



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE

CICLO 26

COORDINATORE Prof. Silvano Capitani

Nuovi approcci basati su TRAIL ed MSC per
la terapia delle malattie oncoematologiche

Settore Scientifico Disciplinare BIO/16

Dottorando

Dott. Caruso Lorenzo

(firma)

Tutore

Prof. Capitani Silvano

(firma)

RIASSUNTO

Il TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) fa parte della superfamiglia di citochine del TNF, la quale comprende 18 geni, codificanti per 19 proteine transmembrana strutturalmente correlate, che rivestono un ruolo importante nella regolazione della morte cellulare, della risposta immunitaria e dell'infiammazione. Nell'uomo sono stati descritti almeno cinque diversi recettori per TRAIL, appartenenti alla famiglia del TNF-R, espressi su diverse tipologie cellulari. TRAIL-R1 (DR4) e TRAIL-R2 (DR5) trasducono segnali di apoptosi, mentre TRAIL-R3 (DcR1) e TRAIL-R4 (DcR2), come l'osteoprotegerina (OPG), sono recettori decoy incapaci di indurre morte cellulare.

Livelli significativi di TRAIL sono stati riscontrati in diversi tessuti umani quali milza, prostata, polmoni, timo, rene, intestino, ovaio e, a livelli inferiori, cuore, tessuto muscolare scheletrico, pancreas, fegato, cervello e testicolo. Una delle principali funzioni esercitate da TRAIL è quella di indurre apoptosi in molte linee cellulari trasformate e in cellule tumorali *in vivo*, mentre non esercita effetti citotossici per la maggior parte delle cellule normali.

Con l'obiettivo di identificare molecole in grado di agire come agenti antitumorali, abbiamo centrato il nostro studio sul potenziale terapeutico del sistema del TNF-related apoptosis-inducing ligand. Lo scopo del lavoro di questi tre anni è stato dunque quello di studiare e mettere a punto nuove strategie basate su TRAIL, al fine di indurre preferenzialmente morte delle cellule neoplastiche che si sono dimostrate resistenti alle terapie convenzionali. A questo proposito abbiamo condotto una serie di studi *in vitro* e *in vivo* utilizzando la molecola ricombinante TRAIL.

Parallelamente, le nostre ricerche si sono focalizzate sulle potenzialità terapeