63 \pm 0.049 \times 10^6$  in D8. Nell'ultimo end-point al dosaggio maggiore (D5) la conta cellulare media è pari a  $16.28 \pm 0.121 \times 10^6$  seguita da  $15.82 \pm 0.183 \times 10^6$  per D6,  $13.56 \pm 0.152 \times 10^6$  per D7 e  $12.41 \pm 0.274 \times 10^6$  per D8.

I confronti statistici per ET-1 dimostrano una significatività per tutte le coppie di raffronti effettuati con un effetto stimolatorio tempo e dose dipendente.

- *LINEA HL-60 CEPPO BANCA (FIGURA 18 PER ADM, FIGURA 22 PER ET-1)*

La conta cellulare media delle colture di controllo è pari a  $1.90 \pm 0.007 \times 10^6$  per le 24 ore,  $6.66 \pm 0.006 \times 10^6$  per le 48 ore e  $14.97 \pm 0.039 \times 10^6$  per le 72 ore.

Nelle colture trattate con ADM le conte cellulari medie sono per le 24 ore:  $9.25 \pm 0.022 \times 10^6$  per D1,  $7.97 \pm 0.037 \times 10^6$  per D2,  $6.49 \pm 0.021 \times 10^6$  per D3 e  $4.97 \pm 0.017 \times 10^6$  per D4. Anche per questa linea, nel secondo end-point (48ore) il conteggio emocitometrico conferma un aumento dose-dipendente:  $19.19 \pm 0.024 \times 10^6$  in D1,  $15.45 \pm 0.022 \times 10^6$  in D2,  $12.28 \pm 0.016 \times 10^6$  in D3 e  $11.05 \pm 0.013 \times 10^6$  in D4. I risultati si ripetono alle 72 ore rilevando un incremento

nella conta cellulare dipendente dalla quantità di peptide fornito:  $27.50 \pm 0.032 \times 10^6$  per D1,  $25.36 \pm 0.025 \times 10^6$  per D2,  $21.25 \pm 0.016 \times 10^6$  per D3 e  $19.85 \pm 0.023 \times 10^6$  per D4.

I confronti statistici tra i controlli e i trattati evidenziano che ADM ha effetti induttivi significativi per tutte le coppie di confronti effettuati (Figura 18), con una risposta dose-dipendente e tempo-dipendente.

Nei saggi di crescita con ET-1 le conte cellulari evidenziano un aumento rispetto ai controlli, in particolare nelle 24 ore:  $8.96 \pm 0.027 \times 10^6$  per D5,  $7.74 \pm 0.037 \times 10^6$  per D6,  $5.17 \pm 0.025 \times 10^6$  per D7 e  $4.51 \pm 0.002 \times 10^6$  per D8. Allo stesso modo alle 48 ore l'NC<sub>totali</sub> contate corrisponde a:  $16.37 \pm 0.037 \times 10^6$  in D5,  $14.83 \pm 0.031 \times 10^6$  in D6,  $12.17 \pm 0.020 \times 10^6$  in D7 e  $10.92 \pm 0.021 \times 10^6$  in D8. Nell'ultimo end-point al dosaggio maggiore (D5) la conta cellulare media è pari a  $26.31 \pm 0.439 \times 10^6$  seguita da  $24.33 \pm 0.039 \times 10^6$  per D6,  $20.75 \pm 0.037 \times 10^6$  per D7 e  $19.37 \pm 0.023 \times 10^6$  per D8.

I confronti statistici anche per ET-1 dimostrano una significatività per tutte le coppie di raffronti effettuati, evidenziando un effetto stimolatorio del peptide in relazione alla concentrazione fornita e al tempo di esposizione.

- *LINEA KASUMI-1 (FIGURA 19 PER ADM, FIGURA 23 PER ET-1)*

La conta cellulare media delle colture di controllo è pari a  $6.321 \pm 0.021 \times 10^6$  per le 24 ore,  $8.59 \pm 0.009 \times 10^6$  per le 48 ore e  $11.11 \pm 0.012 \times 10^6$  per le 72 ore.

Nelle colture trattate con ADM le conte cellulari medie sono per le 24 ore:  $14.24 \pm 0.020 \times 10^6$  per D1,  $13.81 \pm 0.027 \times 10^6$  per D2,  $12.74 \pm 0.045 \times 10^6$  per D3 e  $11.36 \pm 0.037 \times 10^6$  per D4. Anche per questa linea, nel secondo end-point (48ore) il conteggio emocitometrico conferma un aumento dosaggio dipendente:  $16.14 \pm 0.033 \times 10^6$  in D1,  $14.75 \pm 0.034 \times 10^6$  in D2,  $12.78 \pm 0.014 \times 10^6$  in D3 e  $11.77 \pm 0.014 \times 10^6$  in D4. I risultati si ripetono alle 72 ore rilevando un incremento nella conta cellulare dipendente dalla quantità di peptide fornito:  $18.73 \pm 0.026 \times 10^6$  per D1,  $17.36 \pm 0.019 \times 10^6$  per D2,  $16.11 \pm 0.014 \times 10^6$  per D3 e  $15.39 \pm 0.015 \times 10^6$  per D4.

I confronti statistici tra i controlli e i trattati evidenziano che ADM ha effetti induttivi significativi per tutte i confronti effettuati (Figura 19), con una risposta dose-dipendente e tempo-dipendente.

Anche per questa linea nei saggi di crescita con ET-1 le conte cellulari evidenziano un aumento rispetto ai controlli, in particolare nelle 24 ore:  $14.04 \pm 0.022 \times 10^6$  per D5,  $13.66 \pm 0.024 \times 10^6$  per D6,  $12.08 \pm 0.036 \times 10^6$  per D7 e  $11.15 \pm 0.022 \times 10^6$  per D8. Allo stesso modo alle 48 ore l'NC<sub>totali</sub> contate corrisponde a:  $16.01 \pm 0.022 \times 10^6$  in D5,  $13.91 \pm 0.042 \times 10^6$  in D6,  $11.99 \pm 0.056 \times 10^6$  in D7 e  $11.24 \pm 0.088 \times 10^6$  in D8.

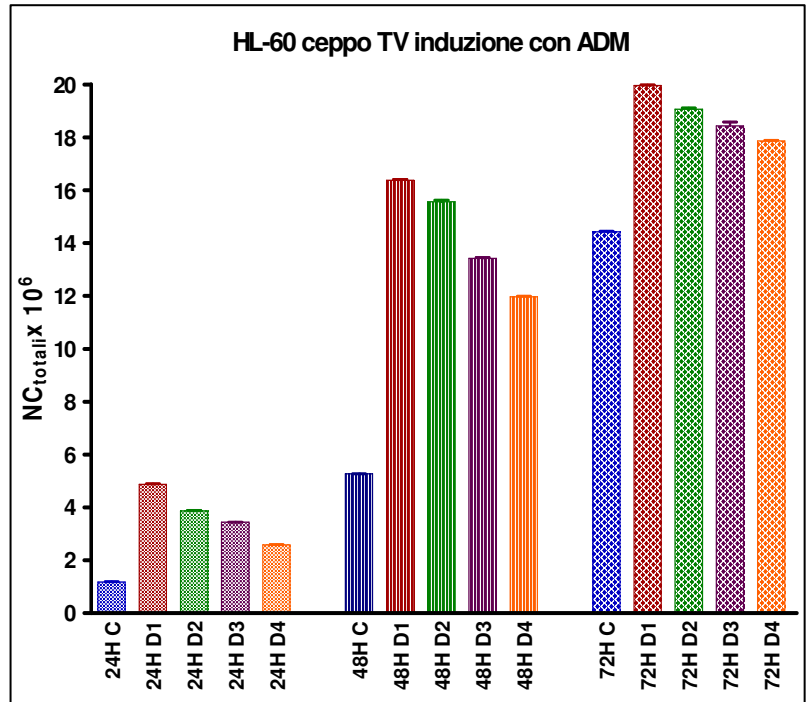
Nell'ultimo end-point al dosaggio maggiore (D5) la conta cellulare media è pari a  $17.43 \pm 0.012 \times 10^6$  seguita da  $16.78 \pm 0.013 \times 10^6$  per D6,  $15.96 \pm 0.032 \times 10^6$  per D7 e  $14.90 \pm 0.043 \times 10^6$  per D8.

I confronti statistici per ET-1 dimostrano una significatività per tutte le coppie di raffronti effettuati, evidenziando un effetto stimolatorio del peptide in relazione alla concentrazione fornita e al tempo di esposizione.

24 H	C			
D1	***	D1		
D2	*	*	D2	
D3	*	*	*	D3
D4	*	*	*	*

48 H	C			
D1	***	D1		
D2	*	*	D2	
D3	*	*	*	D3
D4	*	*	*	*

72 H	C			
D1	***	D1		
D2	*	*	D2	
D3	*	*	*	D3
D4	*	*	*	*



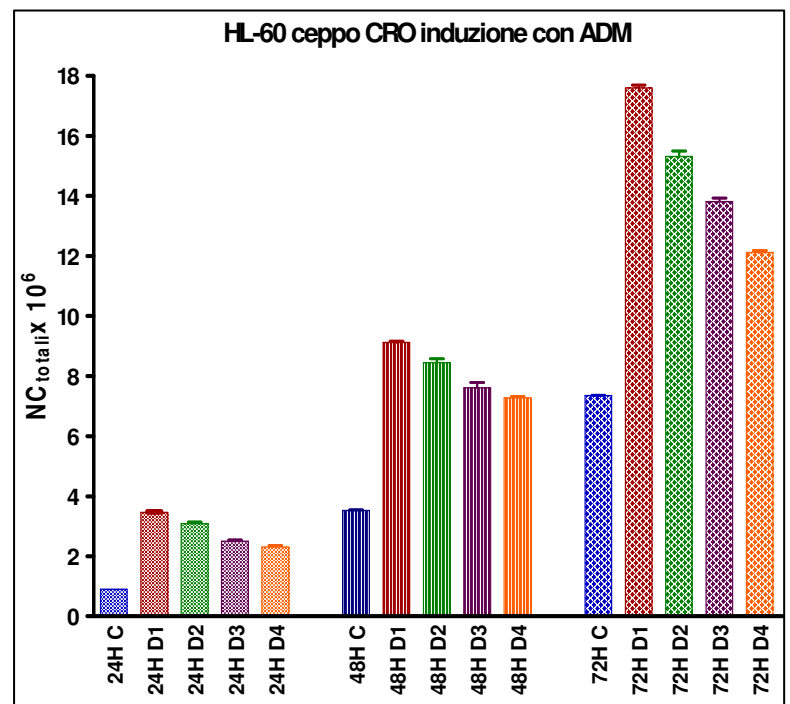
\*\*\*=P<0.001; \*=P<0.05

**Fig. 16:** risultati dei saggi di crescita a breve termine per valutare gli effetti induttivi di ADM sulla linea HL-60 ceppo TV a quattro dosaggi oltre al controllo (C):  $5 \times 10^{-8}M$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D4). I risultati sono espressi in istogrammi come  $NC_{totali} \times 10^6 \pm$  deviazione standard, raggruppati nei tre end-point 24, 48 e 72 ore.

24 H	C			
D1	***	D1		
D2	*	*	D2	
D3	*	*	*	D3
D4	*	*	*	*

48 H	C			
D1	***	D1		
D2	*	*	D2	
D3	*	*	*	D3
D4	*	*	*	*

72 H	C			
D1	***	D1		
D2	*	*	D2	
D3	*	*	*	D3
D4	*	*	*	*



\*\*\*=P<0.001; \*=P<0.05

**Fig. 17:** risultati dei saggi di crescita a breve termine per valutare gli effetti induttivi di ADM sulla linea HL-60 ceppo CRO a quattro dosaggi oltre al controllo (C):  $5 \times 10^{-8}M$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D4). I risultati sono espressi in istogrammi come  $NC_{totali} \times 10^6 \pm$  deviazione standard, raggruppati nei tre end-point 24, 48 e 72 ore.

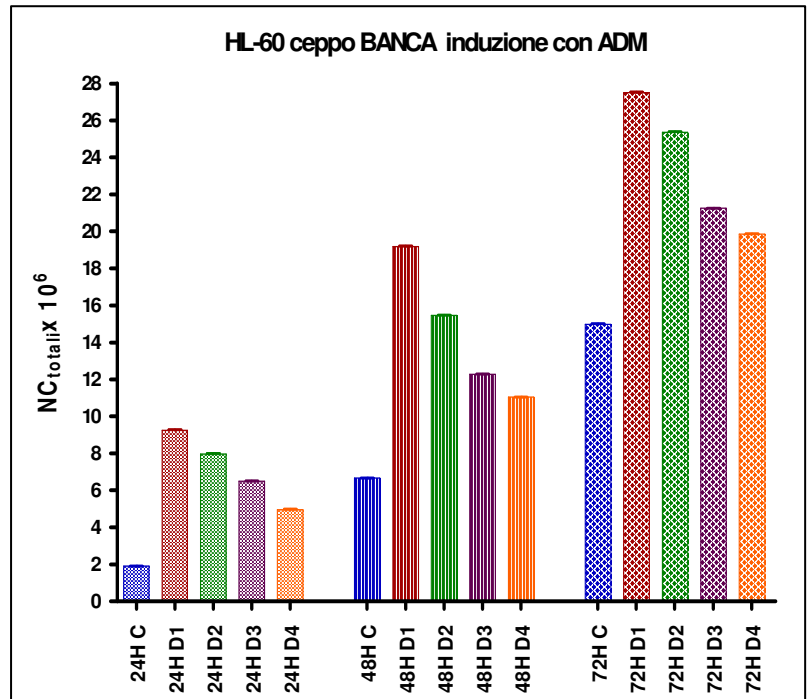


24 H	C			
D1	***	D1		
D2	*	*	D2	
D3	*	*	*	D3
D4	*	*	*	*

48 H	C			
D1	***	D1		
D2	*	*	D2	
D3	*	*	*	D3
D4	*	*	*	*

72 H	C			
D1	***	D1		
D2	*	*	D2	
D3	*	*	*	D3
D4	*	*	*	*

\*\*\*=P<0.001; \*=P<0.05



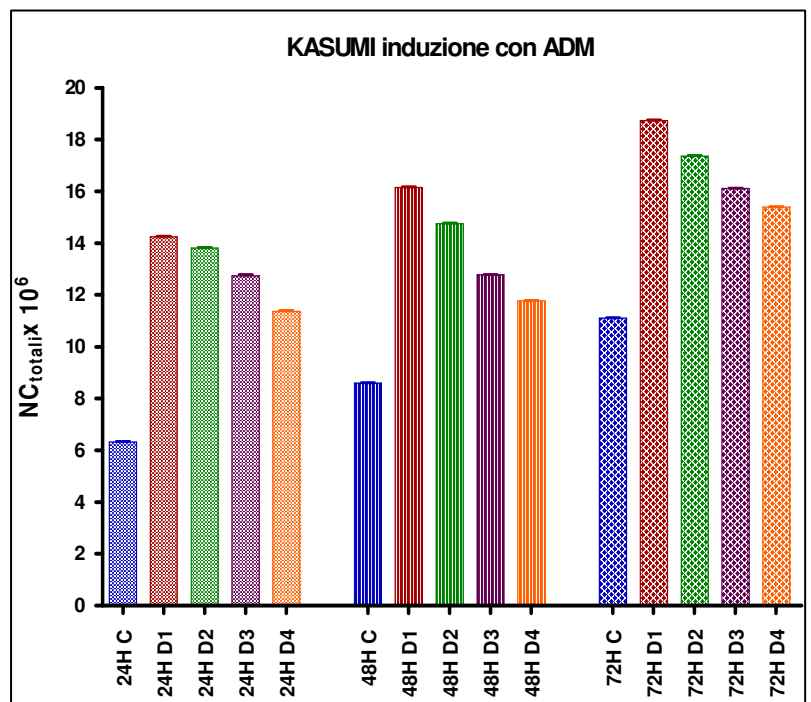
**Fig. 18:** risultati dei saggi di crescita a breve termine per valutare gli effetti induttivi di ADM sulla linea HL-60 ceppo BANCA a quattro dosaggi oltre al controllo (C):  $5 \times 10^{-8}M$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D4). I risultati sono espressi in istogrammi come  $NC_{totali} \times 10^6 \pm$  deviazione standard, raggruppati nei tre end-point 24, 48 e 72 ore.

24 H	C			
D1	***	D1		
D2	*	*	D2	
D3	*	*	*	D3
D4	*	*	*	*

48 H	C			
D1	***	D1		
D2	*	*	D2	
D3	*	*	*	D3
D4	*	*	*	*

72 H	C			
D1	***	D1		
D2	*	*	D2	
D3	*	*	*	D3
D4	*	*	*	*

\*\*\*=P<0.001; \*=P<0.05



**Fig. 19:** risultati dei saggi di crescita a breve termine per valutare gli effetti induttivi di ADM sulla linea KASUMI-1 a quattro dosaggi oltre al controllo (C):  $5 \times 10^{-8}M$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D4). I risultati sono espressi in istogrammi come  $NC_{totali} \times 10^6 \pm$  deviazione standard, raggruppati nei tre end-point 24, 48 e 72 ore.



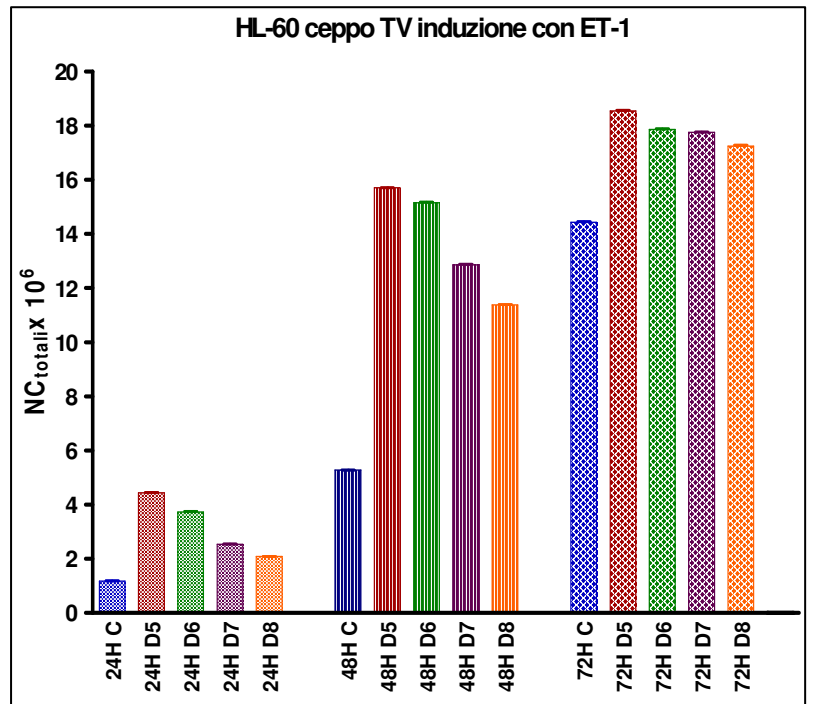


24 H	C			
D4	***	D4		
D5	*	*	D5	
D6	*	*	*	D6
D7	*	*	*	*

48 H	C			
D4	***	D4		
D5	*	*	D5	
D6	*	*	*	D6
D7	*	*	*	*

72 H	C			
D4	***	D4		
D5	*	*	D5	
D6	*	*	*	D6
D7	*	*	*	*

\*\*\*=P<0.001; \*=P<0.05



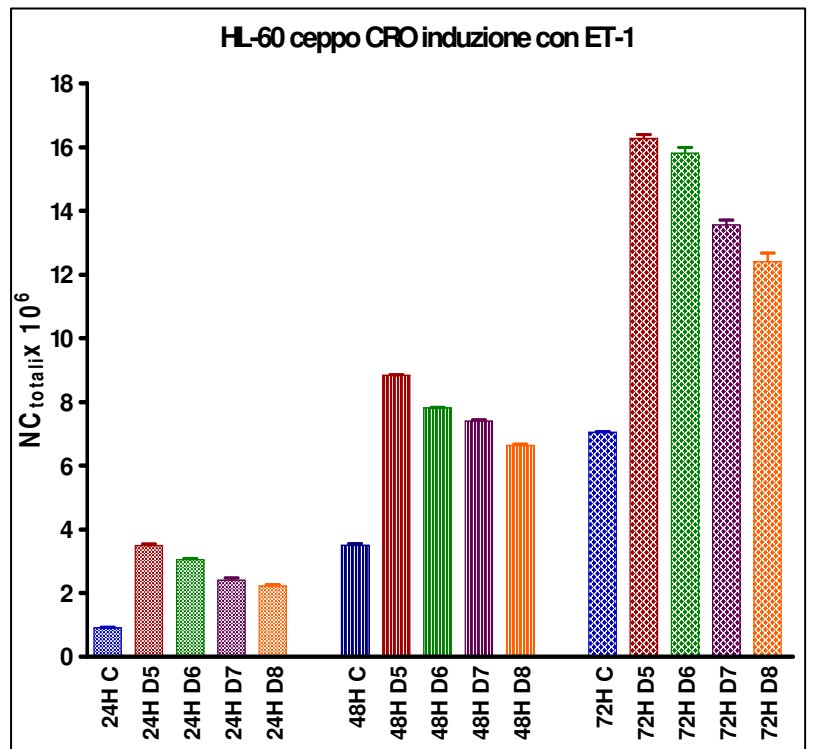
**Fig. 20:** risultati dei saggi di crescita a breve termine per valutare gli effetti induttivi di ET-1 sulla linea HL-60 ceppo TV a quattro dosaggi oltre al controllo (C):  $5 \times 10^{-8}$ M (D5),  $2.5 \times 10^{-8}$ M (D6),  $1.25 \times 10^{-8}$ M (D7) e  $0.625 \times 10^{-8}$ M (D8). I risultati sono espressi in istogrammi come  $NC_{totali} \times 10^6 \pm$  deviazione standard, raggruppati nei tre end-point 24, 48 e 72 ore.

24 H	C			
D4	***	D4		
D5	*	*	D5	
D6	*	*	*	D6
D7	*	*	*	*

48 H	C			
D4	***	D4		
D5	*	*	D5	
D6	*	*	*	D6
D7	*	*	*	*

72 H	C			
D4	***	D4		
D5	*	*	D5	
D6	*	*	*	D6
D7	*	*	*	*

\*\*\*=P<0.001; \*=P<0.05



**Fig. 21:** risultati dei saggi di crescita a breve termine per valutare gli effetti induttivi di ET-1 sulla linea HL-60 ceppo CRO a quattro dosaggi oltre al controllo (C):  $5 \times 10^{-8}$ M (D5),  $2.5 \times 10^{-8}$ M (D6),  $1.25 \times 10^{-8}$ M (D7) e  $0.625 \times 10^{-8}$ M (D8). I risultati sono espressi in istogrammi come  $NC_{totali} \times 10^6 \pm$  deviazione standard, raggruppati nei tre end-point 24, 48 e 72 ore.

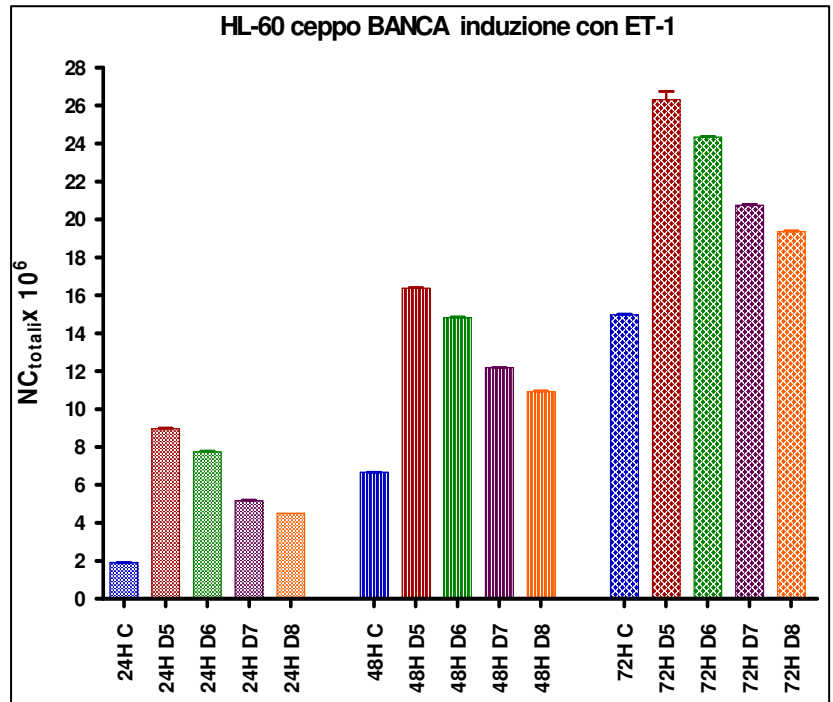


24 H	C			
D4	***	D4		
D5	*	*	D5	
D6	*	*	*	D6
D7	*	*	*	*

48 H	C			
D4	***	D4		
D5	*	*	D5	
D6	*	*	*	D6
D7	*	*	*	*

72 H	C			
D4	***	D4		
D5	*	*	D5	
D6	*	*	*	D6
D7	*	*	*	*

\*\*\*=P<0.001; \*=P<0.05



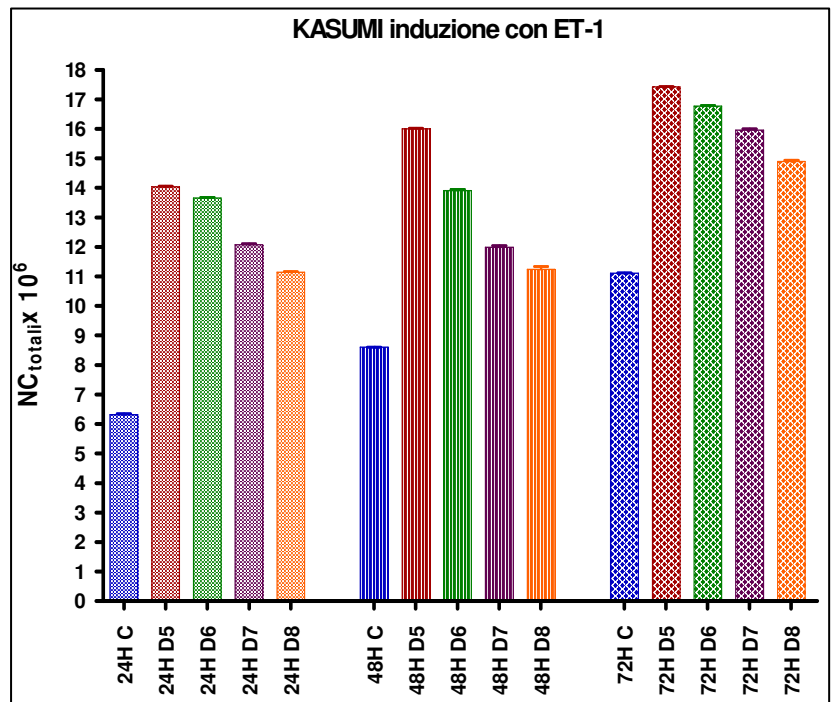
**Fig. 22:** risultati dei saggi di crescita a breve termine per valutare gli effetti induttivi di ET-1 sulla linea HL-60 ceppo BANCA a quattro dosaggi oltre al controllo (C):  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D5),  $2.5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D6),  $1.25 \times 10^{-8} \text{M}$  (D7) e  $0.625 \times 10^{-8} \text{M}$  (D8). I risultati sono espressi in istogrammi come  $\text{NC}_{\text{totali}} \times 10^6 \pm$  deviazione standard, raggruppati nei tre end-point 24, 48 e 72 ore.

24 H	C			
D4	***	D4		
D5	*	*	D5	
D6	*	*	*	D6
D7	*	*	*	*

48 H	C			
D4	***	D4		
D5	*	*	D5	
D6	*	*	*	D6
D7	*	*	*	*

72 H	C			
D4	***	D4		
D5	*	*	D5	
D6	*	*	*	D6
D7	*	*	*	*

\*\*\*=P<0.001; \*=P<0.05



**Fig. 23:** risultati dei saggi di crescita a breve termine per valutare gli effetti induttivi di ET-1 sulla linea KASUMI-1 a quattro dosaggi oltre al controllo (C):  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D5),  $2.5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D6),  $1.25 \times 10^{-8} \text{M}$  (D7) e  $0.625 \times 10^{-8} \text{M}$  (D8). I risultati sono espressi in istogrammi come  $\text{NC}_{\text{totali}} \times 10^6 \pm$  deviazione standard, raggruppati nei tre end-point 24, 48 e 72 ore.



## **§2.2 ESPRESSIONE DEI MARKER DI DIFFERENZIAZIONE GRANULOCITARIA POST-ESPOSIZIONE AD ADM ED ET-1**

I risultati della caratterizzazione citofluorimetrica dei *marker* di differenziazione granulocitaria post esposizione ad ADM ed ET-1, sono riportati nelle Tabelle XI, XII, XIII e XIV per quanto riguarda ADM e nelle Tabelle XV, XVI, XVII e XVIII per ET-1. I valori sono riportati come percentuale di espressione del marcatore  $\pm$  deviazione *standard*.

- *LINEA HL-60 CEPPPO TV (TABELLA XI PER ADM, TABELLA XV PER ET-1)*

L'espressione antigenica delle cellule esposte a tutti e quattro i dosaggi di ADM rispetto ai controlli rimane pressoché invariata. Fa eccezione l'antigene CD11b che diminuisce percentualmente nei trattati rispetto ai controlli, con valori che sembrano dipendere, in parte, dal dosaggio di peptide fornito alla linea. Anche l'espressione del CD33 sembra diminuire in maniera inversamente proporzionale al dosaggio passando dal 99.6% nel controllo al 86.7% in D1, 84.2% in D2, 84.6% in D3 e 83.4% in D4.

Anche nei trattati con ET-1 diminuisce in percentuale l'espressione del CD11b, in particolare dal 75.1% del controllo al 68.5% in D5, al 62.5% in D6, al 61.6% in D7 e al 67.7% in D8. Nello stesso modo si registra un decremento dell'espressione di CD33 dal 99.7% del controllo al 87.3% in D5, 83.9% in D6, 86.6% in D7 e 83.4% in D8

- *LINEA HL-60 CEPPPO CRO (TABELLA XII PER ADM, TABELLA XVI PER ET-1)*

Nei quattro trattati con ADM si ha un aumento percentuale dell'espressione del CD4 rispetto al controllo, inverso all'aumento della concentrazione del peptide. Inoltre è visibile una diminuzione dell'espressione di CD11b simile per i tre dosaggi maggiori, che decrementa ulteriormente nella concentrazione minore. L'espressione del CD33 diminuisce dal 99.4% del controllo al 87.4% in D1, al 84.7% in D2, al 88.1% in D3 e all'88.7% in D4.

Per ET-1 nei trattati si osserva rispetto al controllo (99.3%) una diminuzione percentuale dell'espressione del CD11b all'88.7% in D5, all'89.2% in D6, all'87.8% in D7 e al 86.6% in D8. L'espressione del CD33 è pari al 98.4% nel controllo, 88.4% in D5, 85.4% in D6, 88.1% in D7 e 88.7% in D8.

- *LINEA HL-60 CEPPPO BANCA (TABELLA XIII PER ADM, TABELLA. XVII PER ET-1)*

Le cellule di questa linea non subiscono molte variazioni a livello immunocitometrico nei trattati rispetto ai controlli, ad eccezione dell'espressione del CD33 che

diminuisce dal 100% del controllo al 88.9% in D1, al 88.8% in D2, al 89% in D3 e all'86.5% in D4. L'espressione del CD11b diminuisce maggiormente nei dosaggi minori con un decremento dal 97.6% del controllo al 90.2% in D3 e al 91.2% in D4.

Nei saggi di crescita con ET, le cellule di questa linea esprimono in modo simile al controllo l'antigene CD11b. Si osserva una variazione nell'espressione del CD33 con un decremento dal 99.0% del controllo al 89.2% in D5, al 87.4% in D6, al 88.7% in D7 e al 87.5% in D8.

- *LINEA KASUMI-1 (TABELLA. XIV PER ADM, TABELLA XVIII PER ET-1)*

In questa linea l'espressione del CD11b diminuisce dal 74.2% del controllo al 64.6% in D1, al 66% in D2, al 62% in D3 e all'65.3% in D4. Inoltre, l'antigene CD33 diminuisce dal 89.4% del controllo al 79.2% in D1, al 78.7% in D2, al 78.7% in D3 e all'73.3% in D4.

Nei trattati con ET-1 si verifica un decremento percentuale nell'espressione del CD11b con minime differenze tra le quattro concentrazioni testate. L'antigene CD33 diminuisce in percentuale dal 99.4% del controllo al 77.9% in D5, al 77.7% in D6, al 78.7% in D7 e al 78% in D8.

MARCATORI	HL-60 ceppo TV induzione con ADM				
	C	D1	D2	D3	D4
HLA-DR	1.6±0.44	1.5±0.1	1.3±0.49	1.6±0.15	1.4±0.44
CD4	1.0±0.61	0.9±0.03	1.5±1.00	0.9±0.62	1.0±0.10
CD11B	72.7±2.46	67.4±0.76	65.8±4.39	63.5±2.37	65.3±0.46
CD14	83.5±0.52	83.5±0.36	83.9±0.21	84.3±0.25	83.1±0.15
CD15	7.8±1.64	7.6±0.21	7.2±3.67	7.5±0.32	7.5±3.46
CD16	3.5±0.38	3.4±0.30	4.1±0.60	3.9±0.15	3.6±0.45
CD33	99.6±0.01	86.6±0.42	84.2±0.47	84.6±0.61	83.4±0.20
CD44	0.6±0.55	0.8±0.90	1.0±0.42	1.0±0.21	0.9±0.45
CD45	67.5±1.15	66.3±0.10	66.9±0.78	66.6±1.18	66.1±2.03

**Tab. XI :** risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea HL-60 ceppo TV dopo 72 ore di coltura con e senza ADM alle quattro concentrazioni testate:  $5 \times 10^{-8}M$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D4). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo  $\pm$  deviazione standard.

MARCATORI	HL-60 ceppo CRO induzione con ADM				
	C	D1	D2	D3	D4
HLA-DR	73.0±3.42	73.9±1.44	71.9±0.79	72.9±3.45	72.0±0.9
CD4	85.0±2.55	85.9±3.21	87.0±2.96	86.9±0.86	89.8±0.17
CD11B	99.6±0.25	89.0±1.44	89.5±0.55	89.8±0.12	87.9±2.33
CD14	99.5±0.02	99.8±0.06	99.3±0.50	98.9±0.47	98.9±0.95
CD15	100±0.00	99.5±0.40	99.6±0.21	99.8±0.20	99.6±0.32
CD16	28.3±0.60	28.6±0.51	28.7±2.59	28.9±0.62	28.0±1.75
CD33	99.4±0.05	87.3±2.31	84.7±1.57	88.1±3.20	88.7±2.08
CD44	99.9±0.00	98.6±0.76	98.8±0.38	99.3±0.32	98.9±0.81
CD45	99.7±0.02	98.4±0.32	99.6±0.23	99.6±0.05	99.4±0.01

**Tab. XII :** risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea HL-60 ceppo CRO dopo 72 ore di coltura con e senza ADM alle quattro concentrazioni testate:  $5 \times 10^{-8}M$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D4). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo  $\pm$  deviazione standard.

MARCATORI	HL-60 ceppo BANCA induzione con ADM				
	C	D1	D2	D3	D4
HLA-DR	3.9±0.72	3.3±2.21	3.5±0.71	3.8±0.36	3.4±0.76
CD4	99.1±0.03	99.1±0.02	99.5±0.29	98.4±0.50	99.4±0.01
CD11B	97.5±1.81	98.0±1.30	93.5±2.71	90.2±1.67	91.2±1.74
CD14	44.2±0.58	45.5±0.058	45.3±0.11	44.8±0.06	44±3.97
CD15	99.2±0.05	99.6±0.05	99.7±0.05	99.4±0.01	99.4±0.42
CD16	82.5±0.70	82.4±3.56	83.8±2.86	82.1±4.32	83.1±4.32
CD33	100±0.00	88.8±0.32	88.7±0.06	89.0±0.15	86.5±0.15
CD44	99.6±0.03	99.8±0.04	99.8±0.06	99.8±0.14	98.0±0.85
CD45	99.7±0.10	99.4±0.09	99.0±0.95	98.7±0.18	99.7±0.84

**Tab. XIII** risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea HL-60 ceppo BANCA dopo 72 ore di coltura con e senza ADM alle quattro concentrazioni testate:  $5 \times 10^{-8}M$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D4). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo  $\pm$  deviazione standard.

MARCATORI	KASUMI-1 induzione con ADM				
	C	D1	D2	D3	D4
HLA-DR	99.2±0.11	99.9±0.10	99.2±0.17	99.4±0.60	98.8±0.05
CD4	99.8±0.15	98.2±0.16	99.4±0.04	98.5±1.00	98.3±0.72
CD11B	74.1±0.11	64.6±0.41	66.0±0.44	62.0±0.25	65.3±0.40
CD14	6.2±0.31	6.4±0.7	6.4±0.29	6.3±0.36	6.4±0.50
CD15	84.5±4.25	85.4±3.12	84.8±3.44	85.6±1.14	85±4.19
CD16	32.3±1.09	32.8±1.93	32.2±1.93	32.1±1.12	32.1±2.79
CD33	89.3±1.26	79.2±2.69	78.7±1.92	78.6±0.64	73.3±2.52
CD44	99.6±0.01	99.0±0.01	99.9±0.05	99.4±0.09	99.6±0.30
CD45	98.2±0.70	99.2±0.57	99.9±0.00	99.3±0.51	99.5±0.50

**Tab. XIV** risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea KASUMI-1 dopo 72 ore di coltura con e senza ADM alle quattro concentrazioni testate:  $5 \times 10^{-8}M$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D4). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo  $\pm$  deviazione standard.



MARCATORI	HL-60 ceppo TV induzione con ET-1				
	C	D5	D6	D7	D8
HLA-DR	0.5±0.31	1.0±0.1	0.9±0.21	1.0±0.26	0.6±0.21
CD4	1.2±0.20	1.2±0.42	1.3±0.15	1.1±0.62	1.2±0.52
CD11B	75.1±1.33	68.4±0.76	62.5±2.68	61.5±0.35	67.7±0.64
CD14	83.1±0.1	84.5±0.21	84.9±0.26	84.3±0.15	84.1±0.10
CD15	7.4±2.35	7.9±0.21	7.8±0.21	7.3±0.32	7.3±0.79
CD16	3.6±0.01	3.6±0.26	3.5±0.42	3.6±0.32	3.5±0.61
CD33	99.7±0.03	87.3±0.06	83.8±0.31	86.6±0.32	83.4±0.10
CD44	0.8±0.21	1.1±0.36	1.0±0.38	1.0±0.20	0.9±0.10
CD45	68.1±0.40	68.4±0.06	68±0.44	69.9±0.65	68.4±0.81

**Tab. XV :** risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea HL-60 ceppo TV dopo 72 ore di coltura con e senza ET-1 alle quattro concentrazioni testate:  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D5),  $2.5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D6),  $1.25 \times 10^{-8} \text{M}$  (D7) e  $0.625 \times 10^{-8} \text{M}$  (D8). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo  $\pm$  deviazione standard.

MARCATORI	HL-60 ceppo CRO induzione con ET-1				
	C	D5	D6	D7	D8
HLA-DR	77.0±1.72	77.9±1.44	77.5±0.75	77.9±1.74	77.4±0.53
CD4	84.7±0.5	84.6±2.31	84.7±1.47	84.9±0.82	85.1±0.36
CD11B	99.2±0.08	88.7±0.08	89.2±0.01	87.8±0.15	86.5±0.95
CD14	98.2±0.42	98.3±0.42	98.3±0.31	98.2±0.32	98.9±0.25
CD15	99.3±0.53	99.6±0.29	99.3±0.21	99.7±0.01	99.9±0.05
CD16	28.6±0.75	28.9±0.68	27.7±1.67	28.2±0.15	28.3±0.23
CD33	98.4±0.89	88.3±0.44	85.4±0.47	88.1±0.32	88.7±0.06
CD44	99.2±0.01	99.6±0.25	98.5±0.19	99.3±0.26	98.6±0.90
CD45	99.6±0.40	98.1±0.95	99±0.87	99.8±0.20	99.7±0.13

**Tab. XVI :** risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea HL-60 ceppo CRO dopo 72 ore di coltura con e senza ET-1 alle quattro concentrazioni testate:  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D5),  $2.5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D6),  $1.25 \times 10^{-8} \text{M}$  (D7) e  $0.625 \times 10^{-8} \text{M}$  (D8). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo  $\pm$  deviazione standard.

MARCATORI	HL-60 ceppo BANCA induzione con ET-1				
	C	D5	D6	D7	D8
HLA-DR	3.7±0.15	3.7±0.1	3.6±0.35	3.7±0.25	3.6±0.42
CD4	98.1±0.46	98.4±1.06	98.8±0.42	98.0±0.35	99.0±0.40
CD11B	99.4±0.18	97.8±0.6	99.2±0.61	98.5±0.59	99.6±0.21
CD14	43.9±0.26	43.2±0.31	43.7±0.40	44.1±1.06	43.3±1.11
CD15	99.4±0.26	99.4±0.53	99.7±0.15	99.7±0.20	99.7±0.26
CD16	84.5±0.83	84.1±0.35	83.4±1.15	84.1±2.44	84.1±0.82
CD33	99±0.47	89.2±0.21	87.4±0.15	88.7±0.46	87.5±0.32
CD44	99.7±0.03	99.3±0.55	99.7±0.26	98.8±0.64	98.9±0.00
CD45	99.4±0.26	99.1±0.66	98.8±0.44	99.5±0.42	98.8±0.72

**Tab. XVII** : risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea HL-60 ceppo BANCA dopo 72 ore di coltura con e senza ET-1 alle quattro concentrazioni testate:  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D5),  $2.5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D6),  $1.25 \times 10^{-8} \text{M}$  (D7) e  $0.625 \times 10^{-8} \text{M}$  (D8). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo  $\pm$  deviazione standard.

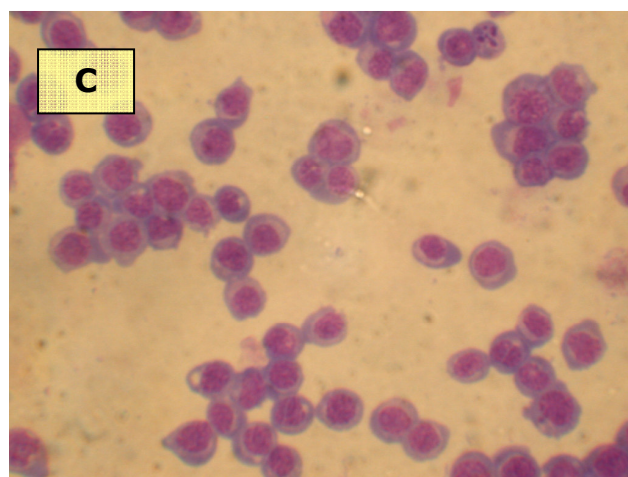
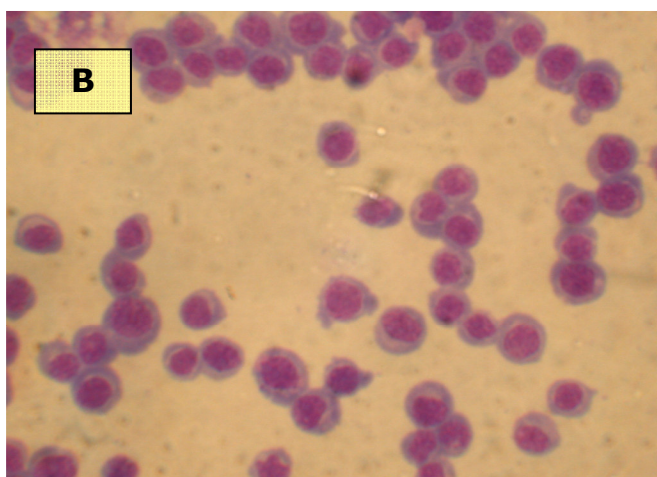
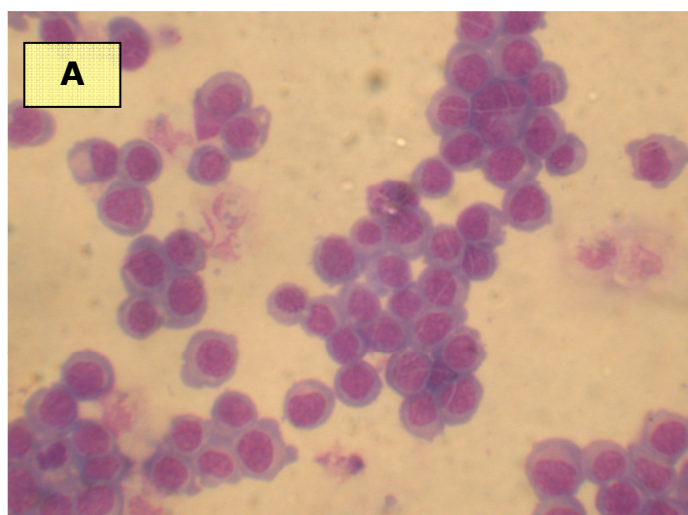
MARCATORI	KASUMI-1 induzione con ET-1				
	C	D5	D6	D7	D8
HLA-DR	99.4±0.3	99.2±0.40	99.3±0.98	98.7±0.42	99.0±0.67
CD4	99.6±0.25	99.0±0.55	99.4±0.45	98.7±0.40	99.1±0.7
CD11B	76.5±0.42	71.6±0.26	68.7±0.50	71.3±0.60	70.9±0.61
CD14	6.4±0.15	6.4±0.32	6.3±0.15	6.6±0.61	6.7±0.76
CD15	83.5±0.32	82.7±4.43	82.4±0.72	82.6±2.12	83.6±2.91
CD16	32.0±1.38	32.8±0.65	32.5±1.21	32.4±0.81	32.4±1.27
CD33	99.3±0.27	77.8±1.40	77.7±0.09	78.6±2.61	78±0.32
CD44	99.3±0.47	98.5±0.72	98.2±0.40	99.6±0.81	98.2±0.93
CD45	99.2±0.21	98.6±0.17	99.5±0.2	100±0.00	99.7±0.26

**Tab. XVIII** : risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea KASUMI-1 dopo 72 ore di coltura con e senza ET-1 alle quattro concentrazioni testate:  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D5),  $2.5 \times 10^{-8} \text{M}$  (D6),  $1.25 \times 10^{-8} \text{M}$  (D7) e  $0.625 \times 10^{-8} \text{M}$  (D8). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo  $\pm$  deviazione standard.

### **§2.3 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA POST-ESPOSIZIONE AD ADM ED ET-1**

In questa sperimentazione i preparati non rilevano differenze morfologiche tra i controlli e i trattati, come evidenziato, a titolo di esempio, nelle figure 24 e 25 che riportano immagini di cellule della linea HL-60 ceppo TV dopo esposizione ad ADM ed ET-1.

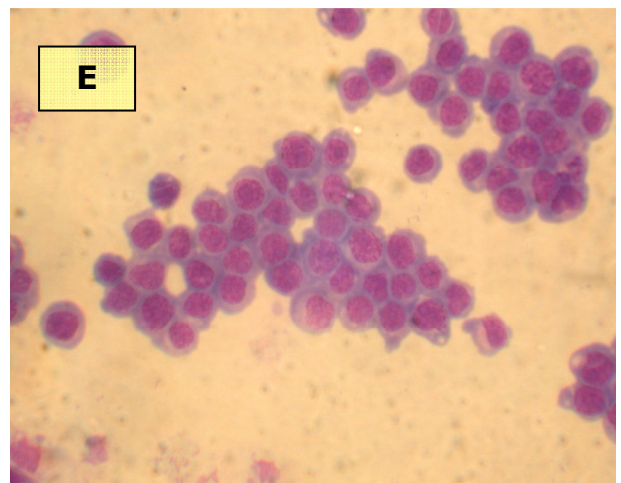
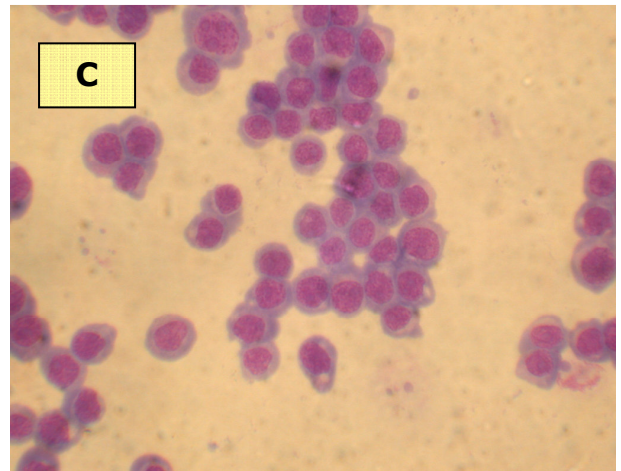
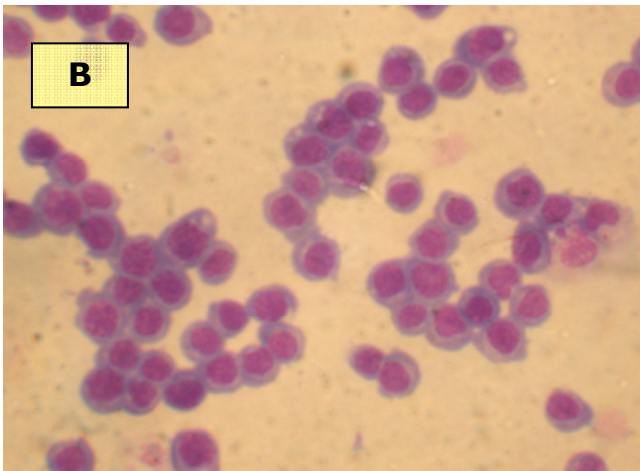
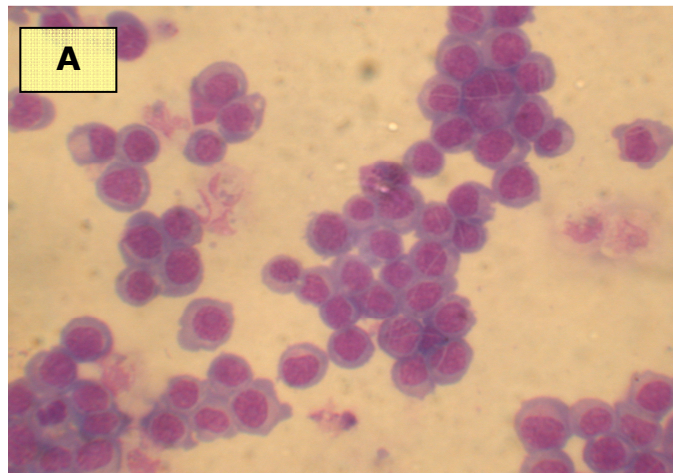




**Fig. 24:** immagini ottenute all'end-point del test colturale a breve termine (72 ore) con ADM del ceppo cellulare HL-60 TV. **(A)** Contr, **(B)** D1, **(C)** D2, **(D)** D3, **(E)** D4







**Fig. 25:** immagini ottenute all'end-point del test culturale a breve termine (72 ore) con ET-1 del ceppo cellulare HL-60 TV. **(A)** Contr, **(B)** D1, **(C)** D2, **(D)** D3, **(E)** D4





## **§2.4 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ INDUTTIVE DI ADM ED ET-1 MEDIANTE SAGGI CLONOGENICI IN TERRENO SEMISOLIDO**

I risultati della sperimentazione condotta per valutare gli effetti esercitati da ADM ed ET-1 sulla crescita clonale in terreno semisolido delle linee cellulari sono riassunti negli istogrammi delle Figure 26, 27, 28, e 29 come numero medio di CFU<sub>totali</sub> ± deviazione standard sviluppatesi nelle colture.

- *LINEA HL-60 CEPPPO TV (FIGURA 26)*

Il numero medio di CFU totali sviluppatesi nelle colture di controllo è pari a 185.4±67.68.

Nei test clonogenici eseguiti esponendo le cellule ad ADM, il numero medio di CFU è parti a: 250.6±88.88 per D1, 223.5±70.53 per D2, 215.9±76.44 per D3 e 184.4±76.10 per D4.

I confronti statistici rivelano che solo il dosaggio massimale di ADM induce un significativo incremento del numero medio di CFU.

Anche nei saggi di crescita con ET-1, il conteggio delle colonie evidenzia l'aumento nel numero di CFU delle colture trattate rispetto ai controlli, in particolare: 223.8±73.53 per D5, 209.4±69.66 per D6, 198.6±77.63 per D7 e 190.6±76.64 per D8.

Come per ADM, i confronti statistici indicano che ET-1 induce un significativo incremento del numero di CFU solo al dosaggio maggiore.

- *LINEA HL-60 CEPPPO CRO (FIGURA 27)*

Il numero medio di CFU contate per le HL-60 ceppo CRO di controllo è pari a 24.65±18.23.

Nei saggi a medio termine in presenza di ADM il numero medio di CFU corrisponde a: 46.30±38.49 per D1, 43.45±32.76 per D2, 35.15±25.18 per D3 e 34.25±21.03 per D4.

I confronti statistici evidenziano che ADM ha effetti induttivi sulla crescita clonale significativi per i due dosaggi maggiori di peptide (D1 e D2).

Anche nei test clonogenici con ET-1 le conte delle colonie evidenziano un aumento rispetto ai controlli, in particolare: 44.05±27.70 per D5, 45.30±30.50 per D6, 34.85±24.04 per D7 e 23.10±14.60 per D8.

I confronti statistici anche per ET-1 dimostrano una significatività nell'aumento del numero medio di CFU contate per i due dosaggi maggiori di peptide (D5 e D6).

- *LINEA HL-60 CEPPO BANCA (FIGURA 28)*

Il numero medio di CFU contate per le colture in assenza dei due peptidi è pari a  $131.6 \pm 43.69$ .

Nei saggi di crescita a medio termine in presenza di ADM le conte delle colonie medie sono:  $217.1 \pm 44.66$  per D1,  $200.2 \pm 40.50$  per D2,  $180.1 \pm 43.73$  per D3 e  $155.5 \pm 49.54$  per D4.

I confronti statistici evidenziano che ADM ha effetti induttivi significativi nella crescita clonogenica per i due dosaggi maggiori di peptide aggiunto al terreno semisolido (D1 e D2).

Anche nei saggi di crescita con ET-1 le conte delle CFU medie evidenziano un aumento nei trattati rispetto ai controlli, in particolare:  $201.2 \pm 57.19$  per D5,  $185.3 \pm 58.44$  per D6,  $155.8 \pm 34.18$  per D7 e  $136.7 \pm 34.81$  per D8.

I confronti statistici per ET-1 dimostrano una significatività nell'aumento del numero medio di CFU nel dosaggio maggiore (D5).

- *LINEA KASUMI-1 (FIGURA 29)*

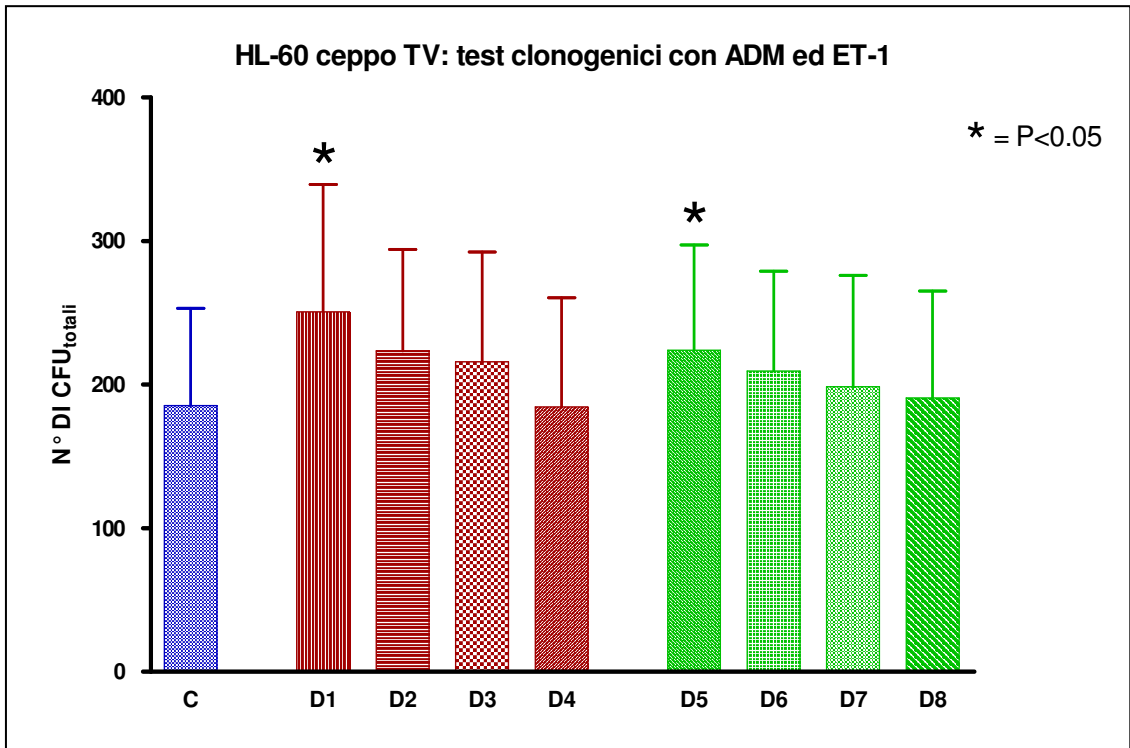
Nei test clonogenici il numero di CFU medie contate per il controllo è pari a  $47.95 \pm 37.00$ .

Nei saggi a medio termine in presenza di ADM il numero medio di CFU corrisponde a:  $95.55 \pm 47.58$  per D1,  $86.45 \pm 44.24$  per D2,  $74.64 \pm 39.23$  per D3 e  $65.55 \pm 44.25$  per D4.

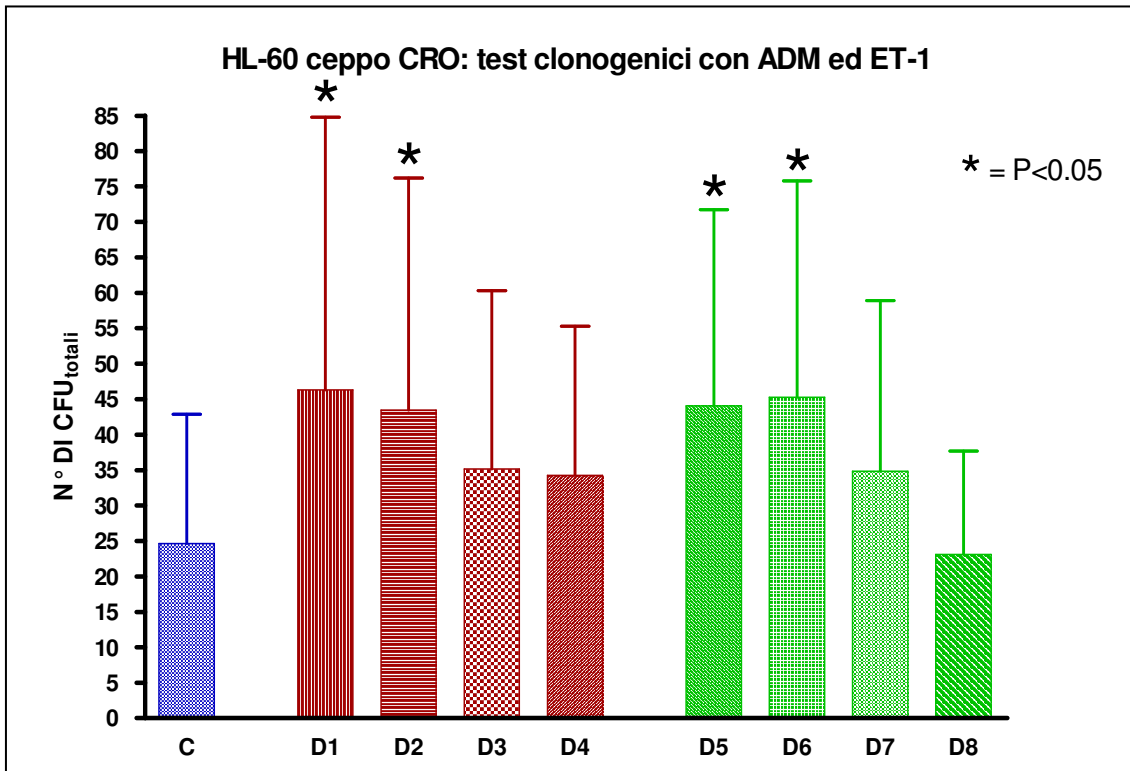
I confronti statistici evidenziano che ADM ha effetti induttivi sulla crescita clonale significativi per i due dosaggi maggiori di peptide (D1 e D2).

Anche nei saggi di crescita con ET-1, il conteggio delle colonie evidenzia un aumento nel numero di CFU nei trattati rispetto ai controlli, in particolare:  $100.7 \pm 56.98$  per D5,  $81.41 \pm 49.78$  per D6,  $70.82 \pm 42.60$  per D7 e  $61.86 \pm 46.66$  per D8.

I confronti statistici, indicano un aumento significativo del numero medio di CFU contate nei due dosaggi maggiori di ET-1 (D7 e D8).

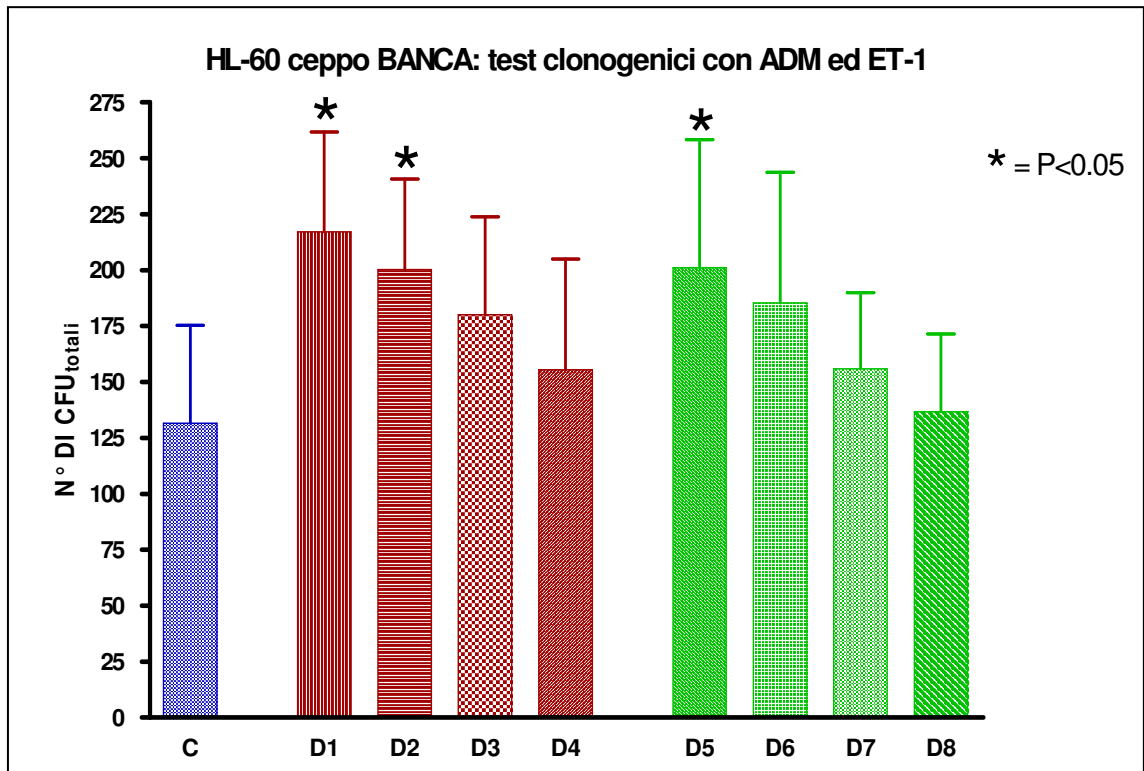


**Fig.26:** risultati dei saggi di crescita a medio termine in terreno semisolido per valutare gli effetti induttivi di ADM ed ET-1 sulla linea HL-60 ceppo TV a quattro dosaggi oltre al controllo (C):  $5 \times 10^{-8}M$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D4) per ADM e  $5 \times 10^{-8}M$  (D5),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D6),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D7) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D8) per ET-1. I risultati sono espressi in istogrammi come numero medio di CFU  $\pm$  deviazione standard (in rosso ADM, in verde ET-1, in BLU il controllo)

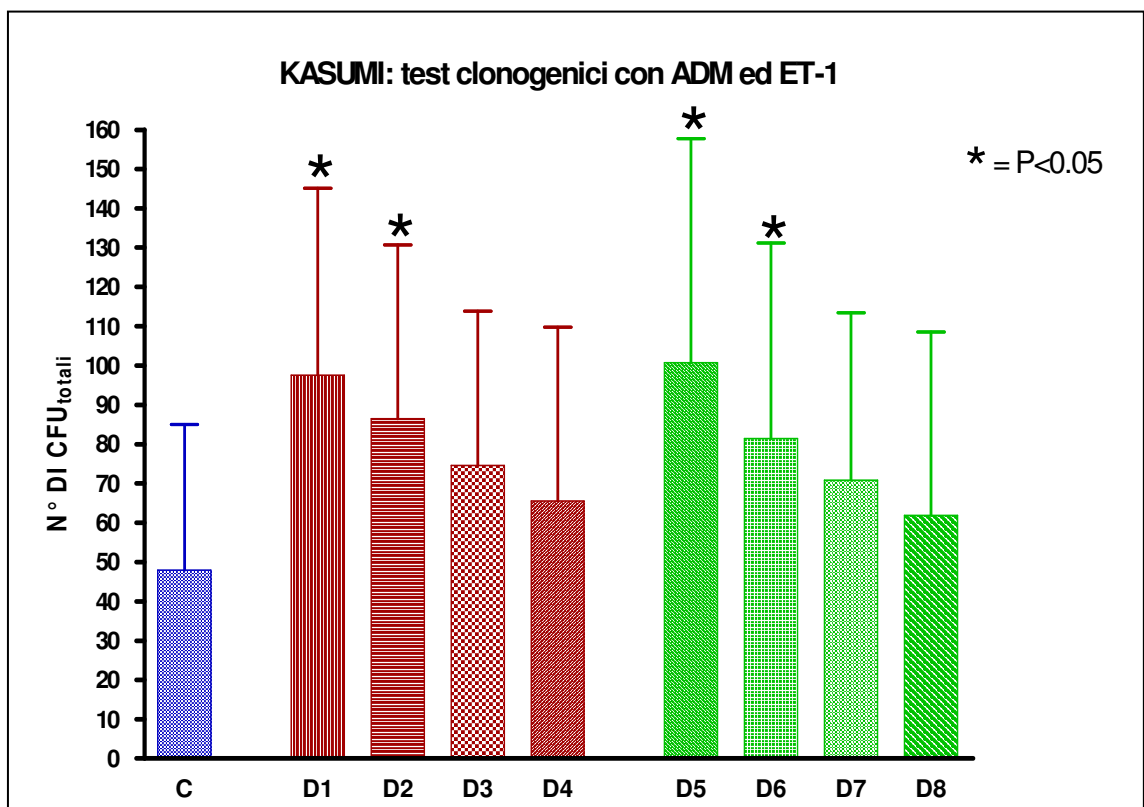


**Fig. 27:** risultati dei saggi di crescita a medio termine in terreno semisolido per valutare gli effetti induttivi di ADM ed ET-1 sulla linea HL-60 ceppo CRO a quattro dosaggi oltre al controllo (C):  $5 \times 10^{-8}M$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D4) per ADM e  $5 \times 10^{-8}M$  (D5),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D6),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D7) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D8) per ET-1. I risultati sono espressi in istogrammi come numero medio di CFU  $\pm$  deviazione standard (in rosso ADM, in verde ET-1, in BLU il controllo)





**Fig. 28:** risultati dei saggi di crescita a medio termine in terreno semisolido per valutare gli effetti induttivi di ADM ed ET-1 sulla linea HL-60 ceppo BANCA a quattro dosaggi oltre al controllo (C):  $5 \times 10^{-8}M$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D4) per ADM e  $5 \times 10^{-8}M$  (D5),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D6),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D7) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D8) per ET-1. I risultati sono espressi in istogrammi come numero medio di CFU  $\pm$  deviazione standard (in rosso ADM, in verde ET-1, in BLU il controllo)



**Fig. 29:** risultati dei saggi di crescita a medio termine in terreno semisolido per valutare gli effetti induttivi di ADM ed ET-1 sulla linea KASUMI-1 a quattro dosaggi oltre al controllo (C):  $5 \times 10^{-8}M$  (D1),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D2),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D3) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D4) per ADM e  $5 \times 10^{-8}M$  (D5),  $2.5 \times 10^{-8}M$  (D6),  $1.25 \times 10^{-8}M$  (D7) e  $0.625 \times 10^{-8}M$  (D8) per ET-1. I risultati sono espressi in istogrammi come numero medio di CFU  $\pm$  deviazione standard (in rosso ADM, in verde ET-1, in BLU il controllo)



## **§2.5 VERIFICA DELLE PROPRIETÀ INDUTTIVE DI ADM ED ET-1 MEDIANTE INIBITORI**

Per convalidare gli effetti esercitati da ADM ed ET-1 sulla proliferazione cellulare di tutte le quattro linee prese in esame, sono stati condotti saggi di crescita a breve termine esponendo le cellule a specifici inibitori (ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor, inibitore di ADM e BQ788 inhibitor e BQ133 inhibitor, inibitori di ET-1) in presenza/assenza dei peptidi stessi.

I risultati della sperimentazione condotta sono riassunti negli istogrammi delle Figure 30, 31, 32 e 33 come  $NC_{\text{totali}}$  contate  $\pm$  deviazione standard affiancati dalle tabelle con i confronti statistici.

- *LINEA HL-60 CEPPO TV (FIGURA 30)*

In questa serie di esperimenti, la conta cellulare media è pari a:  $1.22 \pm 0.003 \times 10^6$  nelle colture di controllo,  $2.55 \pm 0.007 \times 10^6$  nelle colture trattate con ADM,  $1.22 \pm 0.009 \times 10^6$  nelle colture trattate con ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor e  $1.35 \pm 0.008 \times 10^6$  nelle colture trattate contemporaneamente con ADM e il suo inibitore.

I confronti statistici evidenziano che l' $NC_{\text{totale}}$  dei controlli è significativamente inferiore a quello delle colture trattate con ADM o con ADM e il suo inibitore, ma non differisce da quello delle colture trattate con il solo inibitore. In ogni caso il *rate di crescita* nelle colture trattate con solo ADM è significativamente maggiore rispetto sia a quello delle colture trattate con il proprio inibitore, sia a quello delle colture esposte al mix ADM e ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor.

Per ET-1 l' $NC_{\text{totale}}$  è pari a:  $1.22 \pm 0.003 \times 10^6$  nelle colture di controllo,  $2.41 \pm 0.007 \times 10^6$  nelle colture trattate con ET-1,  $1.22 \pm 0.003 \times 10^6$  nelle colture trattate con BQ123 e  $1.22 \pm 0.007 \times 10^6$  con BQ788,  $1.24 \pm 0.007 \times 10^6$  nelle colture trattata contemporaneamente con ET-1 e BQ123 e  $1.24 \pm 0.006 \times 10^6$  per ET-1 con l'inibitore BQ788.

I confronti statistici per ET-1 sono sovrapponibili a quelli di ADM sopra descritti.

- *LINEA HL-60 CEPPO CRO (FIGURA 31)*

La conta cellulare media è pari a:  $1.01 \pm 0.004$  nelle colture di controllo,  $2.41 \pm 0.011 \times 10^6$  nelle colture trattate con ADM,  $1.01 \pm 0.011 \times 10^6$  nelle colture trattate con ADM fragment<sub>22-52</sub> inhibitor e  $1.02 \pm 0.007 \times 10^6$  nelle colture trattate contemporaneamente con ADM e il suo inibitore.

I confronti statistici evidenziano che l' $NC_{\text{totale}}$  dei controlli è significativamente inferiore a quello delle colture trattate con ADM o con ADM e il suo inibitore, ma

non differisce da quello delle colture trattate con il solo inibitore. Comunque, il *rate di crescita* nelle colture trattate con solo ADM è significativamente maggiore rispetto sia a quello delle colture trattate con il proprio inibitore, sia a quello delle colture esposte ad ADM e ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor simultaneamente.

Per ET-1 l'NC<sub>totale</sub> è pari a:  $1.01 \pm 0.004 \times 10^6$  nelle colture di controllo,  $2.31 \pm 0.014 \times 10^6$  nelle colture trattate con ET-1,  $1.01 \pm 0.006 \times 10^6$  nelle colture trattate con BQ123 e  $1.08 \pm 0.003 \times 10^6$  con BQ788,  $1.01 \pm 0.008 \times 10^6$  nelle colture trattata contemporaneamente con ET-1 e BQ123 e  $1.02 \pm 0.008 \times 10^6$  per ET-1 con l'inibitore BQ788.

Le analisi statistiche per ET-1 sono uguali a quelle di ADM sopra descritte.

- *LINEA HL-60 CEPPO BANCA (FIGURA 32)*

La conta cellulare media è pari a:  $5.98 \pm 0.022 \times 10^6$  nelle colture di controllo,  $8.96 \pm 0.027 \times 10^6$  nelle colture trattate con ADM,  $15.99 \pm 0.011 \times 10^6$  nelle colture trattate con ADM fragment<sub>22-52</sub> inhibitor e  $5.96 \pm 0.015 \times 10^6$  nelle colture trattate contemporaneamente con ADM e il suo inibitore.

Dai confronti statistici emerge che l'NC<sub>totale</sub> dei controlli è significativamente inferiore a quello delle colture trattate con ADM o con ADM e il suo inibitore, ma non differisce da quello delle colture trattate con il solo inibitore. Il *rate di crescita* nelle colture trattate con ADM da solo è significativamente maggiore rispetto sia a quello delle colture trattate con il proprio inibitore, sia a quello delle colture esposte ad ADM e ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor simultaneamente.

Per ET-1 l'NC<sub>totale</sub> è pari a:  $5.98 \pm 0.022 \times 10^6$  nelle colture di controllo,  $8.47 \pm 0.019 \times 10^6$  nelle colture trattate con ET-1,  $5.85 \pm 0.233 \times 10^6$  nelle colture trattate con BQ123 e  $5.97 \pm 0.006 \times 10^6$  con BQ788,  $5.94 \pm 0.022 \times 10^6$  nelle colture trattata contemporaneamente con ET-1 e BQ123 e  $5.95 \pm 0.011 \times 10^6$  per ET-1 con l'inibitore BQ788.

I confronti statistici per ET-1 riportano le stesse significatività sopra descritte per ADM.

- *LINEA KASUMI-1 (FIGURA 33)*

La conta cellulare media è pari a:  $4.44 \pm 0.019$  nelle colture di controllo,  $7.25 \pm 0.019 \times 10^6$  nelle colture trattate con ADM,  $4.42 \pm 0.009 \times 10^6$  nelle colture trattate con ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor e  $4.41 \pm 0.013 \times 10^6$  nelle colture trattate contemporaneamente con ADM e il suo inibitore.

I confronti statistici evidenziano che l'NC<sub>totale</sub> dei controlli è significativamente inferiore a quello delle colture trattate con ADM o con ADM e il suo inibitore, ma non differisce da quello delle colture trattate con il solo inibitore. Comunque, il *rate*



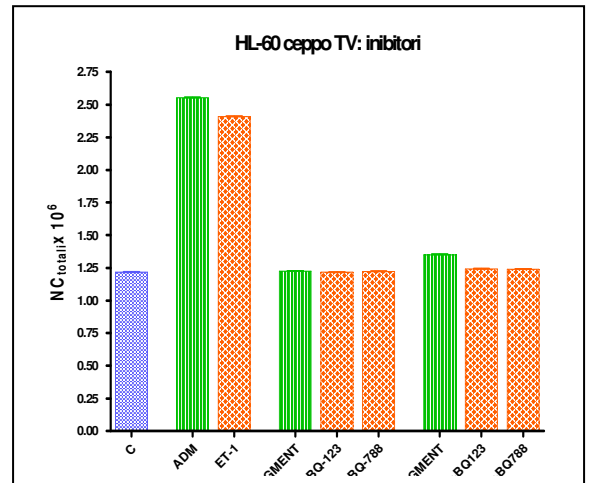
*di crescita* nelle colture trattate con ADM da solo è significativamente maggiore rispetto sia a quello delle colture trattate con il proprio inibitore, sia a quello delle colture esposte ad ADM e ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor simultaneamente.

Per ET-1 l'NC<sub>totale</sub> è pari a:  $4.44 \pm 0.019 \times 10^6$  nelle colture di controllo,  $7.03 \pm 0.025 \times 10^6$  nelle colture trattate con ET-1,  $4.42 \pm 0.010 \times 10^6$  nelle colture trattate con BQ123 e  $4.41 \pm 0.010 \times 10^6$  con BQ788,  $4.42 \pm 0.011 \times 10^6$  nelle colture trattata contemporaneamente con ET-1 e BQ123 e  $4.41 \pm 0.016 \times 10^6$  per ET-1 con l'inibitore BQ788.

Per ET-1 le analisi statistiche sono sovrapponibili a quelle di ADM sopra riportate.

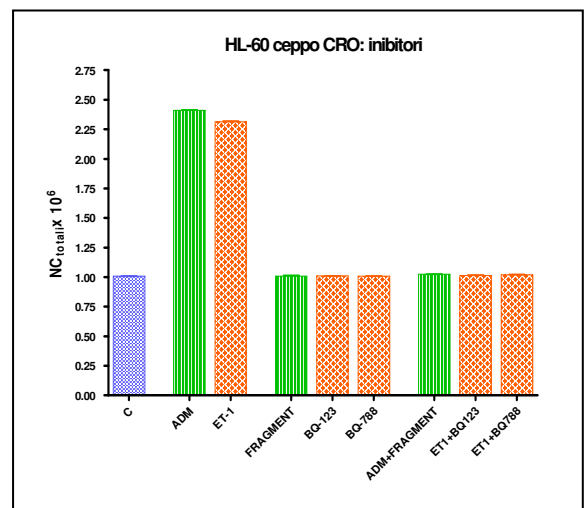


HL-60 ceppo TV INIBITORI	C				
ADM	*	ADM			
ET-1	*		ET-1		
ADM-FRAGMENT		*		ADM FRAGMENT	
BQ123			*		BQ123
BQ788			*		BQ788
ADM+ADM FRAGMENT	*	*		*	
ET-1+BQ123	*		*		
ET-1+BQ-788	*		*		*



**Fig.30** risultati dei saggi di crescita a breve termine in terreno liquido per valutare gli effetti induttivi di ADM ed ET-1 mediante inibitori sulla linea HL-60 ceppo TV: controllo (C), ADM (ADM), ET-1 (ET-1), ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor (FRAGMENT), BQ123 e BQ788 inibitori di ET-1, ADM+inibitore (ADM+FRAGMENT), ET-1+BQ123 e ET-1+BQ788. I risultati sono espressi in istogrammi come  $NC_{totali} \text{ contatex}10^6 \pm$  deviazione standard.

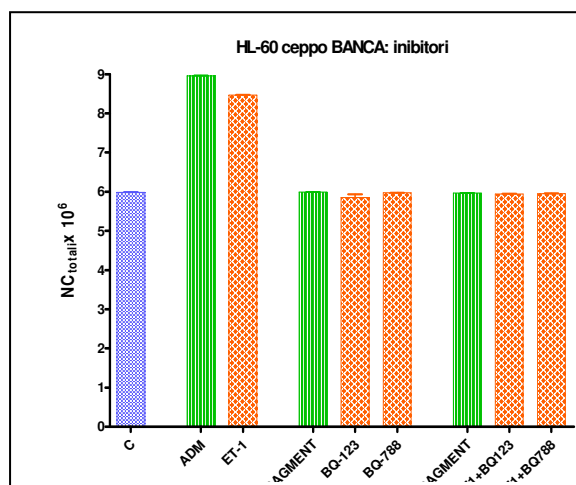
HL-60 ceppo CRO INIBITORI	C				
ADM	*	ADM			
ET-1	*		ET-1		
ADM-FRAGMENT		*		ADM FRAGMENT	
BQ123			*		BQ123
BQ788			*		BQ788
ADM+ADM FRAGMENT	*	*		*	
ET-1+BQ123	*		*		
ET-1+BQ-788	*		*		*



**Fig. 31:** Risultati dei saggi di crescita a breve termine in terreno liquido per valutare gli effetti induttivi di ADM ed ET-1 mediante inibitori sulla linea HL-60 ceppo CRO: controllo (C), ADM (ADM), ET-1 (ET-1), ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor (FRAGMENT), BQ123 e BQ788 inibitori di ET-1, ADM+inibitore (ADM+FRAGMENT), ET-1+BQ123 e ET-1+BQ788. I risultati sono espressi in istogrammi come  $NC_{totali} \text{ contatex}10^6 \pm$  deviazione standard.

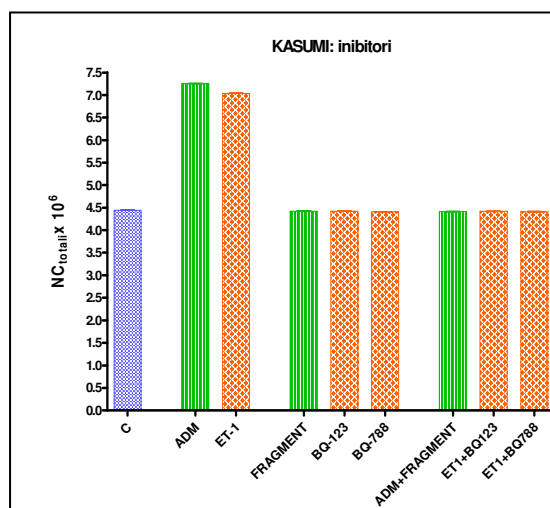


HL-60 ceppo BANCA INIBITORI	C				
ADM	*	ADM			
ET-1	*		ET-1		
ADM-FRAGMENT		*		ADM FRAGMENT	
BQ123			*		BQ123
BQ788			*		BQ788
ADM+ADM FRAGMENT	*	*		*	
ET-1+BQ123	*		*		
ET-1+BQ-788	*		*		*



**Fig. 32:** risultati dei saggi di crescita a breve termine in terreno liquido per valutare gli effetti induttivi di ADM ed ET-1 mediante inibitori sulla linea HL-60 ceppo BANCA: controllo (C), ADM (ADM), ET-1 (ET-1), ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor (FRAGMENT), BQ123 e BQ788 inibitori di ET-1, ADM+inibitore (ADM+FRAGMENT), ET-1+BQ123 e ET-1+BQ788. I risultati sono espressi in istogrammi come  $NC_{totali} \text{ contatex} 10^6 \pm$  deviazione standard.

KASUMI-1 INIBITORI	C				
ADM	*	ADM			
ET-1	*		ET-1		
ADM-FRAGMENT		*		ADM FRAGMENT	
BQ123			*		BQ123
BQ788			*		BQ788
ADM+ADM FRAGMENT	*	*		*	
ET-1+BQ123	*		*		
ET-1+BQ-788	*		*		*



**Fig. 33:** risultati dei saggi di crescita a breve termine in terreno liquido per valutare gli effetti induttivi di ADM ed ET-1 mediante inibitori sulla linea KASUMI-1: controllo (C), ADM (ADM), ET-1 (ET-1), ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor (FRAGMENT), BQ123 e BQ788 inibitori di ET-1, ADM+inibitore (ADM+FRAGMENT), ET-1+BQ123 e ET-1+BQ788. I risultati sono espressi in istogrammi come  $NC_{totali} \text{ contatex} 10^6 \pm$  deviazione standard.



### **§3. PROPRIETÀ INDUTTIVE DELL'EPIDERMAL GROWTH FACTOR**

#### **§3.1 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ INDUTTIVE DI EGF MEDIANTE TEST DI CRESCITA A BREVE TERMINE IN TERRENO LIQUIDO**

Le Figure 34, 35, 36 e 37 riassumono i risultati delle prove a breve termine eseguite per valutare gli effetti di EGF sulla crescita delle quattro linee in esame.

In ciascuna figura gli istogrammi riportano l'NC<sub>totali</sub> ± deviazioni standard delle cellule sviluppatesi in ciascuna coltura ad ogni end-point e sono affiancati da tabelle con indicate le significatività statistiche tra i differenti gruppi sperimentali.

- *LINEA HL-60 CEPPO TV (FIGURA 34)*

L'NC<sub>totali</sub> delle colture di controllo è pari a  $1.15 \pm 0.003 \times 10^6$  per le 24 ore,  $4.95 \pm 0.005 \times 10^6$  per le 48 ore e  $14.38 \pm 0.035 \times 10^6$  per le 72 ore.

Nelle colture trattate con EGF l'NC<sub>totali</sub> per le 24 ore sono:  $1.65 \pm 0.002 \times 10^6$  per D1,  $1.49 \pm 0.004 \times 10^6$  per D2,  $1.15 \pm 0.002 \times 10^6$  per D3 e  $1.24 \pm 0.018 \times 10^6$  per D4. Nel secondo end-point (48 ore) il conteggio emocitometrico non evidenzia differenze rispetto al controllo:  $4.99 \pm 0.007 \times 10^6$  in D1,  $4.99 \pm 0.016 \times 10^6$  in D2,  $5.002 \pm 0.014 \times 10^6$  in D3 e  $4.988 \pm 0.009 \times 10^6$  in D4. I risultati si confermano alle 72 ore rilevando conte molto simili ai controlli:  $14.37 \pm 0.022 \times 10^6$  per D1,  $14.38 \pm 0.014 \times 10^6$  per D2,  $14.35 \pm 0.019 \times 10^6$  per D3 e  $14.38 \pm 0.008 \times 10^6$  per D4.

I confronti statistici evidenziano che EGF ha effetti induttivi significativi per i due dosaggi maggiori (D1 e D2) solamente nel primo end-point (24 ore)

- *LINEA HL-60 CEPPO CRO (FIGURA 35)*

L'NC<sub>totali</sub> delle colture di controllo è pari a  $1.046 \pm 0.005 \times 10^6$  per le 24 ore,  $3.50 \pm 0.012 \times 10^6$  per le 48 ore e  $7.34 \pm 0.032 \times 10^6$  per le 72 ore.

Nelle colture trattate con EGF, le conte cellulari medie sono per le 24 ore:  $1.38 \pm 0.017 \times 10^6$  per D1,  $1.36 \pm 0.007 \times 10^6$  per D2,  $1.06 \pm 0.013 \times 10^6$  per D3 e  $1.05 \pm 0.008 \times 10^6$  per D4. Anche per questa linea, nel secondo end-point (48ore) il conteggio emocitometrico non evidenzia differenze rispetto al non trattato:  $3.50 \pm 0.012 \times 10^6$  in D1,  $3.51 \pm 0.052 \times 10^6$  in D2,  $3.52 \pm 0.019 \times 10^6$  in D3 e  $3.49 \pm 0.011 \times 10^6$  in D4. I risultati si ripetono alle 72 ore rilevando conte cellulari molto vicine a quelle del controllo:  $7.36 \pm 0.018 \times 10^6$  per D1,  $7.32 \pm 0.035 \times 10^6$  per D2,  $7.37 \pm 0.015 \times 10^6$  per D3 e  $7.41 \pm 0.022 \times 10^6$  per D4.

I confronti statistici evidenziano che EGF ha effetti induttivi significativi per le due concentrazioni maggiori di fattore di crescita fornito alle cellule nelle prime 24 ore.

- *LINEA HL-60 CEPPO BANCA (FIGURA 36)*

La conta cellulare media delle colture di controllo è pari a  $1.89 \pm 0.004 \times 10^6$  per le 24 ore,  $6.64 \pm 0.008 \times 10^6$  per le 48 ore e  $14.98 \pm 0.016 \times 10^6$  per le 72 ore.

Nelle colture trattate con EGF l'NC<sub>totali</sub> per le 24 ore è:  $2.01 \pm 0.010 \times 10^6$  per D1,  $2.02 \pm 0.019 \times 10^6$  per D2,  $1.90 \pm 0.011 \times 10^6$  per D3 e  $1.89 \pm 0.006 \times 10^6$  per D4. Anche per questa linea, nel secondo end-point (48ore) il conteggio emocitometrico non evidenzia differenze rispetto al non trattato:  $6.65 \pm 0.016 \times 10^6$  in D1,  $6.67 \pm 0.014 \times 10^6$  in D2,  $6.64 \pm 0.005 \times 10^6$  in D3 e  $6.65 \pm 0.016 \times 10^6$  in D4. I risultati si ripetono alle 72 ore rilevando conte cellulari molto vicine a quelle del controllo:  $14.97 \pm 0.019 \times 10^6$  per D1,  $14.98 \pm 0.009 \times 10^6$  per D2,  $14.92 \pm 0.012 \times 10^6$  per D3 e  $14.94 \pm 0.024 \times 10^6$  per D4.

I confronti statistici evidenziano che EGF ha effetti induttivi significativi per le due concentrazioni maggiori di fattore di crescita fornito alle cellule nelle primo end point.

- *LINEA KASUMI-1 (FIGURA 37)*

L'NC<sub>totali</sub> delle colture di controllo è pari a  $6.29 \pm 0.006 \times 10^6$  per le 24 ore,  $8.56 \pm 0.018 \times 10^6$  per le 48 ore e  $11.13 \pm 0.019 \times 10^6$  per le 72 ore.

Nelle colture trattate con EGF le conte cellulari medie sono per le 24 ore:  $6.87 \pm 0.032 \times 10^6$  per D1,  $6.84 \pm 0.043 \times 10^6$  per D2,  $6.32 \pm 0.017 \times 10^6$  per D3 e  $6.29 \pm 0.029 \times 10^6$  per D4. Anche per questa linea, nel secondo end-point (48ore) il conteggio emocitometrico non evidenzia differenze rispetto al non trattato:  $8.61 \pm 0.036 \times 10^6$  in D1,  $8.59 \pm 0.019 \times 10^6$  in D2,  $8.61 \pm 0.036 \times 10^6$  in D3 e  $8.64 \pm 0.011 \times 10^6$  in D4. I risultati si ripetono alle 72 ore rilevando conte cellulari molto vicine a quelle del controllo:  $11.13 \pm 0.019 \times 10^6$  per D1,  $11.14 \pm 0.025 \times 10^6$  per D2,  $11.09 \pm 0.026 \times 10^6$  per D3 e  $11.12 \pm 0.028 \times 10^6$  per D4.

I confronti statistici evidenziano che EGF ha effetti induttivi significativi per le due concentrazioni maggiori di fattore di crescita fornito alle cellule nelle primo end point.

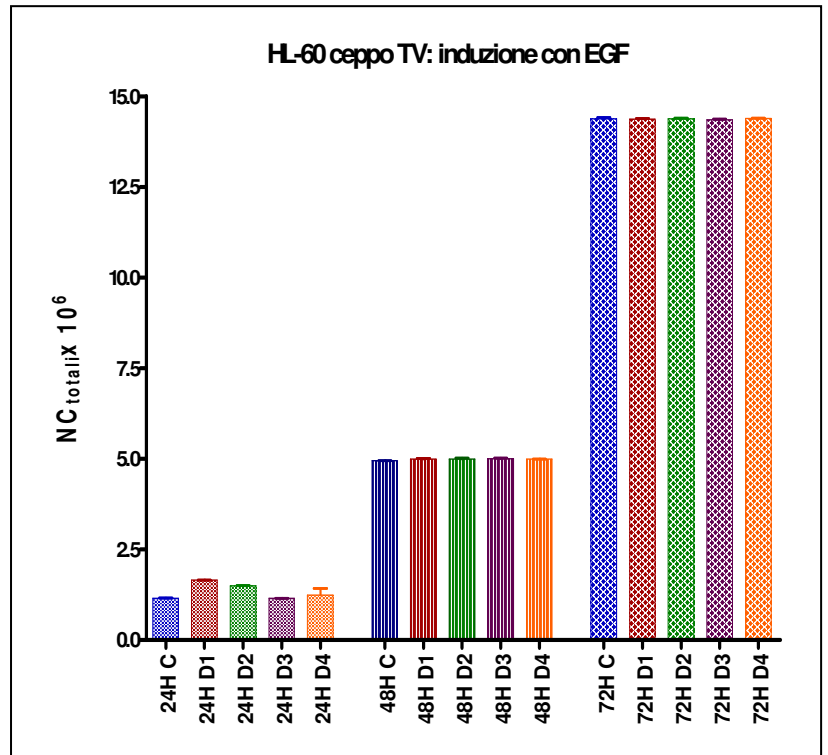


24 H	C			
D1	*	D1		
D2	*	ns	D2	
D3	ns	*	*	D3
D4	ns	*	*	ns

48 H	C			
D1	ns	D1		
D2	ns	ns	D2	
D3	ns	ns	ns	D3
D4	ns	ns	ns	ns

72 H	C			
D1	ns	D1		
D2	ns	ns	D2	
D3	ns	ns	ns	D3
D4	ns	ns	ns	ns

\*=P<0.05; ns=non significativo



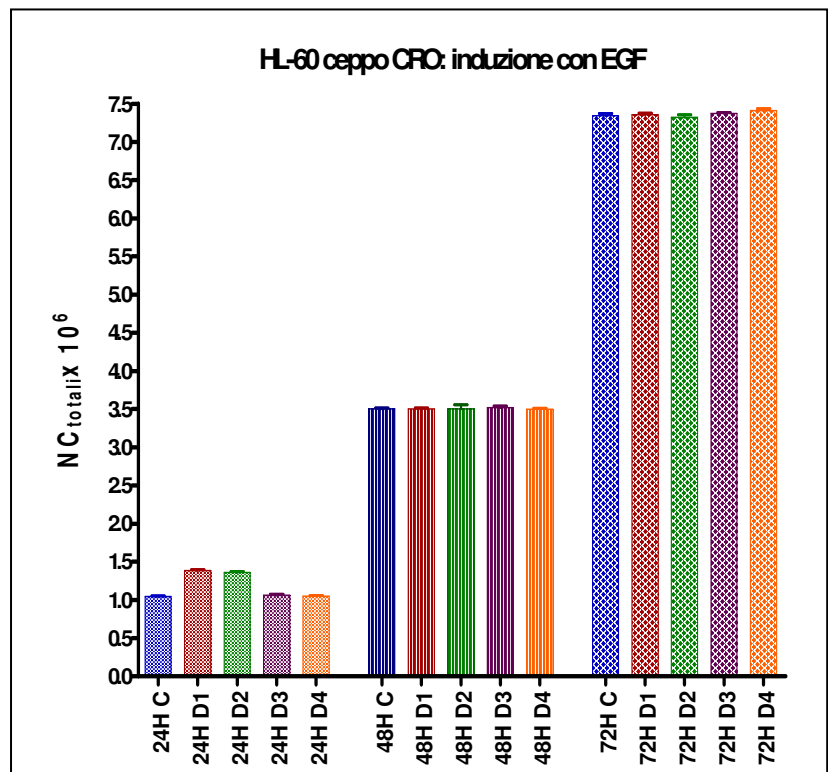
**Fig. 34:** risultati dei saggi di crescita a breve termine per valutare gli effetti induttivi di EGF sulla linea HL-60 ceppo TV a quattro dosaggi oltre al controllo (C): 10mg/μl (D1), 5mg/μl (D2), 2.5μg/ml(D3) e 1.25μg/ml (D4). I risultati sono espressi in istogrammi come numero medio di cellule totali x10<sup>6</sup> ± deviazione standard, raggruppati nei tre end-point 24, 48 e 72 ore.

24 H	C			
D1	*	D1		
D2	*	ns	D2	
D3	ns	*	*	D3
D4	ns	*	*	ns

48 H	C			
D1	ns	D1		
D2	ns	ns	D2	
D3	ns	ns	ns	D3
D4	ns	ns	ns	ns

72 H	C			
D1	ns	D1		
D2	ns	ns	D2	
D3	ns	ns	ns	D3
D4	ns	ns	ns	ns

\*=P<0.05; ns=non significativo



**Fig. 35:** risultati dei saggi di crescita a breve termine per valutare gli effetti induttivi di EGF sulla linea HL-60 ceppo CRO a quattro dosaggi oltre al controllo (C): 10mg/μl (D1), 5mg/μl (D2), 2.5μg/ml(D3) e 1.25μg/ml (D4). I risultati sono espressi in istogrammi come numero medio di cellule totali x10<sup>6</sup> ± deviazione standard, raggruppati nei tre end-point 24, 48 e 72 ore.

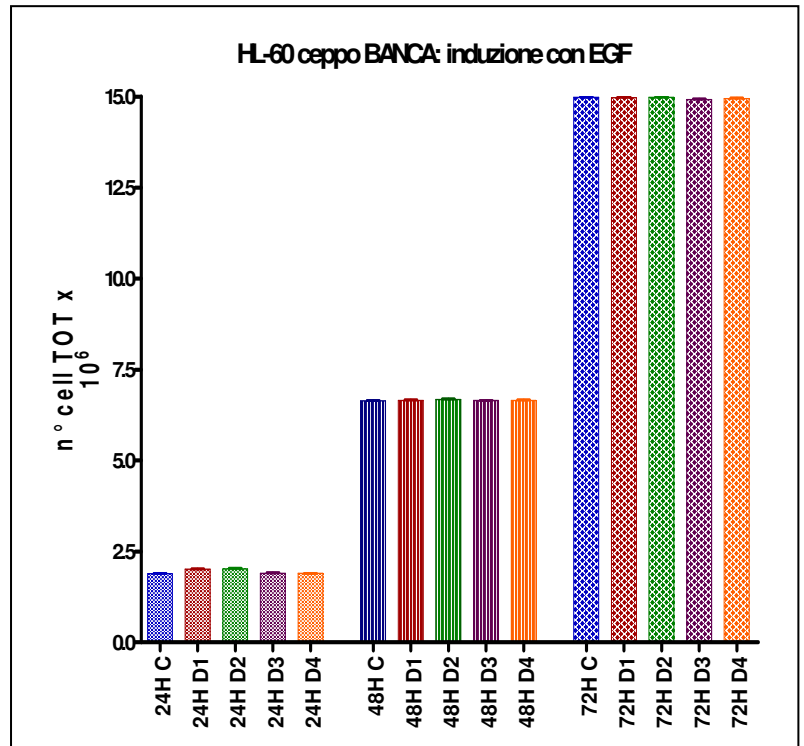


24 H	C			
D1	*	D1		
D2	*	ns	D2	
D3	ns	*	*	D3
D4	ns	*	*	ns

48 H	C			
D1	ns	D1		
D2	ns	ns	D2	
D3	ns	ns	ns	D3
D4	ns	ns	ns	ns

72 H	C			
D1	ns	D1		
D2	ns	ns	D2	
D3	ns	ns	ns	D3
D4	ns	ns	ns	ns

\*=P<0.05; ns=non significativo



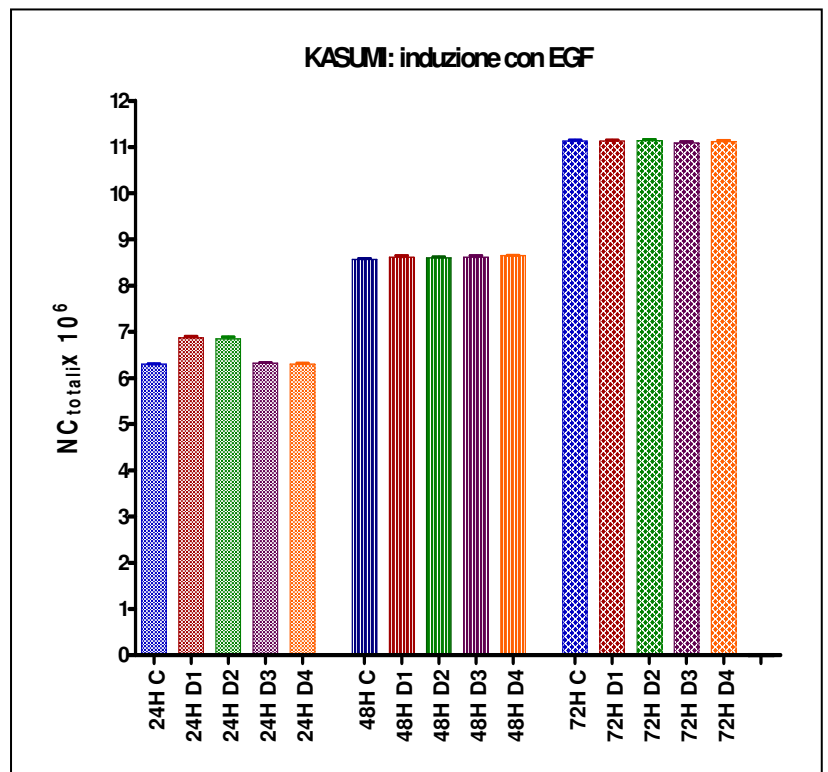
**Fig. 36:** risultati dei saggi di crescita a breve termine per valutare gli effetti induttivi di EGF sulla linea HL-60 ceppo BANCA a quattro dosaggi oltre al controllo (C): 10mg/μl (D1), 5mg/μl (D2), 2.5μg/ml(D3) e 1.25μg/ml (D4). I risultati sono espressi in istogrammi come numero medio di cellule totali x10<sup>6</sup> ± deviazione standard, raggruppati nei tre end-point 24, 48 e 72 ore.

24 H	C			
D1	*	D1		
D2	*	ns	D2	
D3	ns	*	*	D3
D4	ns	*	*	ns

48 H	C			
D1	ns	D1		
D2	ns	ns	D2	
D3	ns	ns	ns	D3
D4	ns	ns	ns	ns

72 H	C			
D1	ns	D1		
D2	ns	ns	D2	
D3	ns	ns	ns	D3
D4	ns	ns	ns	ns

\*=P<0.05; ns=non significativo



**Fig. 37:** risultati dei saggi di crescita a breve termine per valutare gli effetti induttivi di EGF sulla linea KASUMI-1 a quattro dosaggi oltre al controllo (C): 10mg/μl (D1), 5mg/μl (D2), 2.5μg/ml(D3) e 1.25μg/ml (D4). I risultati sono espressi in istogrammi come numero medio di cellule totali x10<sup>6</sup> ± deviazione standard, raggruppati nei tre end-point 24, 48 e 72 ore.



### **§3.2 ESPRESSIONE DEI MARKER DI DIFFERENZIAZIONE GRANULOCITARIA POST ESPOSIZIONE AD EGF**

I risultati della caratterizzazione immunocitometrica dei *marker* di differenziazione granulocitaria post esposizione ad EGF, sono riportati nelle Tabelle XIX, XX, XXI e XXII. I valori sono riassunti come percentuale di espressione del marcatore  $\pm$  deviazione standard.

- *LINEA HL-60 CEPPPO TV (TABELLA XIX)*

L'espressione antigenica delle cellule esposte a tutti e quattro i dosaggi di EGF rispetto ai controlli rimane pressoché invariata. Fa eccezione l'antigene CD11b che diminuisce percentualmente nei trattati rispetto ai controlli. L'espressione del CD33 sembra diminuire in maniera inversamente proporzionale al dosaggio passando dal 98.8% in C al 92.2% in D1, al 90.0% in D2 e D3, all'89.9 % in D4. Un aumento percentuale è presente nell'espressione del CD45, passando dal 68% del controllo al 71.4% in D1, 71.1% in D2, 71.8% in D3 e 71.5% in D4.

- *LINEA HL-60 CEPPPO CRO (TABELLA XX)*

Anche in questa linea l'espressione antigenica delle cellule esposte a tutti e quattro i dosaggi di EGF rimane pressoché invariata. Fa eccezione l'antigene CD11b che diminuisce percentualmente nei trattati rispetto ai controlli, passando da 98.3% nel controllo al 92.7% in D1 e D2, al 91.6% in D3 e al 91.1% in D4. L'espressione dell'antigene CD33 è pari al 98.2% in C, 92.7% in D1, 92.7% in D2, 91.6% in D3 e 91.1% in D4.

- *LINEA HL-60 CEPPPO BANCA (TABELLA XXI)*

L'immunofenotipo delle cellule esposte a tutti e quattro i dosaggi di EGF rimane pressoché invariato. Fa eccezione l'antigene CD4 che diminuisce percentualmente nei trattati rispetto ai controlli passando dal 99.8% nel controllo al 98.8% in D1, al 95.4% in D2, al 93.4% in D3 e al 94% in D4. L'espressione del CD33 sembra diminuire in maniera dipendente, in parte, dal dosaggio del fattore di crescita fornito alle cellule (99% in C, 91.9% in D1, 91.5% in D2, 92.7% in D3 e 91.5% in D4).

- *LINEA KASUMI-1 (TABELLA XXII)*

L'espressione antigenica delle cellule esposte a tutti e quattro i dosaggi di EGF non subisce modificazioni. Fa eccezione l'antigene CD11b che diminuisce percentualmente nei trattati rispetto ai controlli in modo dipendente, in parte, dal dosaggio (73.1% in C, 70.1% in D1, 70.7% in D2, 70.4% in D3 e 70.6% in D4). L'espressione del CD33 sembra diminuire in maniera inversamente proporzionale al dosaggio passando dal 99.1% nel controllo al 92.5% in D1, al 94.6% in D2, al 92.7% in D3 e al 92.5% in D4.

MARCATORI	HL-60 ceppo TV: induzione con EGF				
	C	D1	D2	D3	D4
HLA-DR	1.2±0.32	1.1±0.30	1.3±0.23	1.1±0.20	1.4±0.55
CD4	1.7±0.74	1.6±0.15	1.2±0.10	1.6±0.55	1.2±0.29
CD11B	75.1±0.15	71.8±0.47	72.7±1.06	71.4±0.46	72.3±0.53
CD14	82.9±0.49	81.8±0.45	81.7±1.06	81±0.61	82.7±0.32
CD15	7.3±1.46	7.4±0.66	7.4±0.55	7.5±1.69	7.3±0.53
CD16	3.0±0.7	2.9±0.30	2.9±0.35	2.9±0.65	2.9±0.45
CD33	98.7±0.5	92.1±0.14	90±0.30	90±0.21	89.9±0.45
CD44	1.1±0.85	1.0±0.64	1.1±0.53	1.1±0.32	1.2±0.76
CD45	68.1±0.81	71.3±1.19	71.0±1.16	71.8±0.70	71.4±1.71

**Tab. XIX:** Risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea HL-60 ceppo TV dopo 72 ore di coltura con e senza EGF alle quattro concentrazioni testate: 10mg/μl (D1), 5mg/μl (D2), 2.5μg/ml (D3) e 1.25μg/ml (D4). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo ± deviazione standard.

MARCATORI	HL-60 ceppo CRO: induzione con EGF				
	C	D1	D2	D3	D4
HLA-DR	74.6±1.48	74.5±3.04	74.0±2.37	74.0±0.61	74.0±1.68
CD4	84.1±0.15	83.8±0.89	84.3±0.53	84.3±1.46	84.8±0.53
CD11B	98.5±0.57	98.5±0.25	97.5±0.93	99.4±0.21	98.4±0.81
CD14	97.1±0.46	97.2±0.36	97.8±0.15	97.1±0.15	97.6±1.10
CD15	97±0.06	97.7±1.27	97.2±1.18	97.7±0.17	97.1±1.76
CD16	25.4±2.97	26.2±0.55	23.9±0.61	26.2±1.44	28.0±0.58
CD33	98.2±0.72	92.7±0.36	92.7±0.64	91.6±1.91	91.1±0.11
CD44	98±0.65	98.3±0.45	98.3±0.22	98.4±0.21	98.2±0.31
CD45	98.5±0.85	98.6±0.95	98.4±0.81	98.9±0.36	98.9±0.75

**Tab. XX:** Risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea HL-60 ceppo CRO dopo 72 ore di coltura con e senza EGF alle quattro concentrazioni testate: 10mg/μl (D1), 5mg/μl (D2), 2.5μg/ml (D3) e 1.25μg/ml (D4). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo ± deviazione standard.

MARCATORI	HL-60 ceppo BANCA: induzione con EGF				
	C	D1	D2	D3	D4
HLA-DR	3.0±0.31	3.4±0.7	3.4±0.26	3.1±0.755	3.4±0.28
CD4	99.7±0.13	98.7±0.69	95.4±0.55	93.3±0.58	94.0±0.15
CD11B	99.2±0.55	98.8±0.37	98.8±0.21	99.7±0.10	98.3±0.26
CD14	41.7±0.55	41.1±0.58	41.3±0.72	41.7±0.40	41.6±0.41
CD15	98.8±0.61	98.7±0.51	98.4±0.11	98.5±0.20	98.4±0.32
CD16	82.9±0.74	82.9±0.6	82.4±0.37	82.1±0.21	82.4±0.40
CD33	99±0.45	91.8±0.32	91.5±0.83	92.6±0.21	91.5±1.06
CD44	99.0±0.05	99.1±0.10	99.5±0.23	99.9±0.00	99.5±0.38
CD45	99.6±0.15	99.7±0.19	99.4±0.10	99±0.53	98.3±0.86

**Tab. XXI:** Risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea HL-60 ceppo BANCA dopo 72 ore di coltura con e senza EGF alle quattro concentrazioni testate: 10mg/μl (D1), 5mg/μl (D2), 2.5μg/ml (D3) e 1.25μg/ml (D4). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo ± deviazione standard.

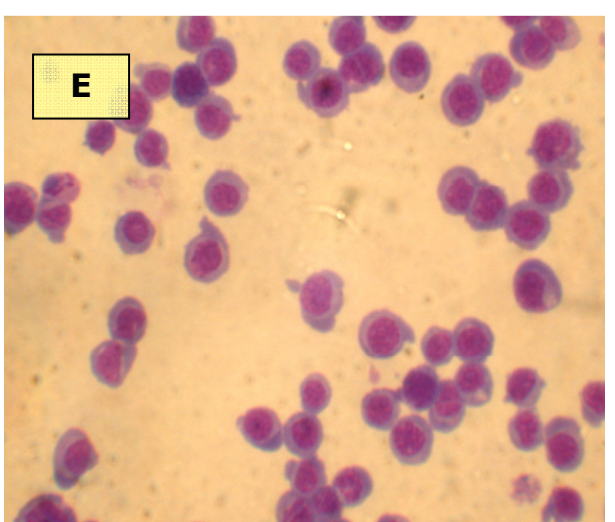
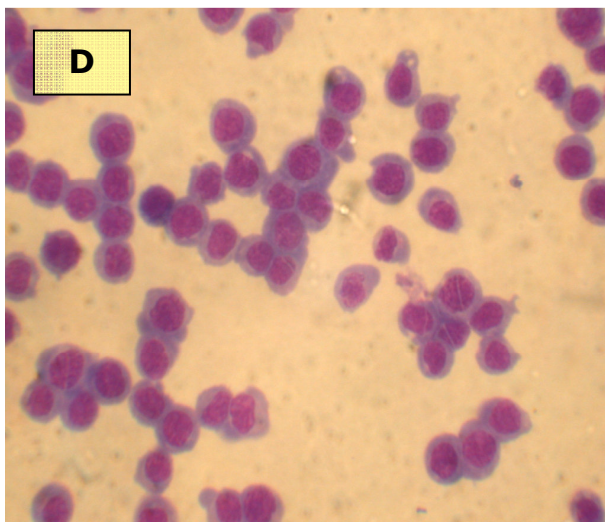
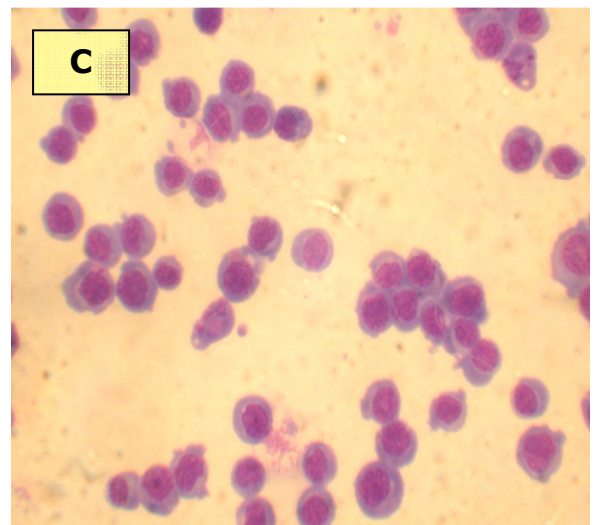
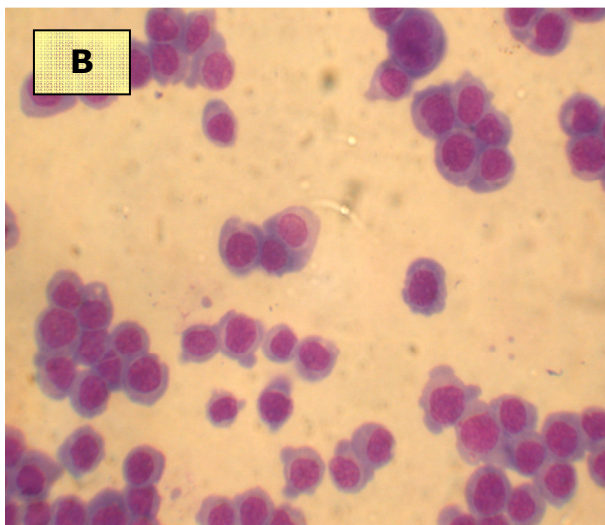
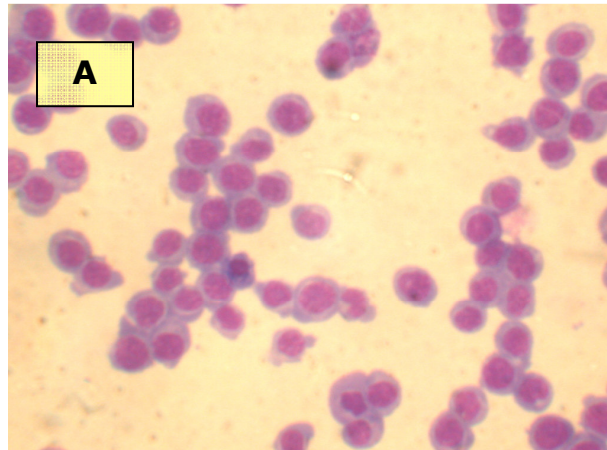
MARCATORI	KASUMI-1: induzione con EGF				
	C	D1	D2	D3	D4
HLA-DR	98.7±0.60	98.4±0.53	98.6±0.8	98.4±0.95	98.4±1.05
CD4	99.3±0.20	99.3±0.10	99.0±0.74	99.7±0.19	99.3±0.17
CD11B	73.1±0.10	70.0±0.45	70.7±0.84	70.4±0.65	70.5±0.26
CD14	6.0±0.50	6.3±0.90	6.1±0.87	6.2±0.05	6.4±0.10
CD15	83.2±1.40	83.7±0.21	83.9±0.43	83.6±0.55	83±1.70
CD16	34.5±0.1	35.0±0.67	35.3±0.87	34.4±0.81	35.6±1.33
CD33	99.0±0.40	95.5±1.44	94.5±0.83	92.6±1.55	92.4±1.57
CD44	98.6±0.80	98.8±1.01	98.9±0.37	99.0±0.43	99.9±0.00
CD45	96.1±2.20	96.2±1.49	96.5±0.72	96.7±1.12	96±0.82

**Tab. XXII:** Risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea KASUMI-1 dopo 72 ore di coltura con e senza EGF alle quattro concentrazioni testate: 10mg/μl (D1), 5mg/μl (D2), 2.5μg/ml (D3) e 1.25μg/ml (D4). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo ±

### **§3.3 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA POST-ESPOSIZIONE AD EGF**

In questa sperimentazione i preparati non evidenziano differenze morfologiche tra i controlli e i trattati, come evidenziato, a titolo di esempio, nella figura 38, che riporta immagini di cellule HL-60 TV dopo esposizione a EGF.





**Fig. 38:** immagini ottenute all'end-point del test colturale a breve termine (72 ore) con EGF del ceppo cellulare HL-60 TV. **(A)** Contr, **(B)** D1, **(C)** D2, **(D)** D3, **(E)** D4



### **§3.4 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ INDUTTIVE DI EGF MEDIANTE SAGGI CLONOGENICI IN TERRENO SEMISOLIDO**

I risultati della sperimentazione condotta per valutare gli effetti esercitati da EGF sulla crescita clonale in terreno semisolido delle linee cellulari sono riassunti negli istogrammi delle Figure 39, 40, 41 e 42 come numero medio di CFU totali  $\pm$  deviazione standard sviluppatesi nelle colture.

- *LINEA HL-60 CEPPO TV (FIGURA 39)*

Il numero medio di CFU totali sviluppatesi nelle colture di controllo è pari a  $151.8 \pm 53.5$ .

Nei test clonogenici eseguiti esponendo le cellule ad EGF, il numero medio di CFU è pari a:  $141.4 \pm 45.47$  per D1,  $144.5 \pm 41.83$  per D2,  $144.6 \pm 49.83$  per D3 e  $135.1 \pm 49.02$  per D4. I confronti statistici non rivelano un significativo incremento del numero medio di CFU indotto da EGF.

- *LINEA HL-60 CEPPO CRO (FIGURA 40)*

Il numero medio di CFU contate nelle colture di controllo è pari a  $36.10 \pm 21.17$ .

Nei saggi a medio termine in terreno semisolido in presenza di EGF il numero medio di CFU corrisponde a:  $34.00 \pm 17.26$  per D1,  $35.90 \pm 13.13$  per D2,  $34.80 \pm 23.90$  per D3 e  $34.60 \pm 18.50$  per D4.

I confronti statistici non evidenziano incrementi significativi del numero medio di CFU rispetto al controllo.

- *LINEA HL-60 CEPPO BANCA (FIGURA 41)*

Il numero medio di CFU contate in assenza dei due peptidi è pari a  $162.6 \pm 27.27$ .

Nei test clonogenici eseguiti esponendo le cellule ad EGF, il numero medio di CFU è pari a:  $175.6 \pm 37.17$  per D1,  $163.8 \pm 28.70$  per D2,  $157.3 \pm 35.95$  per D3 e  $148.8 \pm 33.25$  per D4.

I confronti statistici non rivelano un significativo incremento del numero medio di CFU indotto da EGF.

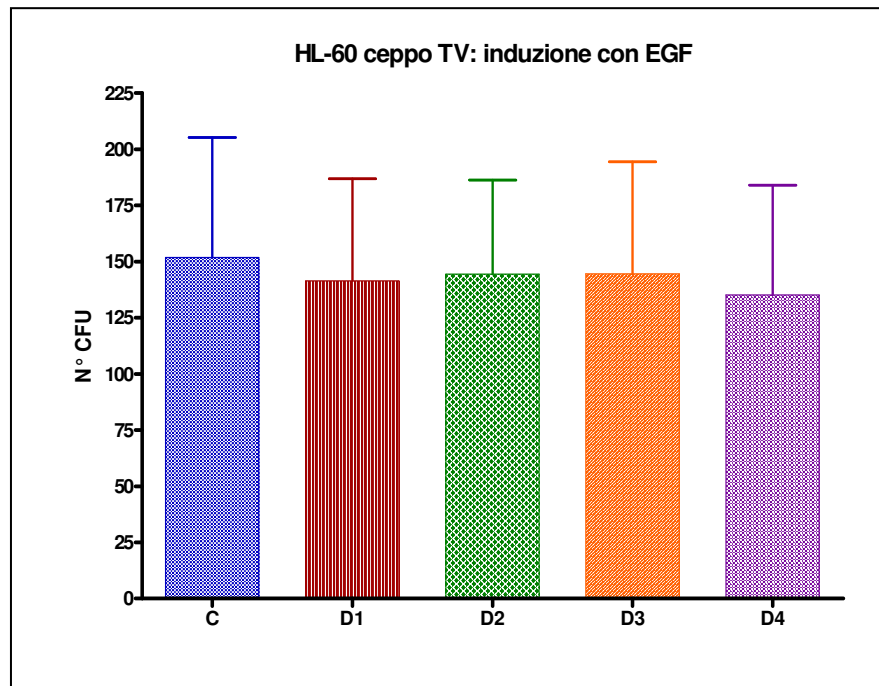
- *LINEA KASUMI-1 (FIGURA 42)*

Il numero medio di CFU contate nelle colture di controllo è pari a  $78.90 \pm 20.66$ .

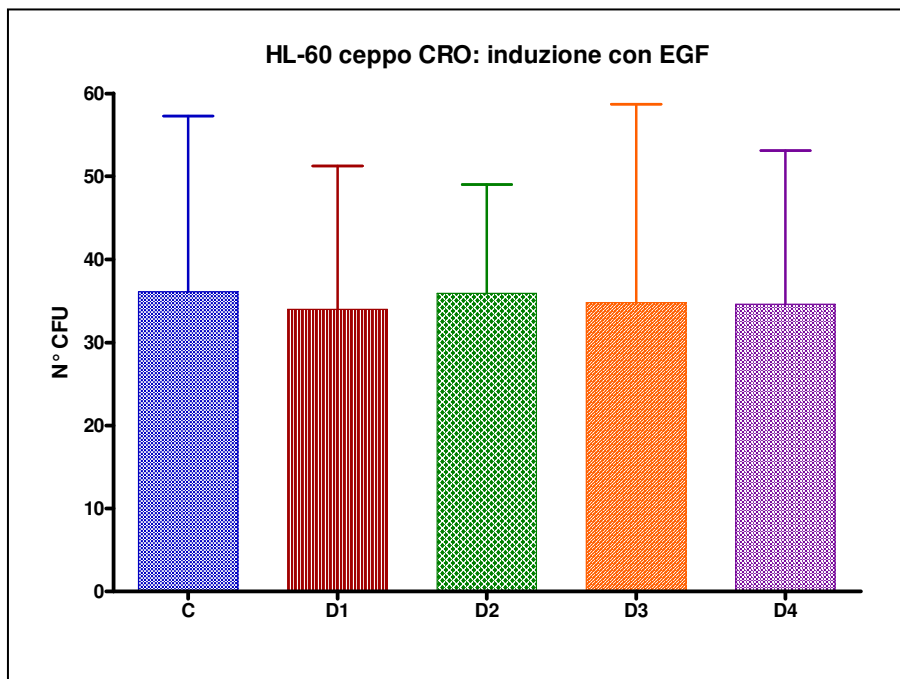
Nei test clonogenici eseguiti esponendo le cellule ad EGF, il numero medio di CFU è pari a:  $85.40 \pm 24.00$  per D1,  $79.70 \pm 25.10$  per D2,  $81.10 \pm 23.01$  per D3 e  $71.70 \pm 23.35$  per D4.

I confronti statistici non rivelano un significativo incremento del numero medio di CFU indotto da EGF.



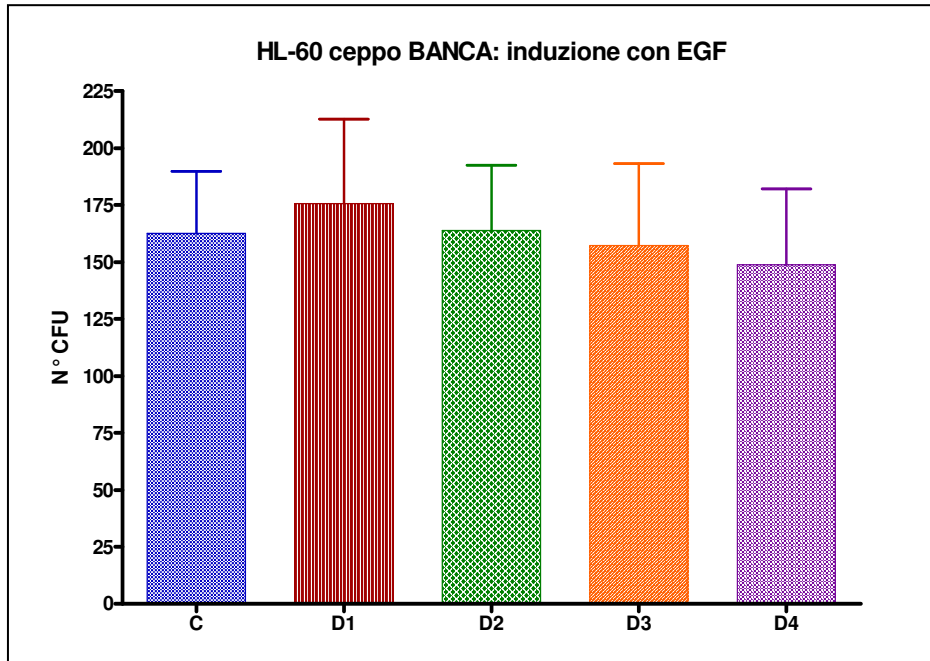


**Fig. 39:** Risultati dei saggi di crescita a medio termine in terreno semisolido per valutare gli effetti induttivi di sulla linea HL-60 ceppo TV a quattro dosaggi oltre al controllo (C): 10mg/μl (D1), 5mg/μl (D2), 2.5μg/ml(D3) e 1.25μg/ml (D4). I risultati sono espressi in istogrammi come numero medio di CFU totali ± deviazione standard.

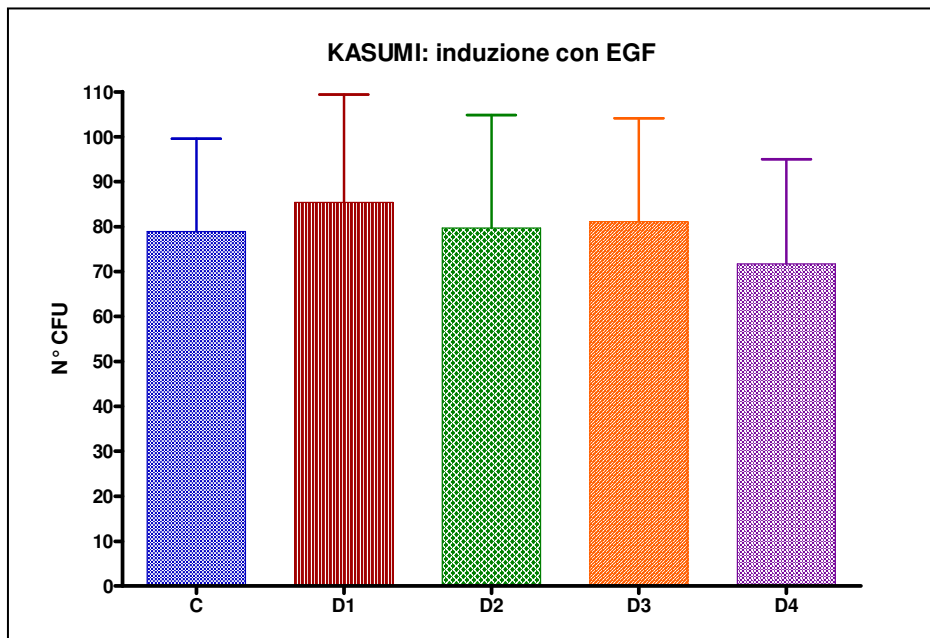


**Fig. 40:** Risultati dei saggi di crescita a medio termine in terreno semisolido per valutare gli effetti induttivi di sulla linea HL-60 ceppo CRO a quattro dosaggi oltre al controllo (C): 10mg/μl (D1), 5mg/μl (D2), 2.5μg/ml(D3) e 1.25μg/ml (D4). I risultati sono espressi in istogrammi come numero medio di CFU totali ± deviazione standard.





**Fig. 41:** risultati dei saggi di crescita a medio termine in terreno semisolido per valutare gli effetti induttivi di sulla linea HL-60 ceppo BANCA a quattro dosaggi oltre al controllo (C): 10mg/μl (D1), 5mg/μl (D2), 2.5μg/ml(D3) e 1.25μg/ml (D4). I risultati sono espressi in istogrammi come numero medio di CFU totali ± deviazione standard.



**Fig. 42:** risultati dei saggi di crescita a medio termine in terreno semisolido per valutare gli effetti induttivi di sulla linea KASUMI-1 a quattro dosaggi oltre al controllo (C): 10mg/μl (D1), 5mg/μl (D2), 2.5μg/ml(D3) e 1.25μg/ml (D4). I risultati sono espressi in istogrammi come numero medio di CFU totali ± deviazione standard.





### **§3.5 VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DI GEFITINIB**

#### **§3.5.1 EFFETTI CITOTOSSICI A BREVE TERMINE**

Nelle Figure 43, 44, 45 e 46 sono riportati i risultati delle prove eseguite per valutare gli effetti citotossici a breve termine del Gefitinib sulla crescita delle linee HL-60 TV, HL-60 CRO, HL-60 BANCA e KASUMI-1 espressi come distribuzione scatter e valore medio dell'efficienza di piastramento (EP). In ciascuna di queste figure è inserita una Tabella con indicate le significatività statistiche tra i differenti gruppi sperimentali e: *I*) le colture di controllo; *II*) le colture incubate con il solvente del farmaco.

- *LINEA HL-60 CEPPPO TV (FIGURA 43)*

La EP media delle colture HL-60 TV di controllo è pari a  $17.55 \pm 3.35$ , mentre quella di  $\text{Contr}_1$  esposta al solvente è di  $7.10 \pm 2.50$ . Nelle colture trattate con il farmaco le EP medie sono:  $1.74 \pm 0.44$  per D1;  $2.15 \pm 0.54$  per D2;  $3.01 \pm 1.07$  per D3;  $4.68 \pm 1.64$  per D4 e  $7.35 \pm 1.64$  per D5.

I confronti statistici evidenziano che l'efficienza di piastramento dei gruppi trattati è significativamente minore rispetto a quelle del controllo e di  $\text{Contr}_1$  ad eccezione dell'EP media di D<sub>5</sub> che non varia rispetto a quella di  $\text{Contr}_1$  ( $p > 0.05$ ).

- *LINEA HL-60 CEPPPO CRO (FIGURA 44)*

La EP media nelle colture di controllo HL-60 CRO è pari a  $6.00 \pm 0.77$ , mentre quella di  $\text{Contr}_1$  è di  $2.56 \pm 0.70$ . Le EP medie delle colture esposte al farmaco sono rispettivamente pari a  $1.34 \pm 0.37$  per D1;  $1.61 \pm 0.73$  per D2;  $1.99 \pm 0.70$  per D3;  $2.90 \pm 0.63$  per D4 e  $4.14 \pm 0.99$  per D5.

Anche in questo caso, i confronti statistici evidenziano che l'efficienza di piastramento dei gruppi trattati è significativamente minore rispetto a quella del controllo.

L'analisi statistica eseguita tra  $\text{Contr}_1$  e trattati evidenzia *I*) un significativo decremento delle EP medie dei dosaggi D1 e D2; *II*) nessuna variazione ( $p > 0.05$ ) per i dosaggi D3 e D<sub>4</sub>; *III*) una EP media per D<sub>5</sub> significativamente più elevata.

- *LINEA HL-60 CEPPPO BANCA (FIGURA 45)*

La EP media nelle colture di controllo HL-60 BANCA è pari a  $7.43 \pm 1.23$ , mentre quella di  $\text{Contr}_1$  è di  $3.18 \pm 0.50$ . Le EP medie delle colture esposte al farmaco sono rispettivamente pari a  $0.74 \pm 0.24$  per D1;  $0.71 \pm 0.16$  per D2;  $0.82 \pm 0.17$  per D3;  $1.85 \pm 0.42$  per D4 e  $3.08 \pm 0.65$  per D5.

Anche in questo caso, i confronti statistici evidenziano che l'efficienza di piastramento dei gruppi trattati è significativamente minore rispetto a quella del controllo.

I confronti statistici evidenziano che l'efficienza di piastramento dei gruppi trattati è significativamente minore rispetto a quelle del controllo e di Contr<sub>1</sub> ad eccezione dell'EP media di D<sub>5</sub> che non varia rispetto a quella di Cont<sub>1</sub> ( $p > 0.05$ ).

- *LINEA KASUMI-1 (FIGURA 46)*

La EP media nelle colture di controllo KASUMI-1 è pari a  $5.08 \pm 0.31$ , mentre quella di Contr<sub>1</sub> è di  $4.15 \pm 0.28$ . Le EP medie delle colture esposte al farmaco sono rispettivamente pari a  $0.57 \pm 0.09$  per D1;  $1.07 \pm 0.30$  per D2;  $1.45 \pm 0.24$  per D3;  $1.8 \pm 0.20$  per D4 e  $1.96 \pm 0.45$  per D5.

Tutti i confronti statistici evidenziano che l'efficienza di piastramento dei gruppi trattati è significativamente minore rispetto a quella del controllo e del controllo<sub>1</sub>.

### **§3.5.2 TEST DI RECUPERO**

I risultati dei test di recupero post esposizione a Gefitinib sono stati ottenuti seminando, al termine del test citotossico, le cellule dei differenti gruppi di trattamento in terreno semisolido. I dati sperimentali sono riportati come distribuzione scatter e numero medio delle CFU/pozzetto.

Di seguito saranno descritte le CFU medie  $\pm$  deviazione standard dei differenti trattamenti ottenute con il ceppo HL-60 TV (Figura 47), con il ceppo HL-60 CRO (Figura 48), con il ceppo HL-60 BANCA (Figura 49) e con la linea KASUMI-1 (Figura 50). In ciascuna di queste Figure è stata inserita una Tabella delle significatività statistiche analoga a quella mostrata per i test di citotossicità.

- *LINEA HL-60 CEPPPO TV (FIGURA 47)*

Le CFU medie sviluppatasi nelle colture di controllo sono  $102.10 \pm 34.72$ , mentre quelle del Contr<sub>1</sub> sono  $139.40 \pm 45.51$ . Nelle colture trattate le CFU medie sono:  $3.21 \pm 3.64$  per D1;  $37.13 \pm 18.67$  per D2;  $92.29 \pm 42.46$  per D3;  $116.30 \pm 47.71$  per D4 e  $119.00 \pm 48.71$  per D5.

L'analisi statistica eseguita sui dati di questa Figura mostra che: *I*) l'incremento di CFU medie in Contr<sub>1</sub> rispetto a quelle di controllo è significativo; *II*) il decremento delle CFU medie in D1 e D2 è significativo rispetto a entrambi i controlli; *III*) le CFU medie in D3 non variano rispetto al controllo ( $p > 0.05$ ), ma sono significativamente più basse rispetto a Contr<sub>1</sub>; *IV*) le CFU medie in D4 e D5 non variano rispetto a entrambi i controlli ( $p > 0.05$ ).

- *LINEA HL-60 CEPPPO CRO (FIGURA 48)*

Le CFU medie sviluppatasi nelle colture di controllo sono  $75 \pm 16.54$ , mentre quelle del Controllo<sub>1</sub> sono  $11.71 \pm 9.86$ . Nelle colture trattate con D1 non si è sviluppata alcuna CFU, mentre negli altri trattamenti le CFU medie sono  $1.17 \pm 3.03$  per D2;  $4.04 \pm 4.5$  per D3;  $25.88 \pm 17.52$  per D4 e  $63.38 \pm 23.75$  per D<sub>5</sub>.

I confronti statistici evidenziano: I) il decremento significativo delle CFU medie dei dosaggi D1, D2, D3 e D4 rispetto alle CFU medie del controllo; II) l'incremento significativo delle CFU medie osservate in D5 rispetto al Controllo<sub>1</sub>.

- *LINEA HL-60 CEPPPO BANCA (FIGURA 49)*

Le CFU medie sviluppatasi nelle colture di controllo sono  $133.4 \pm 41.5$ , mentre quelle di Controllo<sub>1</sub> sono  $78.78 \pm 26.85$ . Nelle colture trattate con D1 e D2 non si è sviluppata alcuna CFU, mentre negli altri trattamenti le CFU medie sono  $6.50 \pm 7.11$  per D3;  $74.28 \pm 31.44$  per D4 e  $133.6 \pm 27.96$  per D5.

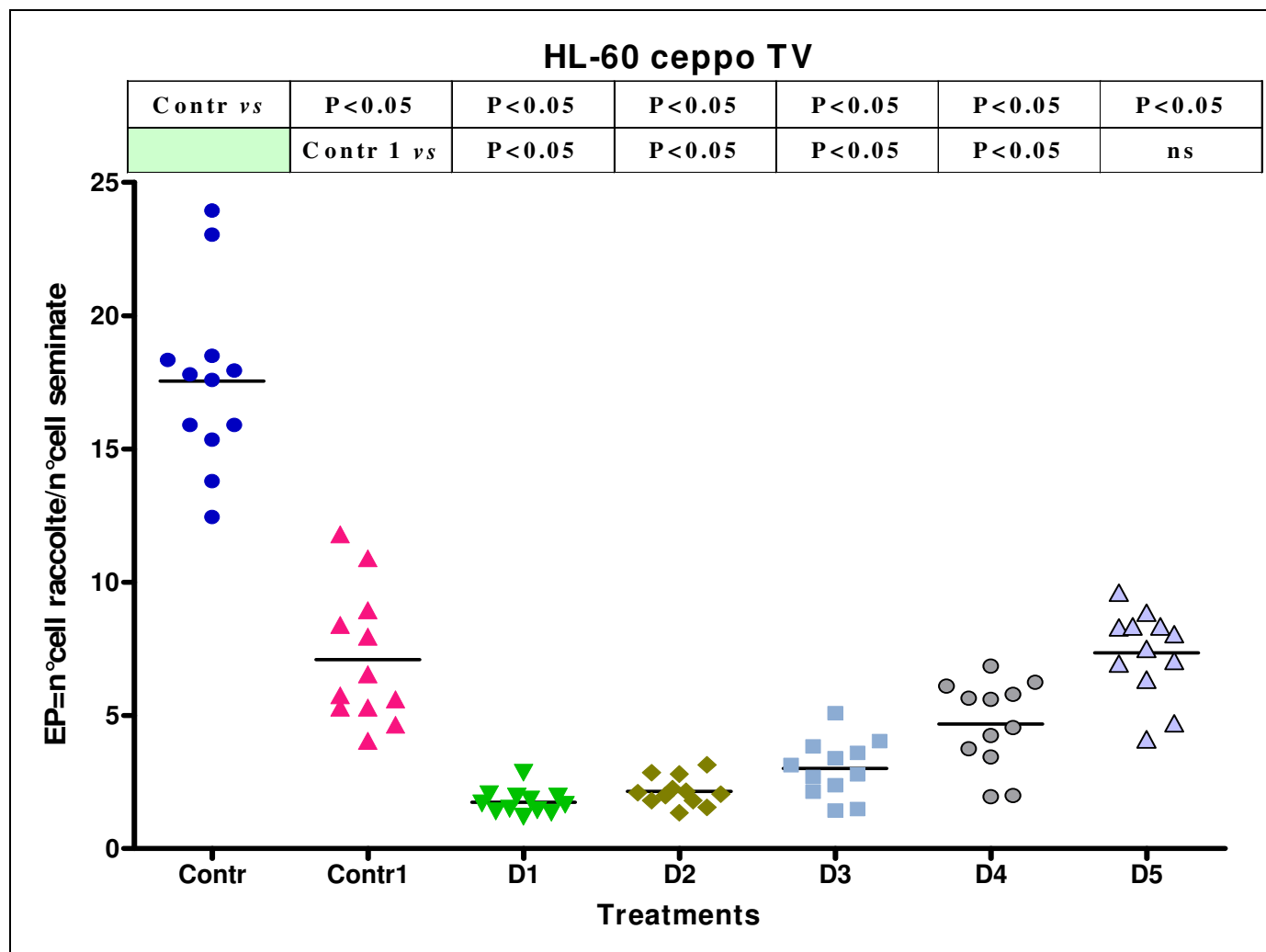
I confronti statistici evidenziano: I) il decremento significativo delle CFU medie di tutti i dosaggi rispetto alle CFU medie del controllo tranne che per D5; II) il decremento significativo delle CFU medie dei dosaggi D1, D2, D3 rispetto al Controllo<sub>1</sub>; III) l'incremento significativo delle CFU medie osservate in D5 è rispetto al Controllo<sub>1</sub>.

- *LINEA KASUMI-1 (FIGURA 50)*

Le CFU medie sviluppatasi nelle colture KASUMI-1 di controllo sono  $111.5 \pm 2.81$ , mentre quelle del Controllo<sub>1</sub> sono  $88.66 \pm 3.02$ . Nelle colture trattate con D1 non si è sviluppata alcuna CFU, mentre negli altri trattamenti le CFU medie sono  $1.84 \pm 1.59$  per D2;  $6.47 \pm 4.79$  per D3;  $15.34 \pm 2.08$  per D4 e  $23.97 \pm 4.38$  per D5.

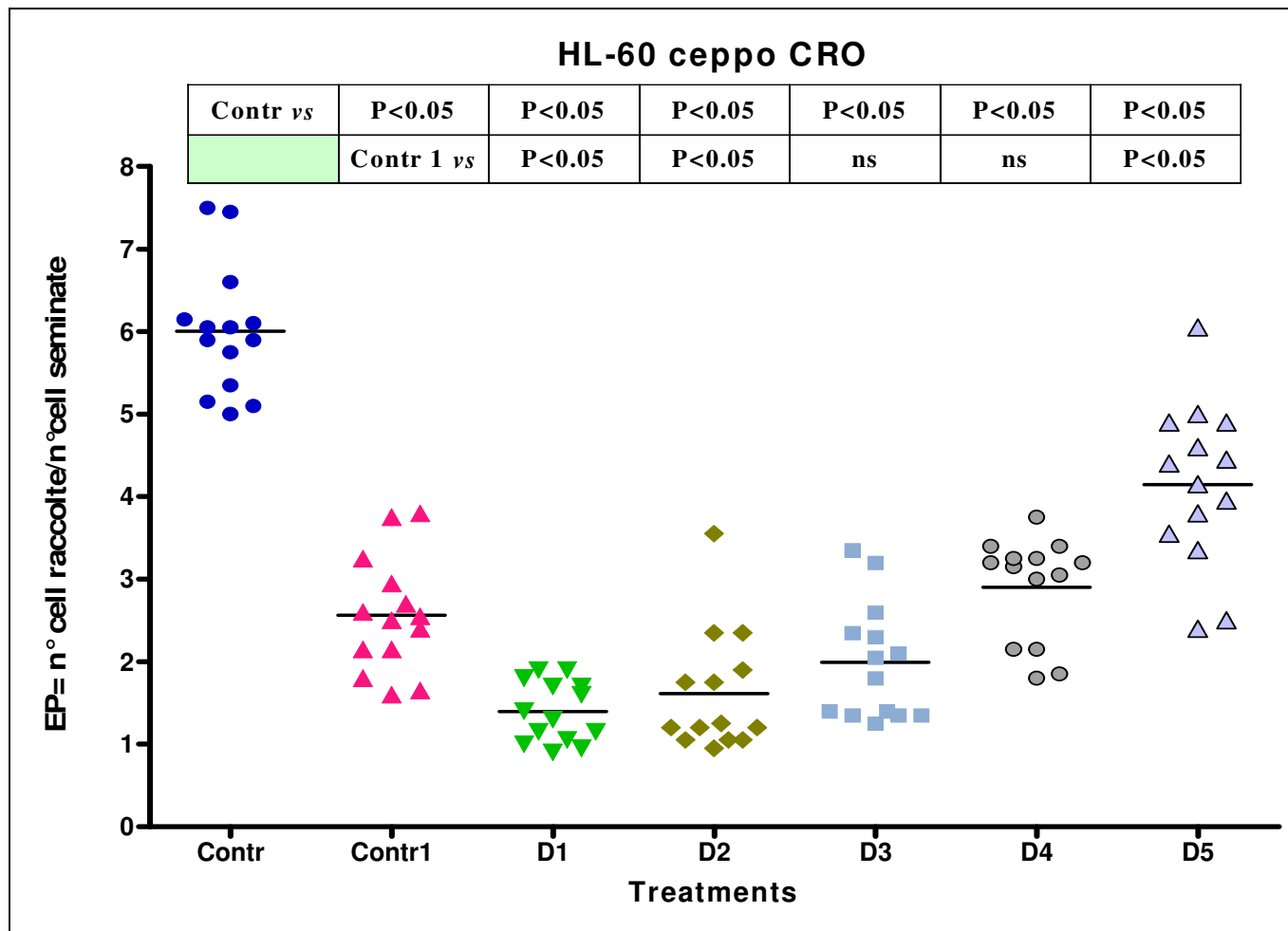
I confronti statistici evidenziano il decremento significativo delle CFU medie di tutti i dosaggi rispetto alle CFU medie del controllo e del controllo<sub>1</sub>.





**Fig. 43:** risultati dei test colturali a breve termine condotti per valutare gli effetti esercitati sulla linea cellulare HL-60 ceppo TV dal Gefitinib: C=Controllo, C1=Controllo con DMSO; D1=0.040mM; D2=0.035mM; D3=0.030mM; D4=0.025mM; D5=0.020mM. I risultati sono espressi come EP medie con distribuzione scatter e un livello di significatività  $p < 0.05$

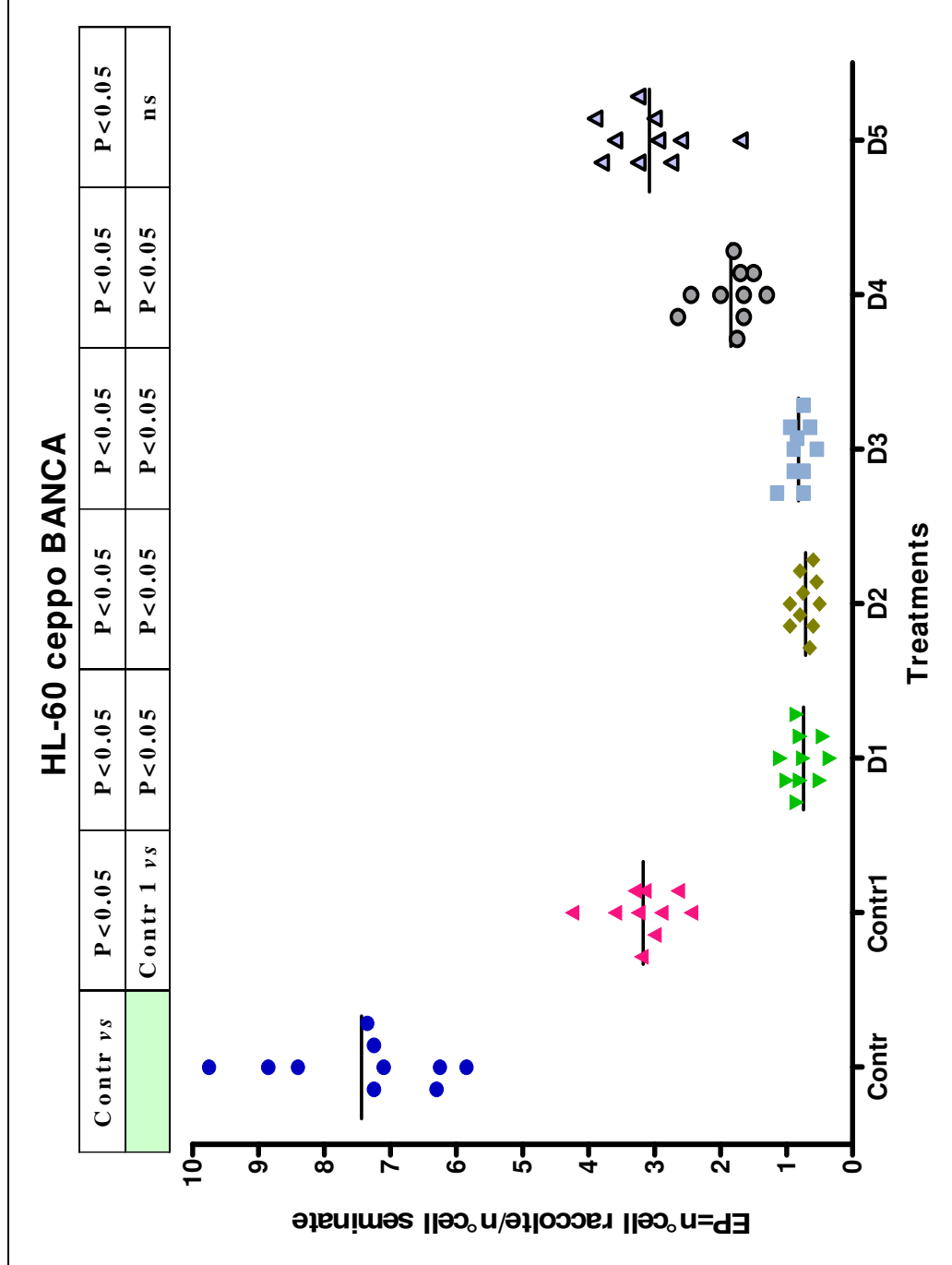




**Fig. 44:** risultati dei test colturali a breve termine condotti per valutare gli effetti esercitati sulla linea cellulare HL-60 ceppo CRO dal Gefitinib: C=Controllo, C1=Controllo con DMSO; D1=0.040mM; D2=0.035mM; D3=0.030mM; D4=0.025mM; D5=0.020mM. I risultati sono espressi come EP medie con distribuzione scatter e un livello di significatività  $p < 0.05$

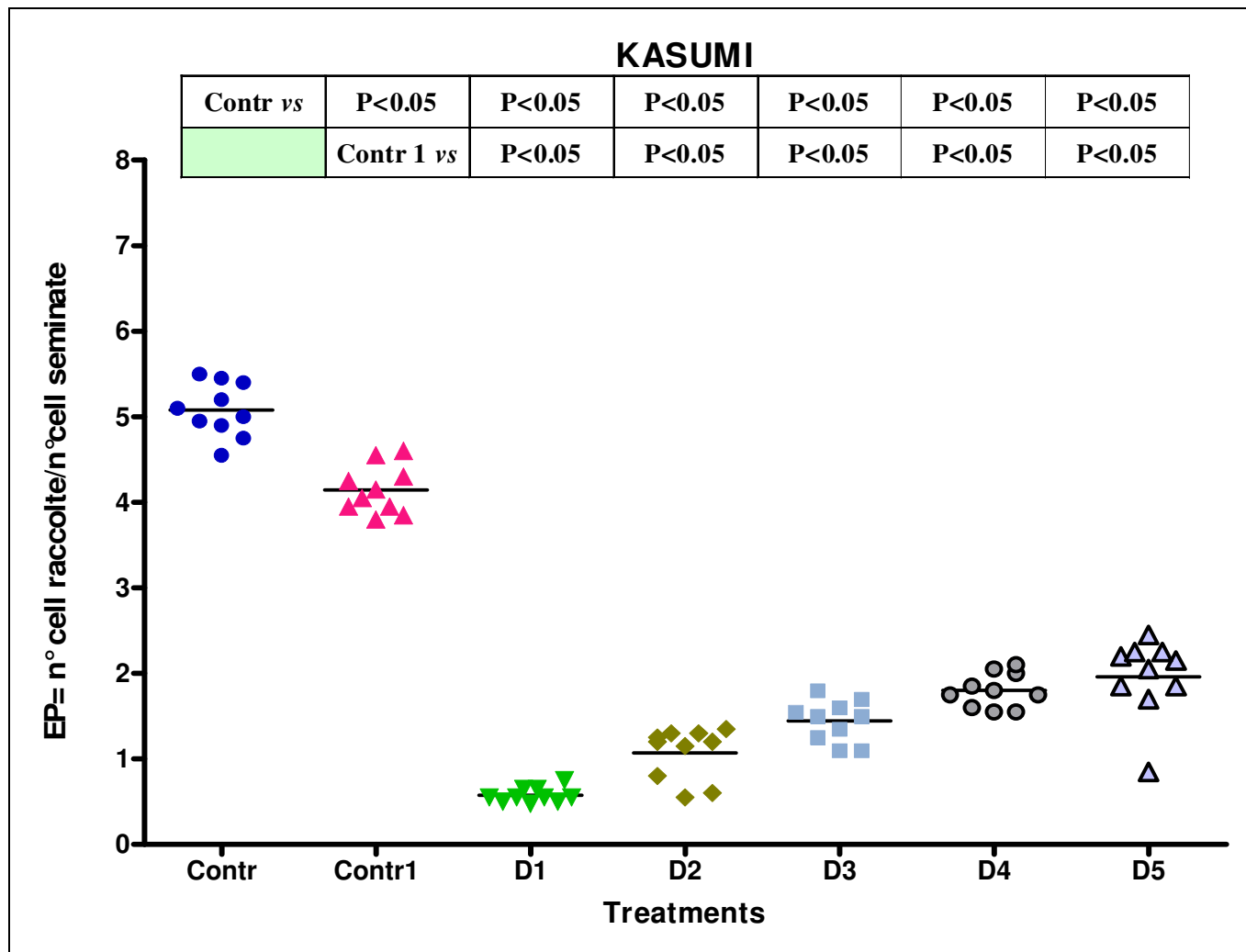






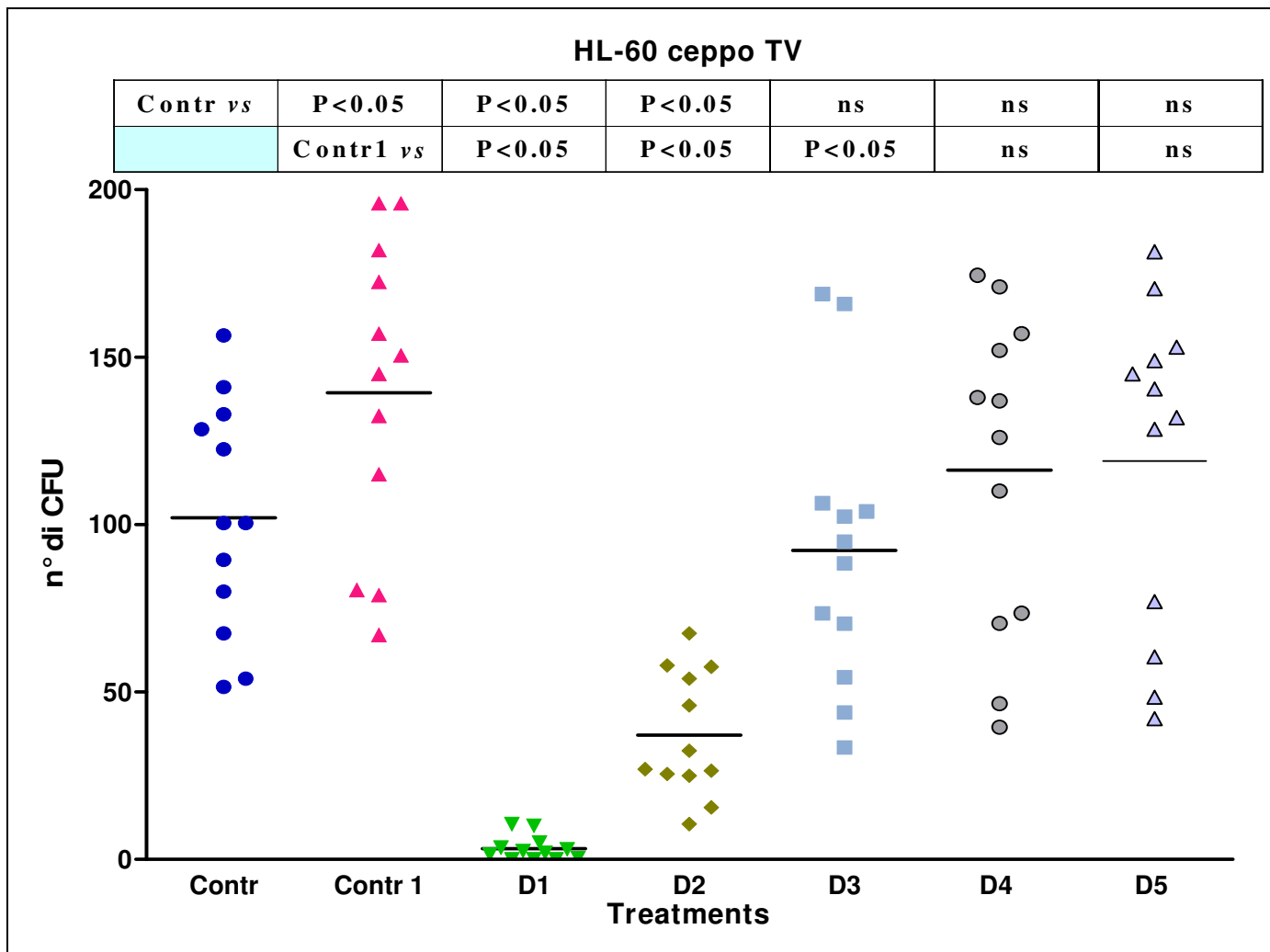
**Fig. 45** risultati dei test colturali a breve termine condotti per valutare gli effetti esercitati sulla linea cellulare HL-60 ceppo BANCA dal Gefitinib; C=Controllo, C1=Controllo con DMSO; D1=0.040mM; D2=0.035mM; D3=0.030mM; D4=0.025mM; D5=0.020mM. I risultati sono espressi come EP medie con distribuzione scatter e un livello di significatività  $p < 0.05$





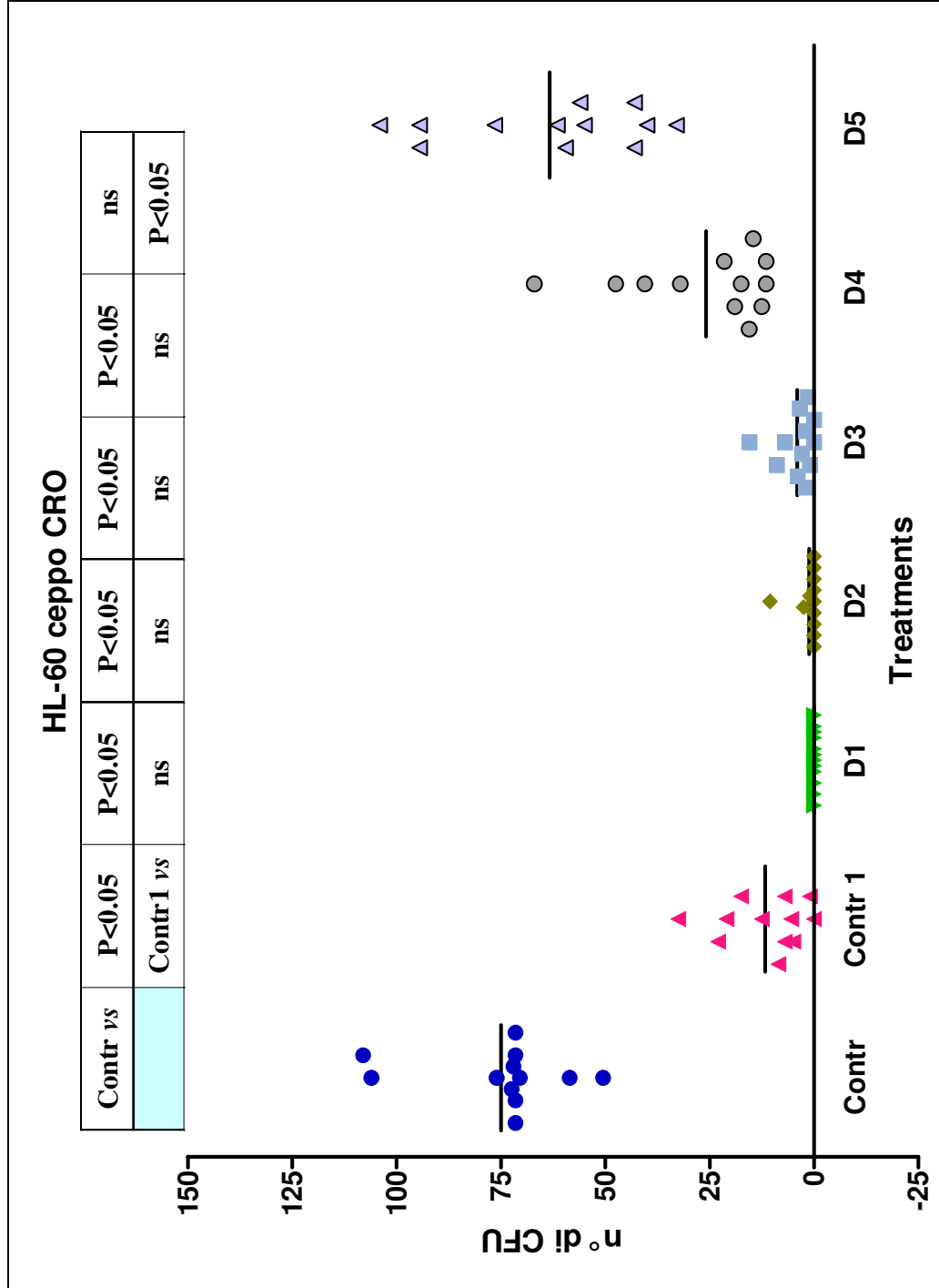
**Fig. 46:** risultati dei test colturali a breve termine condotti per valutare gli effetti esercitati sulla linea cellulare KASUMI-1 dal Gefitinib: C=Controllo, C1=Controllo con DMSO; D1=0.040mM; D2=0.035mM; D3=0.030mM; D4=0.025mM; D5=0.020mM. I risultati sono espressi come EP medie con distribuzione scatter e un livello di significatività  $p < 0.05$





**Fig. 47:** risultati dei test colturali a medio termine condotti per valutare il recupero della linea cellulare HL-60 ceppo TV dopo esposizione al Gefitinib: C=Controllo, C1=Controllo con DMSO; D1=0.040mM; D2=0.035mM; D3=0.030mM; D4=0.025mM; D5=0.020mM. I risultati sono espressi come CFU medie con distribuzione scatter e un livello di significatività  $p < 0.05$

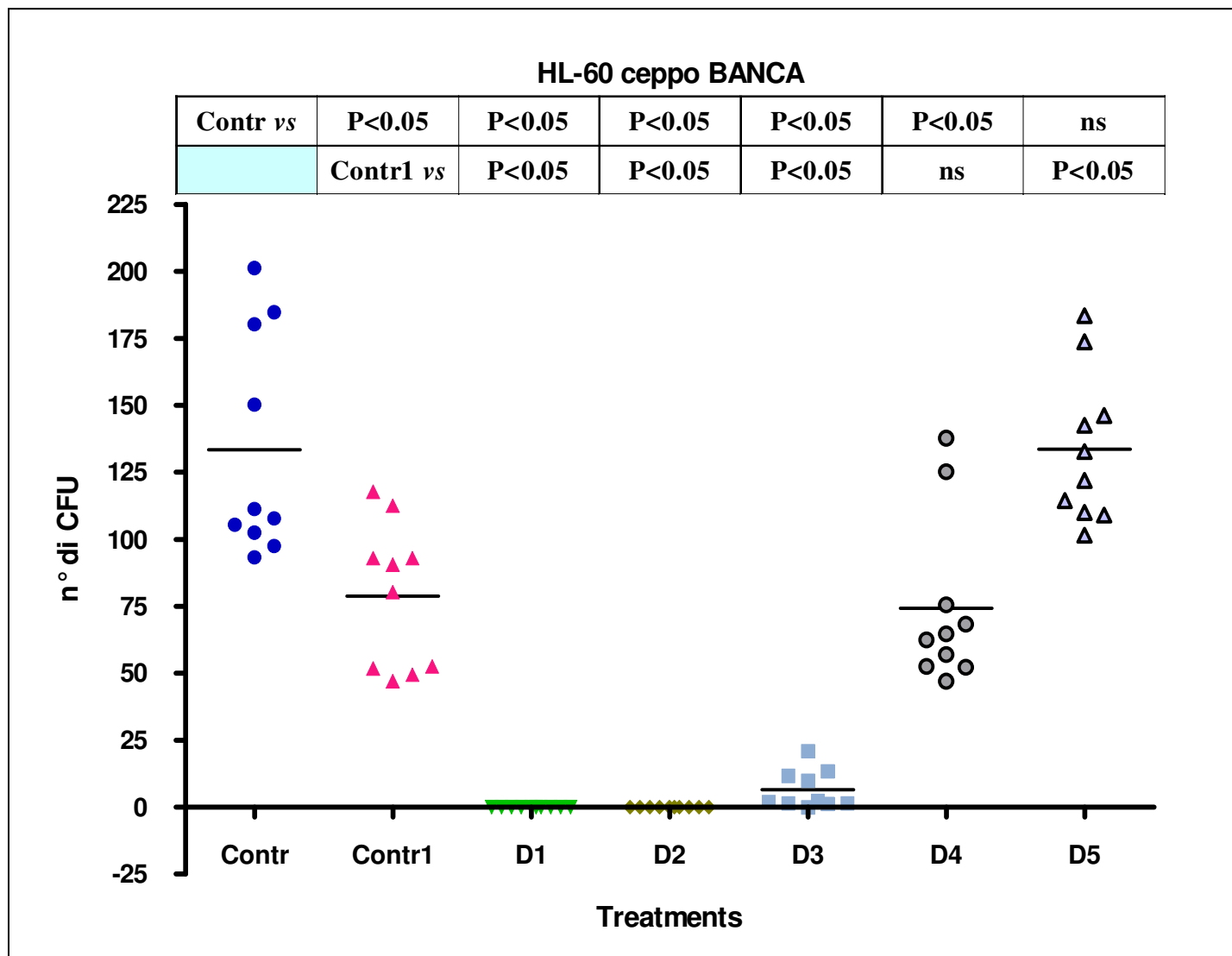




**Fig. 48:** risultati dei test colturali a medio termine condotti per valutare il recupero della linea cellulare HL-60 ceppo CRO dopo esposizione al Gefitinib: C=Controllo, C1=Controllo con DMSO; D1=0.040mM; D2=0.035mM; D3=0.030mM; D4=0.025mM; D5=0.020mM. I risultati sono espressi come CFU medie con distribuzione scatter e un livello di significatività p<0.05

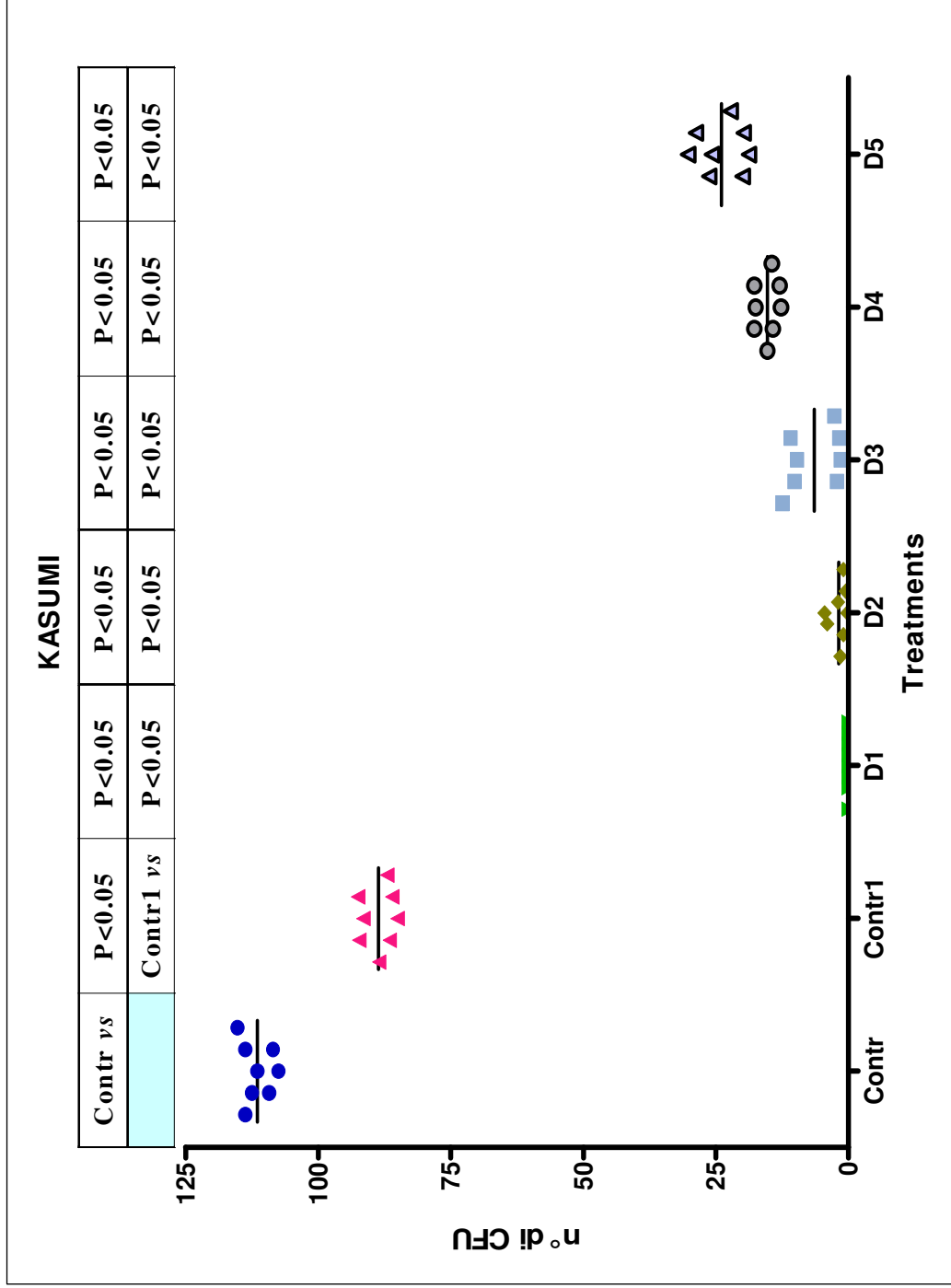






**Fig. 49:** risultati dei test colturali a medio termine condotti per valutare il recupero della linea cellulare HL-60 ceppo BANCA dopo esposizione al Gefitinib: C=Controllo, C1=Controllo con DMSO; D1=0.040mM; D2=0.035mM; D3=0.030mM; D4=0.025mM; D5=0.020mM. I risultati sono espressi come CFU medie con distribuzione scatter e un livello di significatività  $p < 0.05$





**Fig. 50:** risultati dei test colturali a medio termine condotti per valutare il recupero della linea cellulare KASUMI-1 dopo esposizione al Gefitinib: C=Controllo, C1=Controllo con DMSO; D1=0.040mM; D2=0.035mM; D3=0.030mM; D4=0.025mM; D5=0.020mM. I risultati sono espressi come CFU medie con distribuzione scatter e un livello di significatività  $p < 0.05$



### **§3.5.3 CARATTERIZZAZIONE MORFOLOGICA POST-ESPOSIZIONE A GEFITINIB**

L'analisi morfologica post-esposizione a Gefitinib è stata eseguita su preparati allestiti a partire dalle sospensioni cellulari ottenute alla fine del test in coltura a breve termine.

- *LINEA HL-60 CEPPO TV (FIGURA 51)*

- CONTROLLO

In questi preparati sono evidenziabili tipici blasti caratterizzati da un nucleo grande, sferoidale, prominente con margini distinti e regolari, posto al centro della cellula o addossato alla membrana cellulare e privo di nucleoli. Il citoplasma è ampio e non vacuolizzato. Sono evidenti cellule in mitosi ed elementi con tipica capacità fagocitica a danno delle rare cellule picnotiche. (Immagine A di Figura 51)

- CONTROLLO<sub>1</sub>

Le osservazioni microscopiche evidenziano che, in questi preparati, circa il 30% delle cellule è costituito da piccoli elementi picnotici con rapporto nucleo/citoplasma a favore del primo. Le altre cellule conservano i caratteri di blasti anche se con evidenti vacuolizzazioni citoplasmatiche. La fagocitosi sembra incrementata (Immagine B di Figura 51)

- DOSAGGIO D1

Questi preparati sono caratterizzati dalla presenza di debries cellulari e da elementi nucleari picnotici, talvolta con ridotti residui citoplasmatici (Immagine C di Figura 51). Sono osservabili rarissimi elementi cellulari ancora strutturati, ma con citoplasma schiumoso per la presenza di vacuoli.

- DOSAGGIO D2

Le osservazioni microscopiche evidenziano quadri morfologici simili a quelli descritti per il dosaggio D1. Comunque, rispetto ai precedenti preparati aumenta il numero di cellule schiumose che manifestano pure proprietà fagocitarie (Immagine D di Figura 51).

- DOSAGGIO D3

In questi preparati si riduce la quantità dei debries cellulari e degli elementi picnotici mentre le cellule schiumose raggiungono approssimativamente il 50%. (Immagine E di Figura 51)

– DOSAGGI D4 E D5

In questi preparati il numero degli elementi picnotici si riduce sostanzialmente fino a scomparire. Al loro posto si osservano cellule a citoplasma schiumoso e blasti non alterati che diventano preponderanti di numero nei preparati D5. Ad entrambi i dosaggi non sono visibili mitosi (Immagine F per D4 e G per D5 Figura 51).

• *LINEA HL-60 CEPPO CRO (FIGURA 52)*

– CONTROLLO

La morfologia delle cellule HL-60CRO di controllo è simile a quella osservata nei corrispondenti preparati del ceppo HL-60TV anche se l'anisometria cellulare è maggiore, il nucleo appare prevalentemente addossato alla membrana citoplasmatica con uno o più nucleoli ipocromici (Immagine A Figura 52).

– CONTROLLO<sub>1</sub>

Le osservazioni microscopiche evidenziano che, in questi preparati, circa un terzo delle cellule mantiene sostanzialmente invariata la morfologia dei controlli con alterazioni a livello dei margini citoplasmatici che appaiono irregolari e frastagliati. Le restanti cellule presentano gradi differenti di picnosi e/o riduzione del citoplasma o sono completamente prive di nucleo (Immagine B Figura 52).

– DOSAGGIO D1

Questi preparati sono caratterizzati dalla presenza di debries cellulari tra cui si individuano rare cellule con morfologia variamente alterata (Immagine C Figura 52).

– DOSAGGIO D2

In questi preparati la quantità dei debries si riduce drasticamente. Le cellule sono anisometriche e presentano talvolta ampi vacuoli citoplasmatici perinucleari (Immagine D Figura 52).

– DOSAGGIO D3; D4; D5

In questi preparati sono presenti cellule con margini frastagliati e vescicole citoplasmatiche e/o nucleare. Il loro numero diminuisce progressivamente a favore di cellule con caratteristiche simili ai controlli con il decremento del dosaggio (Immagine E per D3, Immagine F per D4 e Immagine G per D5 Figura 52).

Globalmente, le osservazioni microscopiche dei preparati colorati con May-Grunwald Giemsa non evidenziano alcun fenomeno di segmentazione e banding nucleare

tipico del differenziamento della filiera mieloide da promielocita a mielocita e metamielocita.

- *LINEA HL-60 CEPPO BANCA (FIGURA 53)*

- CONTROLLO

La morfologia delle cellule di controllo è simile a quella osservata nei corrispondenti preparati dei ceppi precedenti, con tipici blasti caratterizzati da un nucleo molto grande, sferoidale e posto al centro della cellula. Lo spazio rimanente è occupato da citoplasma non vacuolizzato (Immagine A Figura 53).

- CONTROLLO<sub>1</sub>

Le osservazioni microscopiche evidenziano che, in questi preparati, le cellule mantengono sostanzialmente invariata la morfologia dei controlli con leggere alterazioni a livello dei margini citoplasmatici che appaiono irregolari e frastagliati (Immagine B Figura 53).

- DOSAGGIO D1

I preparati sono caratterizzati dalla presenza di debries cellulari tra cui si individuano rare cellule con morfologia variamente alterata (Immagine C Figura 53).

- DOSAGGIO D2

In questi preparati la quantità dei debries si riduce molto. Le cellule sono anisometriche e presentano talvolta ampi vacuoli citoplasmatici perinucleari. Sono presenti piccoli elementi picnotici con rapporto nucleo/citoplasma a favore del primo (Immagine D2 Figura 53).

- DOSAGGIO D3

In questi preparati si riduce ulteriormente la quantità dei debries cellulari e degli elementi picnotici (Immagine E Figura 53).

- DOSAGGI D4 E D5

In questi preparati il numero degli elementi picnotici si riduce sostanzialmente fino a scomparire in D5. Al loro posto si osservano blasti non alterati che diventano preponderanti di numero nei preparati D5. Ad entrambi i dosaggi non sono visibili mitosi (Immagine F per D4 e G per D5 Figura 53).

- *LINEA KASUMI-1 (FIGURA 54)*

- CONTROLLO

Nei preparati di controllo sono visibili blasti caratterizzati da un nucleo sferoidale, grande posto centralmente alla cellula. Il citoplasma è ampio e non vacuolizzato. Sono evidenti cellule in mitosi (Immagine A Figura 54).

- CONTROLLO<sub>1</sub>

Le osservazioni microscopiche evidenziano che, in questi preparati, le cellule mantengono sostanzialmente invariata la morfologia dei controlli con alterazioni a livello citoplasmatico e nucleico che appaiono vacuolizzati (Immagine B Figura 54).

- DOSAGGIO D1 E DOSAGGIO D2

Questi preparati sono caratterizzati dalla presenza di debries cellulari tra cui si individuano rare cellule con morfologia variamente alterata. (Immagine C per D1 e D per D2 Figura 54).

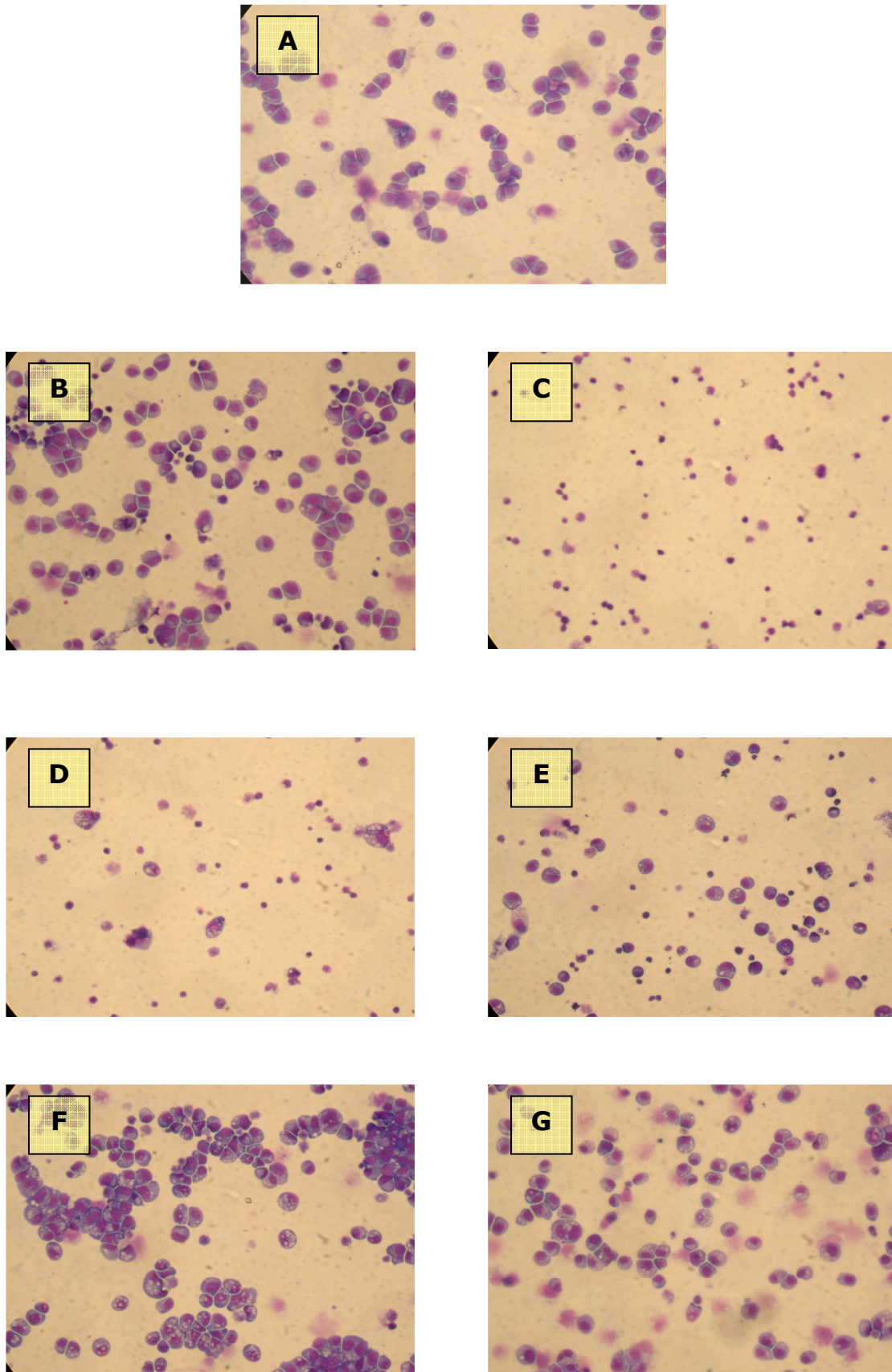
- DOSAGGIO D3 E DOSAGGIO D4

In questi preparati il numero di debries cellulari diminuisce drasticamente. Sono presenti cellule con margini frastagliati e vescicole citoplasmatiche e/o nucleari. Il loro numero diminuisce progressivamente a favore di cellule con caratteristiche simili ai controlli con il decremento del dosaggio. (Immagine E per D3 e F per D4 Figura 54)

- DOSAGGIO D5

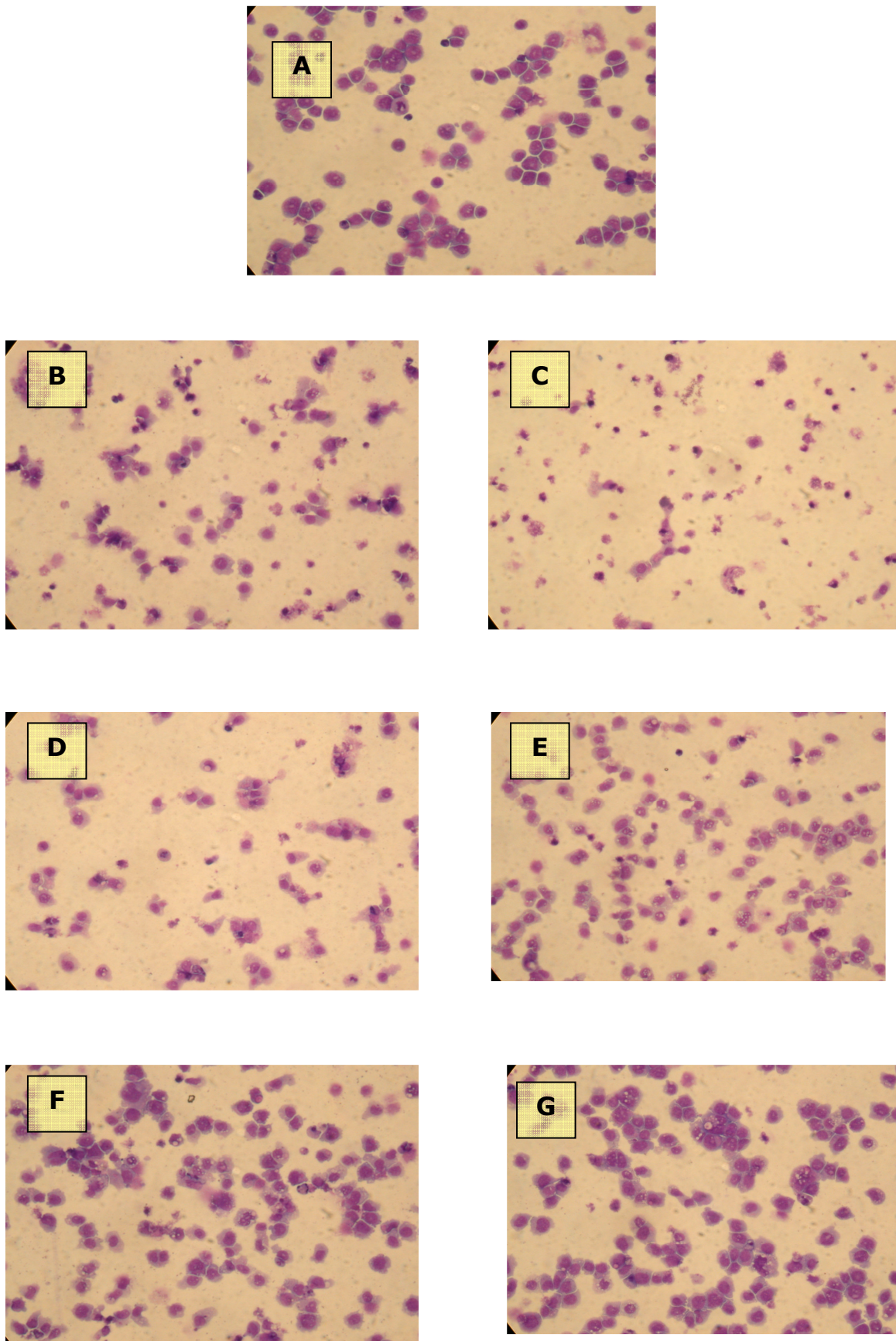
In questi preparati il numero degli elementi picnotici si riduce sostanzialmente fino a scomparire. Al loro posto si osservano blasti non alterati che diventano preponderanti di numero (Immagine G Figura 54).





**Fig. 51:** immagini ottenute all'end-point del test culturale a breve termine con Gefitinib del ceppo cellulare HL-60 ceppo TV. **(A)** Contr, **(B)** Contr<sub>1</sub>, **(C)** D1, **(D)** D2, **(E)** D3, **(F)** D4 e **(G)** D5.

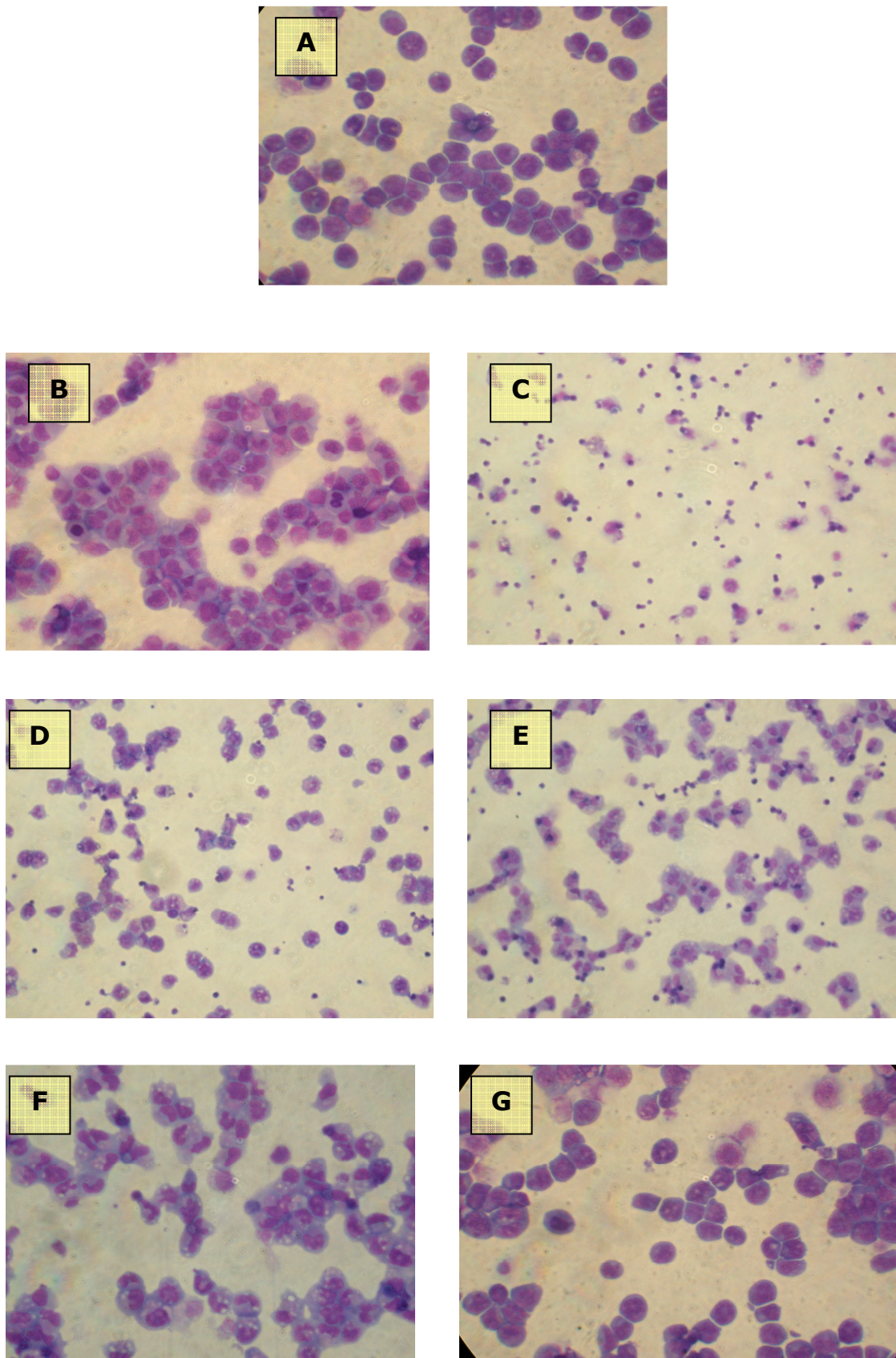




**Fig. 52:** immagini ottenute all'end-point del test culturale a breve termine con Gefitinib del ceppo cellulare HL-60 ceppo CRO. **(A)** Contr, **(B)** Contr<sub>1</sub>, **(C)** D1, **(D)** D2, **(E)** D3, **(F)** D4 e **(G)** D5.

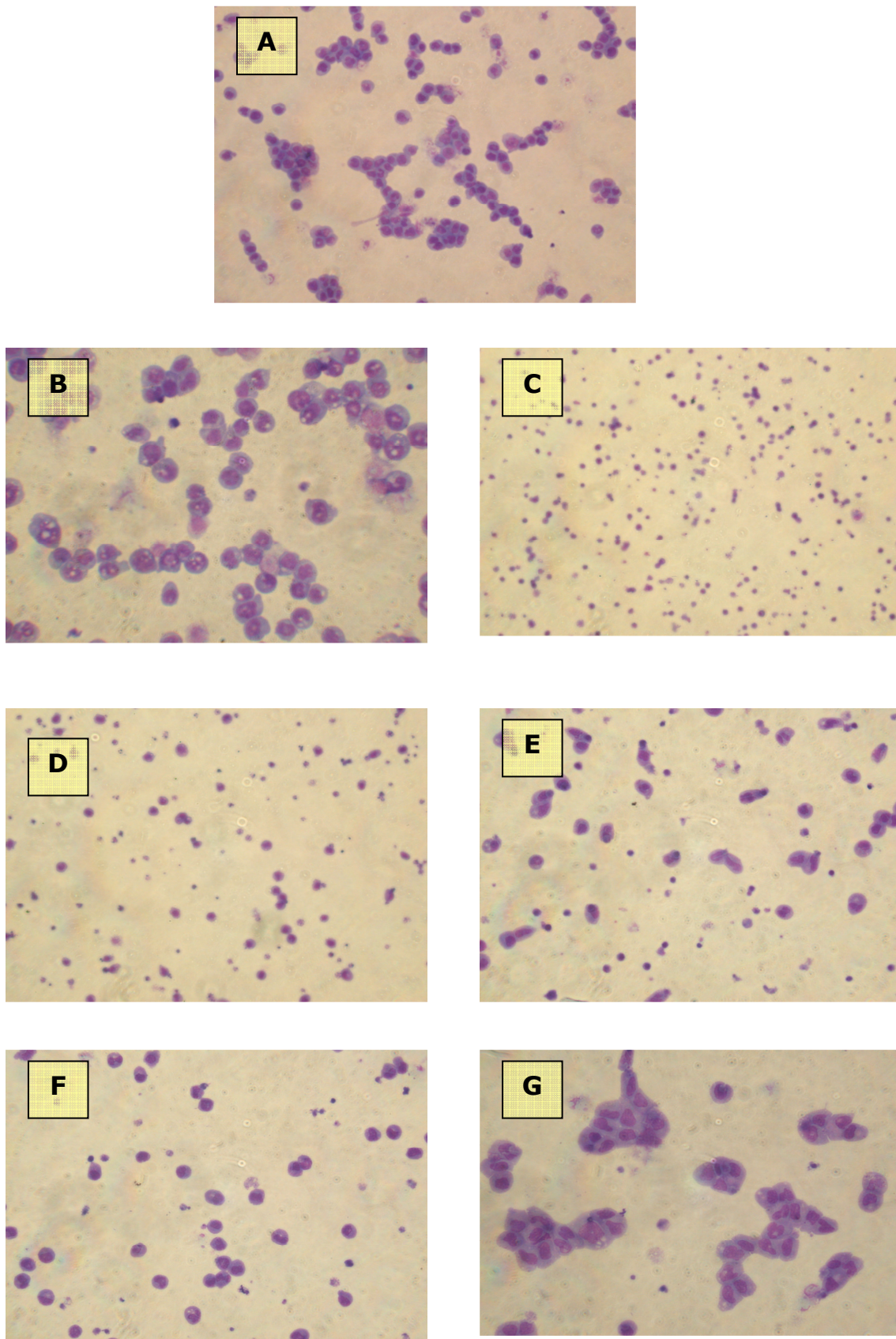






**Fig. 53:** immagini ottenute all'end-point del test culturale a breve termine con Gefitinib del ceppo cellulare HL-60 ceppo BANCA. **(A)** Contr, **(B)** Contr<sub>1</sub>, **(C)** D1, **(D)** D2, **(E)** D3, **(F)** D4 e **(G)** D5.





**Fig. 54:** immagini ottenute all'end-point del test colturale a breve termine con Gefitinib della linea KASUMI-1. **(A)** Contr, **(B)** Contr<sub>1</sub>, **(C)** D1, **(D)** D2, **(E)** D3, **(F)** D4 e **(G)** D5.





### **§3.5.4 ESPRESSIONE DEI MARKERS DI DIFFERENZIAMENTO GRANULOCITARIA POST-ESPOSIZIONE A GEFITINIB**

I risultati della caratterizzazione citofluorimetrica sono riportati nelle Tabelle XXIII, XXIV, XXV e XXVI. I valori sono espressi in percentuale di espressione del marcatore  $\pm$  deviazione standard.

- *LINEA HL-60 CEPPPO TV (TABELLA XXIII)*

L'espressione antigenica delle cellule esposte ai due dosaggi minori di Gefitinib rispetto ai controlli rimane pressoché invariata sia nei saggi a breve termine (72 ore) che nei test di recupero. Fa eccezione l'antigene CD11b che diminuisce percentualmente nel Controllo1 (50.8%) e nei due trattati (35.9% in D4 e 36.9% in D5) rispetto al controllo (77.7%) nei saggi di crescita a breve termine, mentre nei test di recupero si abbassa percentualmente in modo simile in tutti i campioni, compreso il controllo (49%).

L'espressione del CD33, al termine dei saggi di crescita a breve termine, sembra diminuire in maniera direttamente proporzionale al dosaggio di farmaco passando dal 96.5% nel controllo al 93.7% nel Controllo1, al 77.9% in D4 e al 82.8% in D5. Nello stesso modo nei test di recupero dopo 14 giorni di coltura, l'antigene CD33 viene espresso in percentuali inferiori in Contr1 (94.5), D4 (86.6%) e D5 (87.3%) rispetto al controllo (96%).

- *LINEA HL-60 CEPPPO CRO (TABELLA XXIV)*

Anche in questa linea l'espressione antigenica delle cellule esposte a tutti i dosaggi di Gefitinib rispetto ai controlli rimane pressoché invariata. Fa eccezione solamente l'antigene CD14 che diminuisce percentualmente nei saggi di crescita a breve termine nei trattati (58.2% in D4 e 59.3% in D5) rispetto ai controlli (88.1% nel controllo e 87.7% nel controllo1).

- *LINEA HL-60 CEPPPO BANCA (TABELLA XXV)*

L'espressione antigenica delle cellule esposte a tutti i dosaggi di Gefitinib rispetto ai controlli rimane pressoché invariata. Fa eccezione l'antigene CD14 che diminuisce percentualmente nei saggi di crescita a breve termine dal 74.2% del controllo e 74% del controllo1 al 50% in D4 e al 61.7% in D5.

- *LINEA KASUMI-1 (TABELLA XXVI)*

Anche in questa linea l'espressione antigenica delle cellule esposte a tutti i dosaggi di Gefitinib rispetto ai controlli rimane pressoché invariata. Fanno eccezione

l'antigene CD11b, che diminuisce percentualmente nei saggi di crescita a breve termine nei trattati (52.7% in D4 e 55.3% in D5) rispetto ai controlli (60.8% in C e 61.9% in Contr1). Nello stesso modo anche l'espressione del CD33 passa dal 99.3% nel controllo e 99.2% nel controllo1 all'89.7% del D4 e al 90.6% del D5.

MARCATORI	HL-60 ceppo TV post esposizione a GEFITINIB							
	72 ORE				TEST DI RECUPERO			
	C	C1	D4	D5	C	C1	D4	D5
HLA-DR	2±0.71	2.3±0.33	2.3±5.24	1.9±0.75	2.2±0.20	2.2±0.11	2.2±0.50	2.1±0.59
CD4	0.2±0.55	0.7±0.91	0.7±0.04	0.9±0.65	0.9±0.41	0.9±0.95	0.8±0.30	0.9±0.46
CD11B	77.7±1.61	50.8±0.76	35.8±4.39	16.9±4.19	9.0±0.46	9.6±3.35	9.6±1.03	10.1±2.25
CD14	89.3±1.71	89.5±0.17	89.9±0.75	88.5±0.21	88.1±0.11	89.1±0.21	89.9±0.36	88.9±0.4
CD15	0.5±0.19	0.5±0.01	0.9±0.67	0.9±0.95	0.9±0.57	0.8±0.09	0.9±0.05	0.8±0.15
CD16	1.6±0.34	1.5±0.65	1.8±0.55	1.9±0.66	1.7±0.90	1.4±0.85	1.5±0.46	1.6±0.53
CD33	96.4±0.40	93.6±0.55	77.8±1.64	82.8±0.55	96.0±0.45	94.5±0.44	86.6±0.25	87.2±0.21
CD44	1.1±0.15	1.5±0.31	1.0±0.65	1.1±0.30	1.7±0.51	1.7±0.10	1.5±0.33	1.7±0.06
CD45	61.8±1.04	62.6±1.56	62.3±2.28	62.2±2.16	62.4±0.89	62.2±2.86	62.6±0.47	62.3±2.67

**Tab. XXIII** : risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea HL-60 ceppo TV: controllo (C), controllo con DMSO (C1) e i due dosaggi maggiori di Gefitinib (D4 e D5). Analisi effettuata dopo 72 ore di incubazione in terreno liquido (72 ORE) e dopo 14 giorni di coltura in terreno semisolido (TEST DI RECUPERO). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo ± deviazione standard.

MARCATORI	HL-60 ceppo CRO post esposizione a GEFITINIB							
	72 ORE				TEST DI RECUPERO			
	C	C1	D4	D5	C	C1	D4	D5
HLA-DR	71,6±5.62	69.9±6.18	71.2±1.78	72.6±5.38	71.0±0.9	71.7±5.26	71.5±0.3	71.2±14.8
CD4	86,0±1.89	85.9±2.31	87.0±1.95	86.2±3.21	86.8±2.08	87.6±3.39	86.1±14.35	87.6±0.8
CD11B	99.8±0.23	99.0±0.71	99.5±0.06	99.8±0.56	99.9±0.6	98.9±0.51	98.3±0.61	99.7±0.19
CD14	88.1±0.06	87.7±0.31	58.2±0,31	59.2±0.15	88.3±0.15	88.0±0.01	89.8±0.44	88.2±0.84
CD15	99.2±0.06	99.9±0.00	98.3±0.55	99.0±0.33	99.1±0.33	99.4±0.14	98.7±0.88	99.1±0.95
CD16	14.6±0.46	14.9±1.66	14.0±1.45	14.9±1.74	13.0±1.74	14.5±2.95	14.2±1.22	14.5±3.03
CD33	97.7±0.06	97.3±0.11	98.0±1.17	97.1±1.47	98.3±1.47	98.8±0.81	98.73±0.06	98.1±0.47
CD44	99.6±0.15	99.6±0.21	99.6±0.26	99.5±0.17	99.8±0.17	99.7±0.14	99.6±0.25	99.3±0.11
CD45	100±0.00	100±0.00	99.7±0.02	100±0.00	100±0.00	100±0.00	99.8±0.15	100±0.00

**Tab. XXIV** : risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea HL-60 ceppo CRO: controllo (C), controllo con DMSO (C1) e i due dosaggi maggiori di Gefitinib (D4 e D5). Analisi effettuata dopo 72 ore di incubazione in terreno liquido (72 ORE) e dopo 14 giorni di coltura in terreno semisolido (TEST DI RECUPERO). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo ± deviazione standard.

MARCATORI	HL-60 ceppo BANCA post esposizione a GEFITINIB							
	72 ORE				TEST DI RECUPERO			
	C	C1	D4	D5	C	C1	D4	D5
HLA-DR	4.0±1.61	4.1±3.17	4.0±3.19	4.0±0.92	4.1±3.06	4.1±1.79	4.1±2.52	4.1±2.78
CD4	98.7±0.25	98.5±0.26	98.8±0.21	97.0±1.18	97.5±1.07	98.1±0.10	98.7±0.98	98.4±0.01
CD11B	97.5±1.81	97.7±1.71	97.3±1.25	97.1±1.63	97.8±1.40	97.5±1.19	97.2±1.14	97.7±1.77
CD14	74.2±0.40	74.0±0.01	50.0±0.06	61.7±0.06	75.5±0.06	75.9±0.17	75.3±0.46	75.4±0.06
CD15	99.2±0.25	99.6±0.38	99.7±0.16	99.4±0.31	99.8±0.01	99.3±0.10	99.6±0.27	99.7±0.11
CD16	81.1±2.05	82.1±2.31	82.8±2.86	82.1±4.32	82.7±2.76	82.4±0.60	82.1±3.75	81.5±2.57
CD33	99.6±0.37	98.1±0.32	98.6±0.06	99.2±0.15	99.3±0.17	99.9±0.00	99.3±0.31	100±0.00
CD44	99.4±0.31	100±0.00	99.8±0.02	99.8±0.11	99.9±0.00	99.8±0.02	99.5±0.61	99.8±0.14
CD45	99.3±0.49	99.7±0.12	99.5±0.49	99.8±0.15	99.8±0.15	99.8±0.15	99.7±0.23	99.9±0.00

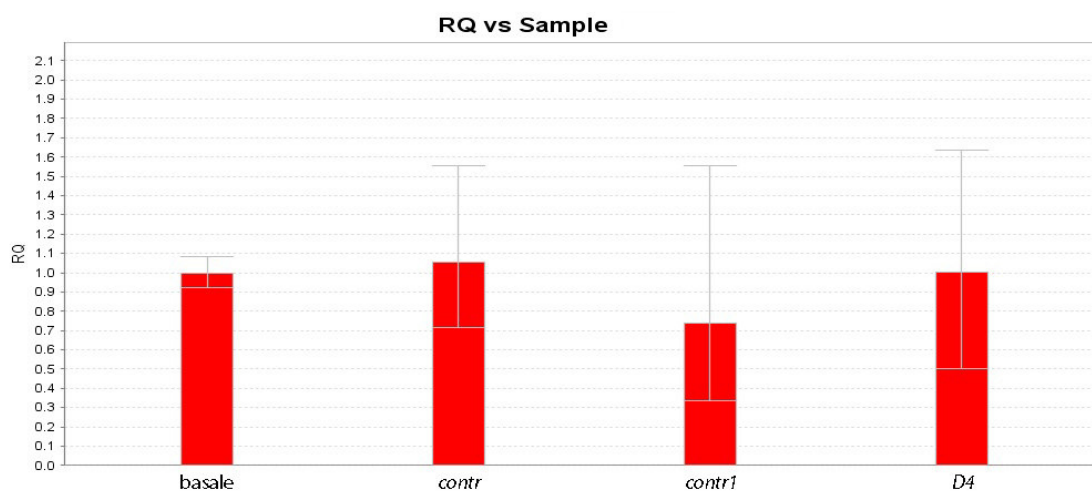
**Tab. XXV** : risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea HL-60 ceppo BANCA: controllo (C), controllo con DMSO (C1) e i due dosaggi maggiori di Gefitinib (D4 e D5). Analisi effettuata dopo 72 ore di incubazione in terreno liquido (72 ORE) e dopo 14 giorni di coltura in terreno semisolido (TEST DI RECUPERO). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo ± deviazione standard.

MARCATORI	KASUMI-1 post esposizione a GEFITINIB							
	72 ORE				TEST DI RECUPERO			
	C	C1	D4	D5	C	C1	D4	D5
HLA-DR	99.7±0.21	99.9±0.00	99.3±0.07	98.7±0.99	98.8±0.95	98.6±0.87	98.5±0.49	99.2±0.50
CD4	98.6±0.25	98.2±0.26	99.1±0.34	98.9±0.08	98.6±0.06	98.2±0.26	98.8±0.31	98.7±0.72
CD11B	60.8±0.96	61.9±0.51	52.7±0.36	55.3±1.51	61.6±0.98	61.1±1.21	61.5±1.64	61.8±1.18
CD14	7.4±1.70	7.7±2.09	7.3±1.42	7.5±1.29	7.5±2.12	7.4±1.80	7.3±1.03	7.2±1.30
CD15	85.2±1.76	85.0±2.66	85.9±2.55	84.7±5.03	84.6±3.85	84.9±4.42	84.6±5.29	85.1±2.48
CD16	30.7±2.11	30.1±3.65	30.8±1.91	31.1±2.82	31.4±3.79	31.4±2.17	31.7±1.77	32.1±3.16
CD33	99.3±0.44	99.2±0.21	89.7±2.42	90.6±2.32	99.9±0.00	99±0.07	99.8±0.37	98.9±0.42
CD44	97.3±0.81	97.3±1.10	97.8±0.79	97.3±1.32	97.4±1.19	97.1±0.71	97.4±1.44	97.2±1.25
CD45	98.8±0.74	98.0±1.95	98.2±0.10	98.1±0.43	98.3±0.47	98.2±0.36	98.4±0.24	98.0±1.53

**Tab. XXVI** : risultati della caratterizzazione immunocitometrica condotta sulla linea KASUMI-1: controllo (C), controllo con DMSO (C1) e i due dosaggi maggiori di Gefitinib (D4 e D5). Analisi effettuata dopo 72 ore di incubazione in terreno liquido (72 ORE) e dopo 14 giorni di coltura in terreno semisolido (TEST DI RECUPERO). I risultati sono espressi come percentuale di espressione dell'anticorpo ± deviazione standard.

### §3.5.5 AMPLIFICAZIONE DEL GENE C/EBP

L'espressione quantitativa del gene C/EBPA, determinata con metodica Real Time PCR, è stata valutata sulle cellule ottenute dopo incubazione con Gefitinib alla massima concentrazione in grado di dare effetto citostatico senza citotossicità (dose D4 pari a 2.5  $\mu$ M) e alla quale Stegmaier et al. (2005) hanno osservato differenziazione. Tale espressione è stata confrontata con quella rilevata nel campione basale e nei due controlli (Contr e Contr1) per la linea HL-60 ceppo TV.



**Fig. 55:** quantità relativa (Relative Quantity: RQ) del gene target C/EBPA per campione: controllo (*contr*), controllo con DMSO (*contr1*) e dosaggio D4 di Gefitinib (D4).

In Figura 55 i risultati vengono espressi come quantità relativa di gene target per campione ricavata secondo il metodo standard di  $\Delta\Delta C^t$ .

Nelle cellule incubate in coltura con Gefitinib non si osserva variazione di espressione del gene C/EBPA rispetto a quella rilevata nel campione basale e nei due controlli.



## DISCUSSIONE

Il risultato più significativo che emerge da queste sperimentazioni è rappresentato dalla dimostrazione che ADM induce l'espansione *in vitro* di tutti i ceppi HL-60 (HL-60 TV, HL-60 CRO e HL-60 BANCA) e della linea stabilizzata KASUMI-1 con modalità dose e tempo dipendenti.

La presenza di mRNA proADM nei ceppi HL-60 TV e HL-60 CRO, documentata mediante indagini di biologia molecolare (RT-PCR), trova conferma nell'elevata immunoreattività di tali cellule nei confronti di anticorpi anti-ADM.

Inoltre, la sperimentazione condotta con ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor consente di ipotizzare che Adrenomedullina eserciti i suoi effetti sulle HL-60 TV e CRO attraverso un recettore capace di riconoscere la sequenza aminoacidica 22-52 e ciò sembra essere confermato dalle colorazioni immunocitochimiche che evidenziano la marcata positività, anche se eterogenea, di tali cellule per il recettore RAMP2.

Questi dati, se considerati nel loro insieme, suggeriscono come ADM agisca nei ceppi HL-60 TV e CRO mediante un *loop* autocrino, similmente a quanto avviene in numerosi altri tipi cellulari normali e neoplastici, dove promuove la proliferazione e la neoangiogenesi e decrementa l'apoptosi (Hay and Smith, 2001; Hinson et al., 2000; Kato et al., 1997; Sata et al., 2000; Withers et al., 1996). Comunque, queste sono le prime evidenze di un coinvolgimento di ADM nella crescita dei blasti leucemici, poiché le segnalazioni fino ad oggi riportate in Letteratura riguardano esclusivamente il suo ruolo pro-oncogenico nei tumori solidi (Zudaire et al., 2003; Oehler et al., 2001; Ehlenz et al., 1997; Murakami et al., 1998).

Sfortunatamente le modalità con cui si realizza la regolazione autocrina nelle cellule leucemiche HL-60 TV e CRO rimangono oscure poiché ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor, sebbene sopprima la crescita indotta da ADM esogena, sembra incapace di inibire la crescita basale. Pertanto tali osservazioni pongono le basi per un futuro approfondimento riguardo la produzione di ADM da parte di questi ceppi. In particolare sarà di grande interesse la determinazione del suo *rate* di secrezione nel mezzo di coltura, lo studio delle cinetica di reazione tra ADM, ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor e RAMP2, la verifica del coinvolgimento di altri recettori per ADM ed eventuali meccanismi alternativi di regolazione della produzione, quali l'intracrinia o la transattivazione di vie metaboliche non RAMP2 dipendenti, che svincolerebbero la crescita cellulare dal legame di ADM al proprio recettore.

L'intracrinia è un fenomeno ancora poco noto, ma, presumibilmente, diffuso dal momento che alcuni fattori di crescita (aFGF, bFGF, CNTF, PD-ECGF) presentano isoforme con o senza segnale per la loro secrezione (Jouanneau et al., 1991; Baldin

et al., 1990; Imamura et al., 1990; Logan, 1990; Mignatti et Rifkin, 1991; Imamura et al., 1992; Yan et al., 1993; Davis et al., 1997; Stachowiak et al., 1997). Tali *growth factors* agirebbero anche attraverso un meccanismo basato sulla presenza di recettori intracellulari e di sequenze segnale che consentirebbero loro di entrare nel nucleo cellulare ed agire modulando i processi di replicazione e trascrizione del DNA. Inoltre, gli studi Wiley et al. (1998) suggeriscono la coesistenza nelle cellule di *loop* autocrini ed intracrini per lo stesso fattore di crescita. Questi Autori, infatti, per indagare i meccanismi di azione autocrini di EGF, hanno utilizzato cellule epiteliali mammarie umane che esprimevano EGF mutato, privo del dominio di legame al proprio recettore. L'esposizione di tali cellule ad anticorpi anti-EGF non induceva alcun effetto, suggerendo l'esistenza di una via di segnalazione intracrina alternativa.

Allo stato attuale della sperimentazione, l'esistenza di un *loop* autocrino per ADM nel ceppo HL-60 BANCA e nella linea stabilizzata KASUMI-1 è ancora controversa. Se da un lato è stato dimostrato come la somministrazione di ADM esogena induca la loro espansione e che questa è inibita da ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor, con le stesse modalità evidenziate per i ceppi HL-60 TV e CRO, dall'altro la ricerca di mRNA proADM è risultata negativa. Tale dato è rimarcato dalla bassa positività immunocitochimica per ADM che le cellule HL-60 BANCA e KASUMI-1 presentano. Inoltre, il recettore RAMP2 è espresso omogeneamente nelle KASUMI-1, mentre solo un ristretto subset di HL-60 BANCA risulta positivo a tale marcatore. Per questo sono attualmente in corso ulteriori sperimentazioni di conferma.

Analogamente a quanto descritto per ADM, anche la sperimentazione fino ad oggi condotta per ET-1 sembra indicare la presenza di un *loop* autocrino nelle cellule HL-60 TV e HL-60 CRO e di una produzione paracrina nel ceppo HL-60 BANCA e nella linea KASUMI-1.

La revisione della Letteratura evidenzia che al pari di ADM anche il ruolo di ET-1 nella progressione e nell'invasività nei tumori solidi è stato ampiamente indagato (Bagnato et al., 2005; Donniger et al., 2004; Jazaeri et al., 2005; Rosanò et al., 2003 e 2007; Kopetz et al., 2002; Carducci and Jimeno, 2006; James et al., 2006; Venuti et al., 2000; Smollich et al., 2007; Smollich and Wulfing, 2007; Hagemann et al., 2005; Mai et al., 2006; Bittner et al., 2000; Demunter et al., 2001; Carpagnano et al., 2004; Titus et al., 2005; Fisk et al., 2006; Arun et al., 2001; Hoosein et al., 2007), mentre risulta completamente inesplorato nei patologie oncoematologiche.

I saggi di crescita a medio termine in terreno semisolido rivelano la presenza nel *bulk* cellulare di tutti i tre ceppi HL-60 testati e della linea KASUMI-1 di un *subset* dotato di attiva crescita clonale basale ADM ed ET-1 indipendente e di *subset*



quiescenti la cui clonogenicità è strettamente dipendente dalla presenza di ADM o ET-1. Inoltre l'ampiezza di tali *subset* è correlata al tipo cellulare da noi utilizzato nelle diverse prove.

Tali evidenze consentono, pertanto, di ipotizzare che i *bulk* cellulari HL-60 e KASUMI-1 siano caratterizzati da una intrinseca eterogeneità maturativa e da un variabile potenziale differenziativo, ipotesi confermata, almeno per le HL-60, dai dati riportati in Letteratura. Collins (1987), infatti, riferisce che oltre al sessantesimo passaggio seriale, circa il 5% delle cellule mostra una spontanea differenziazione verso cellule morfologicamente più mature comprendenti mielociti, metamielociti e neutrofili banded e segmentati. L'esposizione di tali cellule a specifici agenti induttivi quali il DMSO, l'acido retinoico, la Vitamina D<sub>3</sub>, gli esteri del forbolo e il GM-CSF incrementa marcatamente la loro spontanea tendenza a maturare, inducendo le HL-60 a differenziarsi lungo quattro diverse filiere differenziative (granulocitaria, monocitaria, macrofagica ed eosinofila) in relazione alle proprietà chimico-fisiche del fattore induttivo stesso. Bipontezialità differenziativa di una larga porzione del *bulk* cellulare nelle HL-60 (almeno l'80% delle cellule in coltura) è stata evidenziata da Fontana et al. (1981) e da Fibach et al. (1982). L'eterogeneità funzionale delle HL-60 è stata successivamente ribadita da Brackman et al. (1995) che hanno comparato la maturazione di tali cellule, indotta da Vitamina D<sub>3</sub>, alla differenziazione dei progenitori ematopoietici normali del midollo osseo in granulociti e in monociti. Comunque, queste ricerche hanno evidenziato che la Vitamina D<sub>3</sub> induce le HL-60 ad acquisire un fenotipo strettamente correlato a quello dei monociti maturi, mentre acido retinoico e DMSO inducono l'espressione di *marker* di superficie simili ai *pattern* della normale granulopoiesi.

Al contrario, ADM ed ET-1 sembrerebbero esercitare un effetto de-differenziativo sia nei ceppi HL-60 che nella linea KASUMI-1. Infatti, l'analisi immunocitometrica condotta utilizzando un pannello anticorpale comprendente specificità antigeniche sia della filiera granulocitaria che monocitaria, ha rivelato il decremento, inversamente proporzionale alla dose, dell'espressione dell'antigene CD11b e CD33 a seguito dell'esposizione delle cellule ai due peptidi. Inoltre, gli antigeni che nella caratterizzazione basale, in accordo con le linee guida della General Haematology Task Force of the BCSH (2002), erano stati considerati negativi, si sono mantenuti tali, mentre l'espressione degli altri antigeni indagati non ha subito variazioni di rilievo.

Le attuali conoscenze sull'espressione di CD11b e CD33 sembrano confermare l'ipotesi del de-differenziamento. Il CD11b è una glicoproteina di 170kD che costituisce la catena alfa dell'eterodimero Mac1. Il dimero CD11b/CD18 è noto

anche come integrina  $\alpha\text{M}\beta 2$ . È assente sui precursori mieloidi più immaturi e durante la loro maturazione compare dopo lo stadio di promielocita e prima dell'espressione del CD16 (Fujimoto et al., 2000). Risulta particolarmente espresso nei granulociti banded e nei neutrofilii segmentati. Nella filiera monocitica compare non prima dello stadio di monoblasto (Arnaout, 1990). Secondo Brackman et al. (1995), la comparsa di tale antigene nelle cellule HL-60 trattate con Vitamina D<sub>3</sub>, DMSO e acido retinoico coincide con il blocco della proliferazione. Il CD33 è un polipeptide di 67 kD che caratterizza i precursori della filiera mieloide compresi tra le CFU-GM, dove compare per la prima volta ed i metamielociti, ma non è presente sui progenitori *committed* più immaturi e nei granulociti banded e segmentati. È espresso lungo tutta la filiera monocitaria.

Pertanto il contestuale decremento di entrambi gli antigeni associato all'elevato *rate* proliferativo indotto da ADM ed ET-1 esclude che tali peptidi reindirizzino la differenziazione dei ceppi HL-60 e della linea KASUMI-1 da una filiera differenziativa all'altra. Se il decremento del CD33 fosse indice di una differenziazione in elementi banded o segmentati dovrebbe essere accompagnato da un incremento di CD11b che è altamente espresso in questi elementi terminali della filiera mieloide. Analogamente, se ADM ed ET-1 inducessero la trans-differenziazione delle cellule HL-60 e KASUMI-1 dalla filiera monocitaria verso i primi precursori della filiera mieloide, al decremento del CD11b dovrebbe essere associato un incremento del CD33. La trans differenziazione di *subset* dalla filiera mieloide alla filiera monocitaria comporterebbe invece un aumento di entrambi i marcatori.

Queste considerazioni trovano il supporto delle indagini citologiche che non hanno rivelato, a seguito del trattamento con ADM ed ET-1, alcuna modificazione morfologica nucleare e/o citoplasmatica indicativa di differenziazione in senso mieloide o macrofagico.

La somministrazione di EGF ai ceppi HL-60 e alla linea KASUMI-1 produce ai due dosaggi maggiori un significativo incremento della crescita alle 24 ore di coltura non più rilevabile agli end-point successivi (48 e 72 ore) dove il *rate* proliferativo dei controlli è pari a quello dei trattati e ciò a fronte della negatività immunocitochimica e del Western Blotting per EGF-R. Pertanto, è possibile che, da un lato EGF attivi i blasti leucemici attraverso vie metaboliche EGF-R indipendenti come postulato da Stegmaier (2005), dall'altro che il limitato effetto proliferativo sia riferibile alla ridotta emivita (10 ore) che caratterizza questo *growth-factor*.

Un ulteriore risultato significativo che emerge da questa sperimentazione è la forte azione antiproliferativa del Gefitinib amplificata anche dal suo solvente a fronte di scarsi se non nulli effetti induttivi della differenziazione.

Infatti nei saggi colturali a breve termine, il Gefitinib esercita un'azione antiproliferativa a tutti i dosaggi sui ceppi HL-60 e sulla linea KASUMI-1. Le osservazioni microscopiche confermano tali risultati, ma evidenziano pure che l'attività antiproliferativa di Gefitinib è dose dipendente e si realizza con modalità differenti tra il ceppo HL-60 TV e la linea KASUMI-1 e le altre cellule (HL-60 CRO e HL-60 BANCA). Nelle HL-60 ceppo TV e nella KASUMI-1, il farmaco esercita un'azione citotossica diretta associata a citolisi cellulare ai dosaggi più elevati ( $D_1$ ,  $D_2$  e  $D_3$ ). Sembra, invece, esercitare citostasi ai dosaggi  $D_4$  e  $D_5$ , poiché le cellule al termine dell'esposizione appaiono morfologicamente integre e solo con lievi modificazioni cellulari. Negli altri due ceppi HL-60, la citolisi si evidenzia solo con il dosaggio  $D_1$ . Alle altre concentrazioni di farmaco, le cellule sono morfologicamente integre e le alterazioni citologiche si riducono passando da  $D_2$  a  $D_5$ .

Nei saggi colturali a breve termine, l'analisi statistica ha rivelato che pure il DMSO, utilizzato come solvente del farmaco, esercita una azione antiproliferativa. In questo caso le osservazioni microscopiche mettono in evidenza la differente sensibilità tra i diversi tipi di cellule mostrando come il DMSO nei ceppi CRO e KASUMI-1 abbia effetti citolitici anche se modesti, mentre sul ceppo TV e sulla linea BANCA eserciti solo attività citostatica.

In linea teorica, i test di recupero consentono la valutazione a distanza dei farmaci, una volta cessata l'esposizione agli stessi e la verifica delle capacità di recupero delle cellule. In questi test, gli effetti a lungo termine del Gefitinib sono stati testati come numero medio di CFU sviluppatesi post-esposizione in un terreno semisolido uguale per tutti i dosaggi. Con tale approccio sperimentale, i dati da noi ottenuti con i ceppi HL-60 CRO e BANCA e con la KASUMI-1 sembrano confermare i risultati dei test colturali a breve termine, mentre evidenziano la capacità del DMSO di indurre crescita clonogenica nelle colture Controllo1 del ceppo HL-60 TV. Tale evidenza è in accordo con uno studio condotto da altri ricercatori presso la Banca delle Cellule Staminali Ematopoietiche di Treviso (*unpublished data*) circa le capacità induttive di questa sostanza. In base a tali studi anche la crescita clonogenica rilevata per i dosaggi  $D_3$ ;  $D_4$  e  $D_5$  è probabilmente imputabile agli effetti del DMSO.

A differenza di Stegmaier, nella nostra sperimentazione gli effetti antiproliferativi di Gefitinib su tutti i tipi cellulari non sono riconducibili a fenomeni differenziativi indotti dal farmaco. Infatti, le osservazioni morfologiche condotte su preparati allestiti al termine dei saggi colturali a breve termine non evidenziano, ai dosaggi più bassi, alcun fenomeno di segmentazione e/o banded a carico dei nuclei, tipico della differenziazione del promielocita in mielocita, metamielocita e granulocita maturo che caratterizza il processo di maturazione di questa filiera ematopoietica.

Anche le indagini citofluorimetriche, concordando con quanto precedentemente descritto per ADM ed ET-1, mostrando che le variazioni post-esposizione del fenotipo di tali cellule, riferibili agli antigeni CD11b e CD33, sono congruenti con le osservazioni microscopiche circa il mancato effetto differenziativo del farmaco.

Nell'ipotesi che alle 72 ore, tempo massimo di incubazione delle cellule con Gefitinib, l'attivazione del programma maturativo in senso granulocitario non abbia ancora raggiunto l'espressione fenotipica, nel ceppo HL-60 TV è stata eseguita la determinazione quantitativa del trascritto di C/EBPA, considerato il *triggering* della cascata di segnali che portano i progenitori *committed* CFU-GM a differenziarsi in granulociti. Queste indagini in accordo con le osservazioni morfologiche e immunocitometriche hanno evidenziato che Gefitinib non induce alcuna up-regolazione di C/EBPA.

## CONCLUSIONI

In base ai risultati sopra descritti è possibile concludere che:

1. ADM ed ET-1 inducono l'espansione *in vitro* di tutti i ceppi HL-60 (HL-60 TV, HL-60 CRO e HL-60 BANCA) e della linea stabilizzata KASUMI-1, in relazione alla dose e al tempo di somministrazione. In particolare, agiscono nei ceppi HL-60 TV e CRO mediante un *loop* autocrino.
2. ADM-fragment<sub>22-52</sub> inhibitor, BQ123 inhibitor e BQ788 inhibitor in presenza di ADM ed ET-1 esogeni ne riducono fortemente l'effetto induttivo, mentre se somministrati da soli non esercitano alcun effetto sia sui ceppi HL-60 che sulla linea KASUMI-1. Questo comportamento è un'ulteriore dimostrazione della presenza del *loop* autocrino nelle HL-60 TV e CRO ed è un indizio per presupporre la presenza di un analogo *loop* anche per HL-60 CRO e BANCA che dovrà essere dimostrato con ulteriori studi di biologia molecolare e di proteomica.
3. La capacità di ADM ed ET-1 di indurre crescita a medio termine in terreno semisolido ai dosaggi più alti sembra indicare la presenza all'interno dei ceppi HL-60 e della linea KASUMI di *subset* con capacità clonogeniche differenti e attivabili mediante l'apporto di fattori induttivi esogeni. Tale rilievo, avvalorato anche dall'eterogeneità fenotipica basale esistente tra i diversi ceppi HL-60, consente di ipotizzare la presenza all'interno delle linee e dei ceppi leucemici di compartimenti cellulari gerarchizzati e con gradi maturativi diversi.
4. L'incremento proliferativo alle 24 ore di coltura indotto ai dosaggi più elevati di EGF e non più evidenziabile agli altri *end-point*, è probabilmente riferibile alla ridotta emivita di questo fattore di crescita e alla transattivazione della proliferazione cellulare attraverso vie metaboliche EGF-R indipendenti.
5. Il Gefitinib esercita un'azione antiproliferativa in tutte le cellule da noi utilizzate, con effetto citotossico a dosi maggiori e citostatico a dosi minori. Anche la sua azione è di tipo EGF-R indipendente.

Pertanto, queste prime segnalazioni a livello oncoematologico del possibile ruolo promotore di ADM, ET-1 ed EGF nella crescita e nella progressione delle LMA offrono lo spunto per ulteriori studi al fine di valutare la possibile applicazione clinica di tali peptidi e dei rispettivi inibitori nel trattamento della leucemie mieloidi acute.

## BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. (2009). Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. *Blood*. 114:144-147.
- Adams GB, Scadden DT (2006). The hematopoietic stem cell in its place. *Nature Immunol.*7:333-337.
- Adams GB, Martin RP, Alley IR, et al. (2007). Therapeutic targeting of a stem cell niche. *Nat Biotechnol.* 25:238-243.
- Advani AS (2005). FLT3 and acute myelogenous leukemia: biology, clinical significance and therapeutic applications. *Curr Pharm Des.*;11(26):3449-57. Review.
- Aglietta M, De Vincentiis A, Lanata L, Lanza F, Lemoli RM, Menichella G, Tafuri A, Zanon P, Tura S (1996). Peripheral blood stem cells in acute myeloid leukemia: biology and clinical application. *Haematologica*, 81:77-92.
- Ahmed S.I., Thompson J., Coulson J.M., and Wall P.J. (2000). Studies on the expression of endothelin, its receptor subtypes, and converting enzymes in lung cancer and in human bronchial epithelium. *Am. J. Respir. Cell Mol.* 22:422-431.
- Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T (2003). Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity*. 2003;19:257-267.
- Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S (1990). Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*, 348(6303):730-732.
- Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. ;118:149-161.
- Arnaout M (1990). Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*,75(5): p. 1037-1050.
- Arteaga CL (2003). ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res.* Mar 10;284(1):122-30. Review.

- Arun B., Kilic G., Ashfaq R., Saboorian H.M. and Gokaslan T. (2001). Endothelin converting enzyme-1 expression in endometrial adenocarcinomas. *Cancer Invest.* 19: 779-782.
- Arun C., De Catris M., Hemingway D.M., London N.J. and O'Byrne K.J. (2004). Endothelin-1 is a novel prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Int. J. Biol. Markers.* 19: 262-267.
- Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, et al. (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med.*;10:64-71.
- Baganto A., Rosanò L., Di Castro V., Albini A., Salani D., Varmi M. et al., (2001). Endothelin receptor blockade inhibits proliferation of Kaposi's sarcoma cells. *Am. J. Pathol.* 158:841-847.
- Bagnato A., Birilli A., Salani D., Simeone P., Muller a., nicotra M.R. et al. (2002). Growth inhibition of cervix carcinoma cells in vivo by endothelin A receptor blockade. *Cancer Res.* 62: 6381-6384.
- Bagnato A., Spinella F. and Rosanò L. (2005). Emergin role of the endothelin axis in ovarian tumor progression. *Endocr. Relat. Cancer.* 12:761-772.
- Bagnato A, Spinella F, Rosanò L (2008). The endothelin axis ibn cancer: the promise and the challenges of molecularly targeted therapy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 86:473-484.
- Bailey R, Kris M, Wolf M, et al. (2003) Tumor EGFR membrane staining is not clinically relevant for predicting response in patient receiving gefitinib ('IRESSA', ZD1839) monotherapy for pretreatmentadvanced non-small-sell lung cancer: IDEAL 1 and 2. *Proc Am Assos Cancer Res*; 44 (2<sup>nd</sup> ed):1362.
- Bain BJ, Barnett D, Linch D, Matutes E, Reilly JT; General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology (BCSH), British Society of Haematology (2002). Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clin Lab Haematol.*; 25(1):67.
- Baldin V, Roman AM, Bosc-Bierne I, Amalric F, Bouche G (1990). Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells. *EMBO Journal*, 9: 1511-1517.
- Ball ED, Wilson J, Phelps V, Neudorf S (2000). Autologous bone marrow transplantation for acute myeloid leukaemia in remission or first relapse using monoclonal antibody-purged marrow: results of phase II studies with long-term follow-up. *Bone Marrow Transplantatio*, 25:823-29.

- Barker AJ, Gibson KH, Grundy W, Godfrey AA, Barlow JJ, Healy MP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Scarlett L, Henthorn L, Richards L. (2001), et al. Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem Lett.*;11:1911-1914.
- Baselga J (2000). New technologies in epidermal growth factor receptor-targeted cancer therapy. *Signal* 1:12-21.
- Battistini B, Chailier P, D'Orleans-Juste P, Briere N, Sirois P (1993). Growth regulatory properties of endothelins. *Peptides*, 14(2):385-399.
- Belloni AS, Andreis PG, Rossi GP, Mingrino A, Champion HC, Kadowitz PJ, Murphy WA, Coy DH, Nussdorfer GG (1998). Inhibitory effect of adrenomedullin (ADM) on the aldosterone response of human adrenocortical cells to angiotensin-II: role of ADM(22-52)-sensitive receptors. *Life Sci*, 63(26):2313-2321.
- Belloni AS, Albertin G, Forneris ML, Nussdorfer GG (2001). Proadrenomedullin-derived peptides as autocrina-paracrine regulators of cell growth. *Histol Histopathol*, 16(4):1263-1274.
- Benatti L, Bonecchi A, Cozzi L, Sarmientos P (1993). Two preproendothelin 1 mRNAs transcribed by alternative promoters. *J Clin Invest*, 91(3):1149-1156.
- Bene M. et al. (1995). Proposal for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the immunological characterization of leukemias (EGIL). *Leukemia* 9(10): p. 1783-1786.
- Bernasconi C (2010). Cellule staminali tumorali: il vero bersaglio nella cura dei tumori. Corso di formazione avanzata "Progressi in medicina e Biologia".
- Berry P. and Burchill S. (2002). Endothelins may modulate invasion and proliferation of Ewing's sarcoma and neuroblastoma. *Clin. Sci. (Lond.)* 103:322S-326S.
- Betz BL, Hess JL (2010). Acute myeloid leukemia diagnosis in the 21st century. *Arch Pathol Lab Med.* 134:1427:1432.
- Bhatia M (2001). AC133 expression in human stem cells. *Leukemia*, 15(11):1685-1688.
- Bittner M., Meltzer P., Chen Y., Jiang Y., Seftor E., Hendreix M. et al. (2000). Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression



- profiling. *Nature*, 406: 536-541.
- Bjerregaard MD, Jurlander J et al. (2003). The in vivo profile of transcription factors during neutrophil differentiation in human bone marrow. *Blood*; 101:4322-4332
  - *Boehrer S, Adès L, Fabre C, Fenaux P, Kroemer G (Villejuif, Bobigny, F) (2006). The EGFR-inhibitors erlotinib and gefitinib induce apoptosis in neoplastic cells of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia. Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie Leipzig, Postersession: Akute Leukämien.*
  - Boehrer S, Ades L et al. (2007). The EGFR-inhibitor erlotinib induces differentiation, cell cycle arrest and apoptosis in EGFR-negative cells of MDS and AML. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*; 110: Abstract 399.
  - Boehrer S, Ades L et al. (2008). Erlotinib and gefitinib for the treatment of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia: a preclinical comparison. *Biochemical Pharmacology*; 76: 1417-1425 b.
  - Boehrer S, Ades L et al. (2008). Erlotinib exhibits antineoplastic off-target effects in AML and MDS: a preclinical study. *Blood*; 111: 2170-2180 a.
  - Boldrini L., Gisfredi S., Ursino S., Faviana P., Lucchi M., Melfi F. et al., (2005). Expression of endothelin-1 is related to poor prognosis in non-small cell lung carcinoma. *Eur. J. Cancer*, 41: 2828-2835.
  - Bonnet D, Dick JE (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Med*, 3: 730–737.
  - Brackman D, Lund-Johansen F, Aarskog D. (1995). Expression of leukocyte differentiation antigens during the differentiation of HL-60 cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D3: comparison with the maturation of normal monocytic and granulocytic bone marrow cells. *J Leukoc Biol*. 58(5):547-55.
  - Breems DA e Lowenberg B (2005). Autologous stem cell transplantation in the treatment of adults with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 130(6):825-33.
  - Brehmer D, Greff Z et al. (2005). Cellular targets of gefitinib. *Cancer Research*; 65(2): 379-382.
  - Brenner MK, Rill DR, Moen RC (1993). Gene-marking to trace origin of relapse after autologous bone marrow transplantation. *Lancet*,

341(8837):85-6.

- Bruserud O, Tjonnfjord G, Gjertsen BT, Foss B, Ernst P (2000). New strategies in the treatment of acute myelogenous leukemia: mobilization and transplantation of autologous peripheral blood stem cells in adult patients. *Stem Cells*, 18(5):343-51.
- Buchanan FG, Gorden DL, Matta P, Shi Q, Matrisian LM and Dubois RN (2006). Role of b-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:149-151.
- Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*; 425:841-846.
- Cammenga J, Mulloy JC et al. (2003). Induction of C/EBP $\alpha$  activity alters gene expression and differentiation of human CD34+ cells. *Blood*, 101: 2206-2214.
- Carducci M.A. and Jimeno A. (2006). Targeting bone metastasis in prostate cancer with endothelin receptor antagonist. *Clin. Cancer Res.* 12:n 6296s-6300s.
- Carlo-Stella C, Rizzoli V (1995). Stem cells and stem factor. *Hematologica*, 80: 1-4.
- Carpagnano G.E., Foschino-Barbaro M.P., Resta O., Gramiccioni E. and Carpagnano F. (2004). Endothelin-1 is increase in the breath condensate of patients with non-small-cell lung cancer. *Oncology*, 66: 180-184.
- Catovsky D. and M.E. (1992). The classification of acute leukaemia. *Leukemia*, 1992.6 (suppl 2): p. 1-6
- Chakravarty P, Suthar TP, Coppock HA, Nicholl CG, Bloom SR, Legon S, Smith DM (2000). CGRP and adrenomedullin binding correlates with transcript levels for calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity modifying proteins (RAMPs) in rat tissues. *Br J Pharmacol*, 130(1):189-195.
- Champion HC, Nussdorfer GG, Kadowitz PJ (1999). Structure-activity relationships of adrenomedullin in the circulation and adrenal gland. *Regul Pept*, 85:1-8.
- Cheson BD (2004). Overview of the revised response criteria for acute myelogenous leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2(5):277-9
- Chini EN, Choi E, Grande JP, Burnett JC, Dousa TP (1995). Adrenomedullin suppresses mitogenesis in rat mesangial cells via cAMP pathway. *Biochem*

Biophys Res Commun, 215(3):868-873.

- Chun TH, Itoh H, Saito T, Yamahara K, Doi K, Mori Y, Ogawa Y et al. (2000). Oxidative stress augments secretion of endothelium-derived relaxing peptides, C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. *J Hypertens*, 18, 575–580.
- Clift RA, Buckner CD, Appelbaum FR, Bearman SI, Petersen FB, Fisher LD, Anasetti C, Beatty P, Bensinger WI, Doney K, et al. (1990) Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens. *Blood.*, 76(9):1867-71.
- Cohen, S. (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the newborn animal. *J. Biol. Chem.* 237, 1555–15629.
- Cohen, S., and Elliott, G. A. (1963) The stimulation of epidermal keratinisation by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse. *J. Invest. Dermatol.*40, 1–5
- Cohen, S. (1965) The stimulation of epidermal proliferation by a specific protein (EGF). *Dev. Biol.* 12, 384–407
- Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, McGuinn WD Jr, Morse D, Abraham S, Rahman A, Liang C, Lostritto R, Baird A, Pazdur R (2004). United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *J Clin Oncol*, 10(4):1212-8.
- Collins S J, Ruscetti F W, Gallagher R E, Gallo (1978) R C: Terminal differentiation of human promyelocytic leukaemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, May; 75(5):2458-2462
- Collins SJ. (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. *Blood.* 70(5):1233-44
- Colmone A, Amorim M, Pontier AL, Wang S, Jablonski E, Sipkins DA. (2008). Leukemic cells create bone marrow niches that disrupt the behavior of normal hematopoietic progenitor cells. *Science.* 2008;322:1861-1865.
- Consolini R, Legitimo A, Calleri A (2001). La cellula staminale ematopoietica: biologia e applicazioni cliniche. *Pathologica*, 93:2-14.
- Crans HN and Sakamoto KM (2001). Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. *Leukemia* 2001;15: 313-331.

- Cuneo A. Morfologia e fisiopatologia del sangue e degli organi ematopoietici. In: Malattie del sangue e degli organi ematopoietici. Castaldi G e Liso V (2004) 4° ediz. McGraw-Hill.
- Dalerba P. and Clarke M.F. (2007). Cancer stem cell and tumor metastasis: first step into uncharted territory. *Stem cell*, 1,3: 241-242.
- David Grimwade and Robert K. Hills (2009). Independent prognostic factors for AML outcome. *Hematology* 2009.
- Davis MG , Zhou M, Ali S, Coffin JD, Doetschman T, Dorn GW (1997). Intracrine and autocrine effects of basic fibroblast growth factor in vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 29: 1061-1072.
- De Angeli S, Del Pup L, Febas E, Conconi MT, Tommasini M, Di Liddo R, Albertin G, Parnigotto PP, Nussdorfer GG (2004). Adrenomedullin and endothelin-1 stimulate in vitro expansion of cord blood hematopoietic stem cells. *Int J Mol Med*, 14(6): 1083-1086.
- De Lima M, Strom SS, Keating M, Kantarjian H, Pierce S, O'Brien S, Freireich E, Estey E (1997). Implications of potential cure in acute myelogenous leukemia: development of subsequent cancer and return to work. *Blood.*, 90(12):4719-24
- Del Pup L, Belloni AS, Carraro G, De Angeli S, Parnigotto PP, Nussdorfer GG (2003). Adrenomedullin is expressed in cord blood hematopoietic cells and stimulates their clonal growth. *Int J Mol Med*, 11(2): 157-160.
- Demunter A., De Wolf-Peeters C., Degreef H., Stas M. and van den Oord J.J. (2001). Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch.* 438: 485-491.
- Denny WA, Rewcastle GW, Bridges AJ, Fry DW, Kraker AJ (1996). Structure-activity relationships for 4-anilinoquinazolines as potent inhibitors at the ATP binding site of the epidermal growth factor receptor in vitro. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* May;23(5):424-7.
- Derksen PW, Tjin E, Meijer HP, et al. (2004). Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:6122-6127.
- Dick JE (1996): Normal and leukemic human stem cell assayed in SCID mice. *Semin Immunol*, 8(4):197-206
- Donninger H., Bonome T., Radonovich M., Pise-Masison C.A., Brady J., Shih

- J.H. et al. (2004). Whole genome expression profiling of advance stage papillary serous ovarian cancer reveals activated pathways. *Oncogene* 23: 8065-8077.
- Economos K., Mac Donald P.C. and Dasey M.L. (1992). Endothelin-1 gene expression and biosynthesis in human endometrial HEC-1A cancer cells. *Cancer Res.* 52: 554-557.
  - Egidy G., Juillerat-jeannin J.F., Korth P., Bosma F.T. and Pinet F. (2000). Modulation of human colon tumor-stromal interactions by the endothelin system. *Am. J. Pathol.* 157: 1863-1874.
  - Ehlenz K., Koch B., Preuss P., Simon B., Koop I., Lang R.E. (1997). High levels of circulating adrenomedullin in severe illness: correlation with C-reactive protein and evidence against the adrenal medulla as site of origin. *Exp Clin Endocrinol Diabets* 105: 156-162.
  - Ehrenreich H, Anderson RW, Fox CH, Rieckmann P, Hoffman GS, Travis WD, Coligan JE et al. (1990). Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med*, 172, 1741-1748.
  - Emori T, Hirata Y, Ohta K, Shichiri M, Marumo F (1989). Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 160(1):93-100.
  - Estey EH (2001). Therapeutic options for acute myelogenous leukemia. *Cancer*, 1;92(5):1059-73.
  - Fauser AA, Messner HA (1979). Identification of megakaryocytes, macrophages and eosinophilis in colonies of human bone marrow containing neutrophilic granulocytes and erythroblasts. *Blood*, 53(5):1023-1027.
  - Felx M., Guyot M.C., Isler M., Turcotte R.E., Doyon J., Khatib A.M. et al. (2006). Endothelin-1 (ET-1) promotes MMP-2 and MMP-9 induction involving the transcription factor NF- $\kappa$ B in human osteosarcoma. *Clin. Sci. (Lond.)*, 100: 645-654.
  - Fernandez S, Knopf MA, McGillis JP (2000). Calcitonin-gene related peptide (CGRP) inhibits interleukin-7-induced pre-B cell colony formation. *J Leukoc Biol*, 67(5):669-676.
  - Fibach E, Peled T, Rachmilewitz EA. (1982). Self-renewal and commitment to differentiation of human leukemic promyelocytic cells (HL-60). *J Cell Physiol*;113(1):152-8.

- Filippatos GS, Gangopadhyay N, Lalude O, Parameswaran N, Said SI, Spielman W, Uhal BD (2001). Regulation of apoptosis by vasoactive peptides. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* ;281(4):L749-61.
- Fisk L., Nalivaeva N.N. and Turner A.J. (2006). Regulation of endothelin-converting enzyme-1 expression in human neuro-blastoma cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 231: 1048-1053.
- Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, et al. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell.*;2:274-283.
- Fleming HE, Janzen V, Lo Celso C, et al. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell.* ;2:274-283
- Fontana J.A., Colbert D.A., Deisseroth A.B. (1981). Identification of a population of bipotent stem cells in the HL-60 human promyelocytic leukemia cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78,3863.
- Foord SM, Marshall FH (1999). RAMPs: accessory proteins for seven transmembrane domain receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 20(5):184-187.
- Freireich EJ, Gehan EA, Sulmand D, Boggs DR, Frei E (1961). The effect of chemotherapy on acute leukemia in the human. *J Chronic Dis*, 14:593-608
- Frohling S, Schlenk RF et al. (2004). CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *Journal of Clinical Oncology*; 22: 624-633.
- Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL (2005). Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*,10;23(26):6285-95.
- Fujimoto H et al. (2000). Flow cytometric method for enumeration and classification of reactive immature granulocyte populations. *Cytometry*, 42(6): p. 371-378.
- Fukuda Y, Hirata Y, Yoshimi H, Kojima T, Kobayashi Y, Yanagisawa M, Masaki T (1988). Endothelin is a potent secretagogue for atrial natriuretic peptide in cultured rat atrial myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 155(1):167-172.
- Fukuoka M, Yano S, Giaccone G, Tamura T, Nakagawa K, Douillard JY, Nishiwaki Y, Vansteenkiste J, Kudoh S, Rischin D, Eek R, Horai T, Noda K,

- Takata I, Smit E, Averbuch S, Macleod A, Feyereislova A, Dong RP, Baselga J (2003). Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J Clin Oncol*. Jun 15;21(12):2237-46. Epub 2003 May 14.
- Gallagher R, Collins S, Tujillo J, McCredie K, Aheran M, Tsai S, Metzgar R, Aulakh G, Ting R, Ruscetti F, Gallo R (1979): Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukaemia. *Blood*, 54(3):713-33
  - Ghio R (1989). Le tecniche di coltura in vitro dei progenitori ematopoietici umani. Da Sitia R Ed: *Colture Cellulari*. Scuola Superiore di Oncologia e Scienze Biomediche, Santa Margherita Ligure.
  - Giaccone G, Herbst RS, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Miller V, Natale RB, Schiller JH, Von Pawel J, Pluzanska A, Gatzemeier U, Grous J, Ochs JS, Averbuch SD, Wolf MK, Rennie P, Fandi A, Johnson DH (2004). Gefitinib in combination with gemcitabine and cisplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 1. *J Clin Oncol*. Mar 1;22(5):777-84.
  - Giaid A, Gibson SJ, Ibrahim BN, Legon S, Bloom SR, Yanagisawa M, Masaki T et al. (1989): Endothelin 1, an endothelium-derived peptide, is expressed in neurons of the human spinal cord and dorsal root ganglia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86, 7634-7638.
  - Giaid A, Polak JM, Gaitonde V, Hamid QA, Moscoso G, Legon S, Uwanogho D, Roncalli M, Shinmi O, Sawamura T, Kimura S, Yanagisawa M, Masaki T, Springall DR (1991). Distribution of endothelin-like immunoreactivity and mRNA in the developing and adult human lung. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 4(1):50-58.
  - Gillespie MN, Owasoyo JO, McMurtry IF, O'Brien RF (1986). Sustained coronary vasoconstriction provoked by a peptidergic substance released from endothelial cells in culture. *J Pharmacol Exp Ther*, 236(2):339-343
  - Glassberg MK, Ergul A, Wanner A, Puett D (1994). Endothelin-1 promotes mitogenesis in airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10(3):316-321.
  - Glowinska B, Urban A, Hryniewicz j, Peczynska B, Florysand M, Al-Hwisch (2004). Endothelin-1 plasma concentration in children and adolescent with atherogenic risk factors. *Kardiol Pol* 61: 329-338
  - Gothot A, van der Loo JC, Clapp DW, Srour EF. (1998). Cell cycle-related

changes in repopulating capacity of human mobilized peripheral blood CD34(+) cells in non-obese diabetic/severe combined immune-deficient mice. *Blood*;92:2641-2649.

- Gray A, Dull TJ, Ullrich A. (1983). Nucleotide sequence of epidermal growth factor cDNA predicts a 128,000-molecular weight protein precursor. *Nature*, 303(5919):722-5
- Greaves MF, Brown J, Molgaard HV, Spurr NK, Robertson D, Delia D, Sutherland DR (1992). Molecular features of CD34: a hemopoietic progenitor cell-associated molecule. *Leukemia*, 6 (Suppl 1):31-6.
- Green CL, Koo KK, Hills RK, et al. (2009). Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with AML: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations [abstract]. *Haematologica/Haematology J.*; 94:431.
- Grimwade D.(2007). Impact of cytogenetics on clinical outcome in AML. In: Karp JE, ed. *Acute Myelogenous Leukemia*. Totowa, New Jersey: Humana Press:177-192.
- Gu J, Pinheiro JM, Yu CZ, D'Andrea M, Muralidharan S, Malik A (1991). Detection of endothelin-like immunoreactivity in epithelium and fibroblasts of the human umbilical cord. *Tissue Cell*, 23(4):437-444.
- Guruli G, Pflug BR, Pecher S, Makarenkova V, Shurin MR, Nelson JB (2004). Function and survival of dendritic cells depend on endothelin-1 and endothelin receptor autocrine loops. *Blood*;104(7):2107-15.
- Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, et al. (2009). AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*.; 114:3024-3032.
- Hagemann T., Binder C., Binder L., Pukrop T., Trumper L. and Grimshaw M.J. (2005). Expression of endothelins and their receptors promotes an invasive phenotype of breast tumor cells but is insufficient to induce invasion in benign cells. *DNA Cell Biol.* 24: 766-776.
- Hahn AW, Resink TJ, Scott-Burden T, Powell J, Dohi Y, Buhler FR (1990). Stimulation of endothelin mRNA and secretion in rat vascular smooth muscle cells: a novel autocrine function. *Cell Regul*, 1(9): 649-659.
- Hasemann M, Damgaard I et al. (2008). Mutation of C/EBP $\alpha$  predisposes to the development of myeloid leukemia in a retroviral insertional mutagenesis screen. *Blood*; 111: 4309-4321



- Hay DL, Smith DM (2001). Adrenomedullin receptors: molecular identity and function. *Peptides*, 22: 1753-1763.
- Herbst RS, LoRusso PM, Purdom M, Ward D (2003). Dermatologic side effects associated with gefitinib therapy: clinical experience and management. *Clin Lung Cancer* May;4(6):366-9.
- Herbst RS, Giaccone G, Schiller JH, Natale RB, Miller V, Manegold C, Scagliotti G, Rosell R, Oliff I, Reeves JA, Wolf MK, Krebs AD, Averbuch SD, Ochs JS, Grous J, Fandi A, Johnson DH (2004). Gefitinib in combination with paclitaxel and carboplatin in advanced non-small-cell lung cancer: a phase III trial--INTACT 2. *J Clin Oncol* Mar 1;22(5):785-94.
- Hinson JP, Kapas S, Smith DM (2000). Adrenomedullin, a multifunctional regulatory peptide. *Endocr Rev*, 21: 138-167.
- Ho PA, Alonzo TA et al.(2009). Prevalence and prognostic implications of CEBPA mutations in pediatric acute myeloid leukemia (AML). A report from the Children's Oncology Group. *Blood*; 113: 6558-6566.
- Hojo Y, Ikeda U, Ohya K, Ichida M, Kario K, Takahashi M, Ikeda M, Minota S, Isumi Y, Minamino N, Ishimitsu T, Shimada K (2001). Interaction between monocytes and vascular endothelial cells induces adrenomedullin production. *Atherosclerosis*, 155(2): 381-387.
- Hoosein M.M., Dashwood M.R., Dawas K., Ali H.M., Grant K., Savage F. et al. (2007). Altered endothelin receptor subtypes in colorectal cancer. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 19:775-782.
- Hope KJ, Jin L, Dick JE (2004). Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat. Immunol.*, J ul;5(7):738-43
- Hosokawa K, Arai F, Yoshihara H, et al. (2007). Function of oxidative stress in the regulation of hematopoietic stem cell-niche interaction. *Biochem Biophys Res Commun.* ;363:578-583.
- Imamura T, Engleka K, Zhan X, Tokita Y, Forough R, Roeder D, Jackson A, Maier JA, Hla T, Maciag T (1990). Recovery of mitogenic activity of a growth factor mutant with a nuclear translocation sequence. *Science*, 249: 1567-1570.
- Imamura T, Tokita Y, Mitsui Y (1992). Identification of a heparin-binding growth factor-1 nuclear translocation sequence by deletion mutation analysis. *J Biol Chem*, 267: 5676-5679.

- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T (1989). The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(8): 2863-2867.
- Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T (1988). Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea pig atria. *Am J Physiol*, 255: 970-973 a.
- Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Masaki T (1988). Positive chronotropic effects of endothelin, a novel endothelium-derived Komuro I, Kurihara H, Sugiyama T, Yoshizumi M, Takaku F, Yazaki Y (1988). Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett*, 238(2): 249-252 b.
- Ishikawa F, Yoshida S, Saito Y, et al. (2007). Chemotherapy-resistant human AML stem cells home to and engraft within the bone-marrow endosteal region. *Nat Biotechnol*. 2007;25:1315-1321.
- Ishimitsu T, Kojima M, Kangawa K, Hino J, Matsuoka H, Kitamura K, Eto T, Matsuo H (1994). Genomic structure of human adrenomedullin gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 203: 631-639.
- Isumi Y, Shoji H, Sugo S, Tochimoto T, Yoshioka M, Kangawa K, Matsuo H, Minamino N (1998). Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology*, 139(3): 838-846.
- Iwamoto S, Mihara K, Downing JR, Pui CH, Campana D. (2007). Mesenchymal cells regulate the response of acute lymphoblastic leukemia cells to asparaginase. *J Clin Invest.*; 117:1049-1057.
- James N.D., Borre M., Zonnenberg B., Beuzebec P., Morris T., Phung D. et al. (2006). ZD4054, a potent, specific endothelin A receptor antagonist, improves overall survival in pain-free or mildly symptomatic patients with hormone-resistant prostate cancer (HRPC) and bone metastases. *Eur. J. Cancer* 5:3.
- Janowska-Wieczorek A, Majta M, Ratajczak J, Ratajczak MZ (2001). Autocrine/paracrine mechanisms in human hematopoiesis. *Stem Cells*, 19(2):99-107.
- Jansen J, Hanks S, Thompson JM, Dugan MJ, Akard LP (2005). Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *J Cell Mol Med*, 9(1): 37-50.
- Janzen V, Fleming HE, Riedt T, et al.(2008). Hematopoietic stem cell

- responsiveness to exogenous signals is limited by caspase-3. *Cell Stem Cell.*; 2:584-594.
- Jazaeri A.A., Awtrey C.S., Chandramouli G.V., Chuang Y.E., Khan J., Sotiriou C. et al. (2005). Gene expression profiles associated with response to chemotherapy in epithelial ovarian cancers. *Clin. Cancer Re.* 11: 6300-6310.
  - Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. (2006). Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med.*;12:1167-1174
  - Johansen LM, Iwama A et al.(2001). c-Myc is a critical target for C/EBP $\alpha$  in granulopoiesis. *Molecular and Cellular Biology*; 21: 3789-3806.
  - Johnson DH, Herbst RS, Giaccone G, et al. (2002). ZD1839 ('IRESSA',) in combination with paclitaxel & carboplatin in chemotherapy-native patient with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): result from phase III clinical trial (INTACT 2). *Ann Oncol* 13 (suppl 5):127-28.
  - Jouanneau J, Gavrilovic J, Caruelle D, Jaye M, Moens G, Caruelle JP, Thiery JP. (1991). Secreted or nonsecreted forms of acidic fibroblast growth factor produced by transfected epithelial cells influence cell morphology, motility, and invasive potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(7):2893-7.
  - Jougasaki M, Burnett JC Jr (2000). Adrenomedullin: potential in physiology and pathophysiology. *Life Sci*, 66(10): 855-872.
  - Jung Y, Song J, Shiozawa Y, et al. (2008). Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts thereby participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells.*; 26:2042-2051.
  - Kabadere SD, Uzuner K, Altuner Y, Uyar R (2001). The mitogenic activity of endothelin-1 on megakaryocytopoiesis in vitro. *Arch Physiol Biochem*, 109: 69-73.
  - Kacena MA, Gundberg CM, Horowitz MC. (2006). A reciprocal regulatory interaction between megakaryocytes, bone cells, and hematopoietic stem cells. *Bone.*; 39:978-984.
  - Kapas S, Catt KJ, Clark AJ (1995). Cloning and expression of cDNA encoding a rat adrenomedullin receptor. *J Biol Chem*, 270(43): 25344-25347 .
  - Kapas S, Clark AJ (1995). Identification of an orphan receptor gene as a type 1 calcitonin gene-related peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 217(3): 832-838.

- Karne S, Jayawickreme CK, Lerner MR (1993). Cloning and characterization of an endothelin-3 specific receptor (ETC receptor) from *Xenopus laevis* dermal melanophores. *J Biol Chem*, 268(25): 19126-19133
- Kato H, Shichiri M, Marumo F, Hirata Y (1997). Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells. *Endocrinology*, 138(6):2615-2620.
- Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T et al. (2007). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*. 121: 1009-1121.
- Kiel MJ, Morrison SJ (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol.*;8:290-301.
- Kim T.H., Xiong H., Zhang Z. and Ren B. (2005). B-Catenin activates the growth factor endothelin-1 in colon cancer cells. *Oncogene*, 24: 597-604.
- Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, Ichiki Y Nakamura S, Matsuo H, Eto T (1993). Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 192:553-560.
- Kitamura K, Kangawa K, Ishiyama Y, Washimine H, Ichiki Y, Kawamoto M, Minamino N, Matsuo H, Eto T (1994). Identification and hypotensive activity of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP). *FEBS Lett*, 351:35-37.
- Koeffler HP and Golde DW: Acute myelogenous leukaemia (1978): A human cell line responsive to colony-stimulating activity. *Science*, 200:1153-64
- Koeffler HP, Billing R, Sparkes RS, Golde DW (1980): An undifferentiated strain derived from the acute myelogenous leukemia cell line KG-1. *Blood*, 56:265-83
- Kollet O, Dar A, Shivtiel S, et al. (2006). Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med.* ;12:657-664.
- Kopetz E.S., Nelson J.B. and Carducci M.A. (2002). Endothelin-1 as a target for therapeutic intervention in prostate cancer. *Invest. New Drugs*, 20:173-182.
- Körbling M, Fliedner TM, Holle R, Magrin S, Baumann M, Holdermann E, Eberhardt K.(1991) Autologous blood stem cell (ABSCT) versus purged bone marrow transplantation (pABMT) in standard risk AML: influence of source and cell composition of the autograft on hemopoietic reconstitution and disease-free survival. *Bone Marrow Transplant.*, 7(5):343-9.

- Krause DS, Lazarides K, von Andrian UH, Van Etten RA. (2006). Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. *Nat Med.* 2006;12:1175-1180.
- Kris MG, Natale RB, Herbst RS, Lynch TJ Jr, Prager D, Belani CP, Schiller JH, Kelly K, Spiridonidis H, Sandler A, Albain KS, Cella D, Wolf MK, Averbuch SD, Ochs JJ, Kay AC (2003). Efficacy of gefitinib, an inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, in symptomatic patients with non-small cell lung cancer: a randomized trial. *JAMA.* Oct 22;290(16):2149-58.
- Kubo A, Minamino N, Isumi Y, Kangawa K, Dohi K, Matsuo H (1998). Adrenomedullin production is correlated with differentiation in human leukemia cell lines and peripheral blood monocytes. *FEBS Lett.* 426: 233-237.
- Lahav R., Heffner G. and Paterson P.H. (1999). An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.* 96: 11496-1111500.
- Lane SW, Scadden DT, Gillilin DG (2009). The leukemic stem cell niche: current concepts and therapeutic opportunities. *Blood;* 114: 1150-1157.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* Feb 17;367(6464):645-8.
- Larsson J, Ohishi M, Garrison B, et al. (2008). Nf2/merlin regulates hematopoietic stem cell behavior by altering microenvironmental architecture. *Cell Stem Cell.*; 3:221-227.
- Lataillade JJ, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, et al. (2008). Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood.*; 112:3026-3035.
- Levin ER (1995) Endothelins. *N. Engl. J. Mod.* 333: 356-363
- Lewis LK, Smith MW, Brennan SO, Yandle TG, Richards AM, Nicholls MG (1997). Degradation of human adrenomedullin(1-52) by plasma membrane enzymes and identification of metabolites. *Peptides*, 8(5):733-9.
- Ley TJ, Mardis ER, Ding L, et al. (2008). DNA sequencing of a cytogenetically normal acute myeloid leukaemia genome. *Nature*;456:66-72.
- *Lezioni di Ematologia di Sante Tura, sesta edizione, 2003.*

- Lindhagen E, Eriksson A et al. (2008). Significant cytotoxic activity in vitro of the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib in acute myeloblastic leukaemia. *European Journal of Hematology*; 81: 344-353.
- Linker CA (2003). Autologous stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplantation*, 31:731-38.
- Liso V e Specchia G. Leucemia acuta mieloide. In: *Malattie del sangue e degli organi ematopoietici*. Castaldi G e Liso V (2004) 4° ediz. McGraw-Hill.
- Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, et al. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature*. 2009;457:92-96.
- Logan A (1990). Intracrine regulation at the nucleus - a further mechanism of growth factor activity? *Journal of Endocrinol*, 125: 339-343.
- Lord BI, Testa NG, Hendry JH (1975). The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood*; 46:65-72.
- Löwenberg B, Downing JR, Burnett A (1999). Acute myeloid leukaemia. *Medical Progress*, 341:1051-62.
- Lucas D, Battista M, Shi PA, Isola L, Frenette PS. (2008). Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell*. ; 3:364-366.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*. May 20;350(21):2129-39.
- Mai H.Q., Zeng Z.Y., Zhang C.Q., Feng K.T., Guo X., Mo H.Y. et al. (2006). Elevated plasma big ET-1 is associated with distant failure in patients with advanced-stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*, 106:1548-1553.
- Makin CA, Bobrow LG, Bodmer WF (1984). Monoclonal antibody to cytokeratin for use in routine histopathology. *J Clin Pathol*, 37: 975-983.
- Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, et al. (2009). Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med*.;361:1058-1066.
- Masaki T. (2000). The endothelin family: an overview. *J. Cardiovasc. Pharmacol*. 35: S3-S5.

- Mathieu MN, Hamroun D, Launay JM, Chevillard C (1998). Human bone marrow platelet progenitors express and release endothelin-1. *J Cardiovasc Pharmacol*, 31(Suppl 1): 509-511.
- Matsumura Y, Ikegawa R, Ohyama T, Hayashi K, Morimoto S (1989). Endothelin immunoreactivity in medium from cultured porcine aortic endothelial cells correlates with the biological activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 160(2):602-608.
- Mattoli S, Mezzetti M, Riva G, Allegra L, Fasoli A (1990). Specific binding of endothelin on human bronchial smooth muscle cells in culture and secretion of endothelin-like material from bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 3(2):145-151.
- Mayack SR, Wagers AJ. (2008). Osteolineage niche cells initiate hematopoietic stem cell mobilization. *Blood*. 2008;112:519-531.
- Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman (2003). Biology of human hematopoietic stem and progenitor cell present in circulation. *Arch. Med. Res.*, 34:476-488.
- Mazzocchi G, Rossi GP, Rebuffat P, Malendowicz LK, Markowska A, Nussdorfer GG (1997). Endothelins stimulate deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in rat adrenal zona glomerulosa, acting through an endothelin A receptor coupled with protein kinase C- and tyrosine kinase-dependent signaling pathways. *Endocrinology*, 138(6): 2333-2337.
- McKenna RW (2000). Multifaceted approach to the diagnosis and classification of acute leukemias. *Clin Chem*. Aug;46(8 Pt 2):1252-9. Review.
- McLatchie LM, Fraser NJ, Main MJ, Wise A, Brown J, Thompson N, Solari R, Lee MG, Foord SM (1998). RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 393(6683): 333-339.
- McNiece IK, Stewart FM, Deacon DM, Temeles DS, Zsebo KM, Clark SC Quesenberry PJ (1989). Detection of a human CFC with a high proliferate potential. *Blood*, 74:609-15.
- Mendez-Ferrer S, Lucas D, Battista M, Frenette PS. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*; 452:442-447
- Mignatti P, Rifkin DB (1991). Release of basic fibroblast growth factor, an angiogenic factor devoid of secretory signal sequence: a trivial phenomenon or a novel secretion mechanism? *J Cell Biochem*, 47: 201-207.

- Miraglia S, Godfrey W, Buck D (1998). A response to AC133 hematopoietic stem cell antigen: human homologue of mouse kidney prominin or distinct member of a novel protein family? *Blood*, 91(11): 4390-4391.
- Miranda MB, Duan R et al. (2008). Gefitinib potentiates myeloid cell differentiation by ATRA. *Leukemia*; 22: 1624-1627.
- Moore MA (1991). Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood*, 78(1):1-19.
- Morrison SJ, Spradling AC (2008). Stem cells and niches: mechanism that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 132:598-611.
- Mroczkowski, B., Reich, M., Chen, K., Bell, G. I., and Cohen, S. (1989) Recombinant human epidermal growth factor precursor is a glycosylated membrane protein with biological activity. *Mol. Cell. Biol.* 9, 2771-2778
- Mrózek K, Heerema NA, Bloomfield CD (2004). Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev.* Jun;18(2):115-36. Review
- Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. (2007) Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*: 109:431-448.
- Muff R, Born W, Fischer JA (2001). Adrenomedullin and related peptides: receptors and accessory proteins. *Peptides*, 22(11):1765-1772.
- Mukherjee S, Raje N, Schoonmaker JA, et al. (2008). Pharmacologic targeting of a stem/progenitor population in vivo is associated with enhanced bone regeneration in mice. *J Clin Invest.* ; 118:491-504 a.
- Mukherjee S, Vallet S, , Vaghela N, Hideshima T, Fulciniti M, Pozzi S, Santo L, Cirstea D, Patel K, Sohani AR, Guimaraes A, Xie W, Chauhan D, Schoonmaker JA, Attar E, Churchill M, Weller E, Munshi N, Seehra JS, Weissleder R, Anderson KC, Scadden DT, Raje N. (2008) Activin A promotes multiple myeloma-induced osteolysis and is a promising target for myeloma bone disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ;107(11):5124-9 b.
- Murakami O., Takahashi K., Satoh F., Totsune K., Sone M., Arihara Z., Andoh N., Mouri T. (1998). Expression of adrenomedullin and adrenomedullin mRNA in ectopic ACTH-secreting tumors. *Eur J. Endocrinol* 138:436-439.
- Murphy MJ, Wilson A, Trumpp A. (2005). More than just proliferation: Myc function in stem cells. *Trends Cell Biol.* 15(3):128-37.



- Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, Murakami H, Sasano H, Shirato K, Shibahara S (1999). Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis. *Clin Sci*, 97(2): 247-251.
- Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P (2003). The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003, 3:110-116.
- Nilsson SK, Johnston HM, Coverdale JA. (2001). Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood.*; 97:2293-2299.
- Nussdorfer GG, Rossi GP, Mazzocchi G (1997). Role of adrenomedullin and related peptides in the regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Peptides*, 18: 1079-1089.
- Nussdorfer GG (2001). Proadrenomedullin-derived peptides in the paracrine control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Int Rev Cytol*, 206: 249-284.
- Ochs J, Grons J, Warner KL (2004). Final survival and safety results for 21.064 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients who received compassionate use gefitinib (Iressa®) in a United States expanded access program (EAP) [abstract]. *Proc Am Soc Clin Oncol* 23:628.
- Oehler MK, Norbury C, Hague S, Rees MC, Bicknell R (2001). Adrenomedullin inhibits hypoxic cell death by upregulation of Bcl-2 in endometrial cancer cells: a possible promotion mechanism for tumour growth. *Oncogene*, 20(23): 2937-2945.
- Ogawa M (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cell. *Blood*, 81: 2844-2853.
- Ohlstein et al.(2004). The stem cell niche: theme and variation, *Current Opinion in Cell Biology*. 16:693-699.
- Ortega Mateo A, de Artinano AA (1997). Highlights on endothelins: a review. *Pharmacol Res*, 36(5): 339-351.
- Pabst T, Mueller BU et al. (2001). Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein- $\alpha$  (C/EBP $\alpha$ ), in acute myeloid leukemia. *Nature Genetics*; 27: 263-270.
- Pabst T, Mueller BU.(2007). Transcriptional dysregulation during myeloid transformation in AML.;26(47):6829-37.
- Pabst T, Eyholzer M, Haefliger S, et al. (2008). Somatic CEBPA mutations

are frequent second event in families with germline CEBPA mutations and familial acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.*; 26:5088-5093.

- Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU (2009). Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer*;100(8):1343-6.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 7;101(36):13306-11. Epub 2004 Aug 25.
- Passegue E, Wagers AJ, Giuriato S, Anderson WC, Weissman IL (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J Exp Med.*;202:1599-1611.
- Perry JM, Li L (2007). Disrupting the stem cell niche: good seeds in bad soil. *Cell*; 129:1045-1047.
- Pinto A, Zagonel V, Ferrara F (2001). Acute myeloid leukemia in the elderly: biology and therapeutic strategies. *Crit Rev Oncol Hematol.* Sep;39(3):275-87. Review.
- Pirtskhalaishvili G, Hrebinko RL, Nelson JB (2001). The treatment of prostate cancer: an overview of current options. *Cancer Pract.*;9(6):295-306.
- Ploemacher RE, Van der Sluijs JP, Voerman JS, Brons NH (1989). An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood*, 74(8): 2755-2763.
- Plowman GD, Culouscou JM, Whitney GS, Green JM, Carlton GW, Foy L, Neubauer MG, Shoyab M (1993). Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family. *Proc Natl Acad Sci USA.* Mar 1;90(5):1746-50.
- Podar K, Chauhan D, Anderson KC. (2009). Bone marrow microenvironment and the identification of new targets for myeloma therapy. *Leukemia.*; 23:10-24.
- Qiang YW, Chen Y, Stephens O, et al. (2008). Myeloma-derived Dickkopf-1 disrupts Wnt-regulated osteoprotegerin and RANKL production by

osteoblasts: a potential mechanism underlying osteolytic bone lesions in multiple myeloma. *Blood.*; 112:196-207.

- Radomska HS, Huettner CS et al. (1998). CCAAT/Enhancer Binding Protein a is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Molecular and Cellular Biology*;18: 4301-4314.
- Radomska HS, Basseres DS et al. (2006). Block of C/EBP $\alpha$  function by phosphorylation in acute myeloid leukemia with FLT3 activating mutations. *The Journal of Experimental Medicine*; 203: 371-381.
- Ranson M, Hammond LA, Ferry D, Kris M, Tullo A, Murray PI, Miller V, Averbuch S, Ochs J, Morris C, Feyereislova A, Swaisland H, Rowinsky EK (2002). ZD1839, a selective oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, is well tolerated and active in patients with solid, malignant tumors: results of a phase I trial. *J Clin Oncol*, 20(9):2240-50
- Renneville A, Boissel N, Zurawski V, et al. (2009). Wilms tumor 1 gene mutations are associated with a higher risk of recurrence in young adults with acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association. *Cancer.* ;115:3719-3727.
- Resink TJ, Scott-Burden T, Bühler FR (1990): Activation of multiple signal transduction pathways by endothelin in cultured human vascular smooth muscle cells. *Eur J Biochem*,189, 415-421.
- Rewcastle GW, Denny WA, Bridges AJ, Zhou H, Cody DR, McMichael A, Fry DW (1995). Tyrosine kinase inhibitors. 5. Synthesis and structure-activity relationships for 4-[(phenylmethyl)amino]- and 4-(phenylamino)quinazolines as potent adenosine 5'-triphosphate. *J. Med. Chem.* 38: 3482-7.
- Robertson MJ, Soiffer RJ, Freedman AS, Rabinowe SL, Anderson KC, Ervin TJ, Murray C, Dear K, Griffin JD, Nadler LM, Ritz J (1992). Human Bone Marrow Depleted of CD33-Positive Cells Mediates Delayed but Durable Reconstitution of Hematopoiesis: Clinical Trial of MY9 Monoclonal Antibody-Purged Autografts for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Blood*, 79: 2229-36.
- Rombouts WJ, Martens AC, Ploemacher RE (2000). Identification of variables determining the engraftment potential of human acute myeloid leukemia in the immunodeficient NOD/SCID human chimera model. *Leukemia.* May;14(5):889-97.

- Rombouts EJ, Pavic B, Lowenberg B, Ploemacher RE. (2004). Relation between CXCR-4 expression, Flt3 mutations, and unfavorable prognosis of adult acute myeloid leukemia. *Blood.*; 104:550-557.
- Rosanò L., Spinella F., Salani D., Di Castro V., Venuti A., Nicotra M.R. et al. (2003). Therapeutic targeting of the endothelin A receptor in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 63: 2447-2453.
- Rosanò L, Di castro V, Spuinella F at al. (2007). Combined Targeting of Endothelin A Receptor and Epidermal Growth Factor Receptor in Ovarian Cancer Shows Enhanced Antitumor Activity. *Cancer Res*; 67: (13).
- Rosenbauer F, Koschmieder S, Steidl U, Tenen DG (2005). Effect of transcription-factor concentrations on leukemic stem cells. *Blood Sep 1;106(5):1519-24.* Epub 2005 May 24. Review.
- Rosenbauer F and Tenen DG (2007). Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nature Rev*; 7: 105-117.
- Rossi GP, Belloni AS. Nussdorfer GG, Pessina AC (2000). Endothelin-1 and the adrenal gland. *J Cardiovasc Pharmacol*, 35(4 Suppl 2): S17-20.
- Rubanyi GM and Polokoff MA (1994). Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology and pathophysiology. *Pharmacol Rev*, 46:325-415.
- Rubin SA and Levin ER (1994). The endocrinology of vasoactive peptides: synthesis to function. *J. Clin.Endocrinol. Metab* 78: 6-10.
- Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, et al. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell.* ;131:324-336.
- Sakurai T, Yanagisawa T, Takuwa H, Miyazaki S, Kimura K, Gotoet I, Masaki (1990). Clonin of a cDNA encoding non-isopeptide-selective subtype of he endothelin receptor. *Nature Vol.* 348 P.732-735.
- Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* Jul;19(3):183-232. Review.
- Samson WK (1999). Adrenomedullin and the control of fluid and electrolyte homeostasis. *Annu Rev Physiol*, 61:363-389.
- Sanz M. and A. (1996). Sampere Immunophenotyping of AML and MDS and detection of residual disease. *Baillieres Clin Haematol* 9(1): P35-55.

- Sasaki T, Hong MH (1993). Endothelin-1 localization in bone cells and vascular endothelial cells in rat bone marrow. *Anat Rec.*;237(3):332-7.
- Sata M, Kakoki M, Nagata D, Nishimatsu H, Suzuki E, Aoyagi T, Sugiura S, Kojima H, Nagano T, Kangawa K, Matsuo H, Omata M, Nagai R, Hirata Y (2000). Adrenomedullin and nitric oxide inhibit human endothelial cell apoptosis via a cyclic GMP-independent mechanism. *Hypertension*, 36(1): 83-88.
- Scadden DT (2007). The stem cell niche in health and leukemic disease. *Best Pract Res Clin Haematol* 20(1): 19-27,2007.
- Schepers H, Wierenga AT et al. (2007). Reintroduction of C/EBP $\alpha$  in leukemic CD34+ stem/progenitor cells impairs self-renewal and partially restores myelopoiesis. *Blood*; 110: 1317-1325.
- Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. (2008). Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.*;358:1909-1918.
- Scoffield J. (1976) Open mouths get kids' interest. *Dent Stud*; 54(4):43, 56.
- Scott J, Urdea M, Quiroga M, Sanchez-Pescador R, Fong N, Selby M, Rutter WJ, Bell GI (1983). Structure of a mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science*. 15;221(4607):236-40.
- Sessa WC, Kaw S, Hecker M, Vane JR (1991). The biosynthesis of endothelin-1 by human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 174(2): 613-618.
- Shinoki N, Kawasaki T, Minamino N, Okahara K, Ogawa A, Ariyoshi H, Sakon M et al. (1998). Shear stress down-regulates gene transcription and production of adrenomedullin in human aortic endothelial cells. *J Cell Biochem*, 71, 109–115.
- Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Brown JH, Chien KR (1990). Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem*, 265(33): 20555-20562.
- Siegel-Lakhai WS, Beijnen JH, Schellens JHM (2005). Current knowledge and future direction of the selective epidermal growth factor receptor inhibitors Erlotinib (TARCEVA®) and Gefitinib (IRESSA®). *The Oncologist* 10:579-89.

- Siena S, Castro-Malaspina H, Gulati SC (1985). Effects of in vitro purging with 4-hydroperoxycyclophosphamide on the hematopoietic and microenvironment elements of human bone marrow. *Blood*, 65:655-62.
- Silvestri GA and Riviera PM (2005). Targeted therapy for treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Chest* 128:3975-84.
- Simonson MS, Wann S, Mene P, Dubyak GR, Kester M, Nakazato Y, Sedor JR, Dunn MJ (1989). Endothelin stimulates phospholipase C, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange, c-fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *J Clin Invest*, 83(2): 708-712.
- Sipkins DA, Wei X, Wu JW, et al.(2005). In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature*; 435:969-973.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. Jan 9;235(4785):177-82.
- Smith C. (2003). Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer control*, 10(1): 9-16.
- Smith ML, Cavenagh JD et al. (2004) Mutation of CEBPA in familial acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*; 351: 2403-2407.
- Smollich M. and Wulfing P. (2007). The endothelin axis: a novel target for pharmacotherapy of female malignancies. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 5: 239-248.
- Smollich M., Gotte M., Yip G.W., Yong E.S., Kersting C., Fischgrabe J. et al., (2007). On the role of endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1) and neprilysin in human breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat* 106: 361-369.
- So CW, Karsunky H, Passegue E, Cozzio A, Weissman IL, Cleary ML (2003). MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukemia in mice. *Cancer Cell* 3:161-171.
- Spoo AC, Lubbert M, Wierda WG, Burger JA. (2007). CXCR4 is a prognostic marker in acute myelogenous leukemia. *Blood.*; 109:786-791.
- Stachowiak MK, Moffett J, Maher P, Tucholski J, Stachowiak EK (1997). Growth factor regulation of cell growth and proliferation in the nervous system. A new intracrine nuclear mechanism. *Mol Neurobiol*, 15: 257-283.

- Stamos J, Sliwkowski MX, Eigenrot C. (2002). Structure of epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem* 277(48): 46265-72.
- Stegmaier K, Corsello SM, Ross KN, Wong JS, Deangelo DJ, Golub TR (2005). Gefitinib induces myeloid differentiation of acute myeloid leukemia. *Blood*. Oct 15;106(8):2841-8.
- Stier S, Ko Y, Forkert R et al. (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*; 201:1781-1791.
- Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*; 25:977-988.
- Sugo S, Minamino N, Shoji H, Kangawa K, Kitamura K, Eto T, Matsuo H (1995). Interleukin-1, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide additively stimulate production of adrenomedullin in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 207(1): 25-32.
- Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W Lansdorp PM Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood*, 74: 1563-1569.
- Sutherland HJ, Lansdorp PM, Henkelman DH, Eaves AC, Eaves CJ (1990). Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87(9): 3584-3588.
- Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. (2008). WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon, France: IARC Press.
- Takigawa N, Takeuchi M, Shibayama T, Yoshida I, Kawata N, Tada A, Ueoka H, Takahashi K (2005). Successful treatment of a patient with synchronous advanced non-small cell lung cancer and acute myeloid leukemia by a combination of gefitinib, low-dose cytarabine and aclarubicin. *Anticancer Res*. May-Jun; 25(3):2579-82.
- Takuwa N, Takuwa Y, Yanagisawa M, Yamashita K, Masaki T (1989). A novel vasoactive peptide endothelin stimulates mitogenesis through inositol lipid turnover in Swiss 3T3 fibroblasts. *J Biol Chem*, 264(14): 7856-7861.

- Tavor S, Park DJ et al. (2003) Restoration of C/EBP $\alpha$  expression in a BCR-ABL+ cell line induces terminal granulocytic differentiation. *The Journal of Biological Chemistry*; 278: 52651-52659.
- Teder P, Noble PW (2000). A cytokine reborn? Endothelin-1 in pulmonary inflammation and fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23(1): 7-10. Tenen G, Hromas R et al. (1997) Transcription factors, normal myeloid development and leukemia. *Blood*; 90: 489-519.
- Tenen DG (2001). Abnormalities of the CEBP alpha transcription factor: a major target in acute myeloid leukemia. *Leukemia*; 15: 688-689.
- Tenen DG (2003). Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nature Rev*; 3: 89-101.
- Teplyakov A: (2004). Endothelin-1 involved in systemic cytokine network inflammatory response at atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, 44, Suppl 1, S274-S275.
- Till JE, McCulloch EA (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14:213.
- Titus B., Frierson H.F., Conoway M., Ching K., Guise T., Chirgwin J. et al. (2005). Endothelin axis is a target of the lung metastasis suppressor gene RhoGDI2. *Cancer Res*. 65: 7320-7327.
- Tomić M, Galesić K, Markota I. (2008). Endothelin-1 and nitric oxide in patients on chronic hemodialysis. *Ren Fail.* ;30(9):836-42
- Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, et al. (2007). FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. *Cell*; 128:325-339.
- Veale D. Kerr N. Gibson GJ. Kelly PJ and Harris AL (1993). The relationship of quantitative epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer to long term survival *BrJCaner* 68: 162-165
- Venuti A., Salami D., Manni V., Poggiali F. and Bagnato A. (2000). Expression of endothelin-1 and endothelin A receptor in HPV-associated cervical carcinoma: new potential targets for anticancer therapy. *FASEB J*. 14: 2277-2283.
- Wagner F, Buz S, Neumeyer HH, Hetzer R, Hoher B (2004). Nitric oxide inhalation modulates endothelin-1 plasma concentration gradients following left ventricular assist device implantation. *J Cardiovasc Pharmacol*, 44, Suppl 1, S89-S91.



- Walkley CR, Olsen GH, Dworkin S, et al. (2007). A microenvironment-induced myeloproliferative syndrome caused by retinoic acid receptor gamma deficiency. *Cell*. 15: 223-228.
- Walkley CR, Shea JM, Sims NA, Purton LE, Orkin SH. (2007). Rb regulates interactions between hematopoietic stem cells and their bone marrow microenvironment. *Cell*. 16: 213-222-
- Ward, W. H., Cook, P. N., Slater, A. M., Davies, D. H., Holdgate G. A., and Green, L. R. (1994): Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. *Biochem. Pharmacol.*, 48:659–666
- Ward AC, Loeb DM, Soede-Bobok AA et al. (2000). Regulation of granulopoiesis by transcription factors and cytokine signals. *Leukemia*; 14: 973-990.
- Wei J, Wunderlich M, Fox C, et al. (2008). Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell.*; 13:483-495.
- Williams DA (2000). Stem Cell Model of hematopoiesis. In: Hoffman R, Benz EJ Jr., Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, McGlave P: *Hematology: Basic principles and practice*, 3rd ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Williams DA, Rios M, Stephens C, Patel VP. (1991). Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cellmicroenvironment interactions. *Nature*; 352:438-441.
- Withers DJ, Coppock HA, Seufferlein T, Smith DM, Bloom SR, Rozengurt E (1996). Adrenomedullin stimulates DNA synthesis and cell proliferation via elevation of cAMP in Swiss 3T3 cells. *FEBS Lett*, 378(1): 83-87.
- Woodburn JR (1999). The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacol Ther*. May-Jun;82(2-3):241-50.
- Xie Y, Yin T, Wiegraebe W, et al. (2009). Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature*; 547:97-101.
- Yan G, Fukabori Y, McBride G, Nikolaropolous S, McKeehan WL (1993). Exon switching and activation of stromal and embryonic fibroblast growth factor (FGF)-FGF receptor genes in prostate epithelial cells accompany stromal independence and malignancy. *Mol Cell Biol*, 13: 4513-4522.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y,

- Yazaki Y, Goto K, Masaki T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*, 332(6163): 411-415.
- Yang L, Wang L, Geiger H, Cancelas JA, Mo J, Zheng Y. (2007). Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence and niche interaction in the bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 104:5091-5096.
  - Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, et al. (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell.* ; 1:685-697.
  - Young NS, Gerson SL et al. (2006). *Clinical Hematology*. Mosby Elsevier
  - Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ascensao JL, MacKintosh FR, Flake AW (1997). Transplantation of hematopoietic stem cells in utero. *Stem Cells*, 15 Suppl 1:79-92.
  - Zhang P, Nelson E, Radomska HS et al. (2002). Induction of granulocytic differentiation by 2 pathways. *Blood*; 99: 4406-4412.
  - Zheng R, Friedman AD et al. (2004). Internal tandem duplication mutation of FLT3 blocks myeloid differentiation through suppression of C/EBP $\alpha$  expression. *Blood*; 103: 1883-1890.
  - Ziegler BL, Valtiri M, Porada GA, De Maria R, Muller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani ED, Peschle C (1999). KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Scienze*, 285(5433): 1553-1558.
  - Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, de Witte T, Labar B, Resegotti L (1995). Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N Engl J Med*, 332(4):217-23.
  - Zoja C, Orisio S, Perico N, Benigni A, Morigi M, Benatti L, Rambaldi A, Remuzzi G (1991). Constitutive expression of endothelin gene in cultured human mesangial cells and its modulation by transforming growth factor-beta, thrombin, and a thromboxane A2 analogue. *Lab Invest*, 64(1): 16-20.
  - Zudaire E, Cuttitta F, Martinez A (2003). Regulation of pancreatic physiology by adrenomedullin and its binding protein. *Regul Pept*, 112, 121-130 a.
  - Zudaire E, Martínez A, Cuttitta F. (2003). Adrenomedullin and cancer. *Regul Pept.*;112(1-3):175-83 b.



## **RINGRAZIAMENTI**

Ringrazio il Dottor G.B. Gajo, Primario del Servizio Immunotrasfusionale dell'Ospedale di Treviso, il Dottor F. Gherlinzoni, primario dell'U.O. di Ematologia dell'Ospedale di Treviso e il Prof. Pier Paolo Parnigotto, Direttore della scuola di Dottorato, per avermi concesso di frequentare il Laboratorio di Colture Cellulari dell'Ospedale di Treviso dove ho svolto il dottorato di ricerca.

Ringrazio Treviso-AIL, per aver reso materialmente possibile questo progetto, ma soprattutto per avermi dato forte motivazione nel portarlo avanti.

Ringrazio il Dottor Sergio De Angeli per la disponibilità e per il *know how* perfuso.

Un riconoscimento va al Laboratorio di Biologia Molecolare e Citogenetica dell'U.O. di Anatomia Patologica, al Laboratorio di Citometria del Centro Trasfusionale dell'Ospedale Ca' Foncello di Treviso e ai colleghi padovani che hanno contribuito allo sviluppo di questa tesi.

Ringrazio specialmente il Laboratorio di Colture Cellulari dell'ospedale di Treviso, in particolare Laura ed Elisabetta.. chiacchierare e ridere con voi, non ha prezzo!

Un ringraziamento speciale ai miei genitori, Angelo e Teresa, a Marco e Maria Rita, ad Angela e Donato, per l'affetto che mi dimostrate quotidianamente, per la pazienza che avete avuto e perché questo è anche per voi.. forse è l'ultima!

Un grazie particolare a Simone e Gioia Luna.. non immaginavo fosse così bello avervi..

Infine.. un grazie a Fiore.. per capire sempre, per sopportare sempre, per sapere sempre cosa, per sapere sempre come, per esserci sempre e per esserci per sempre..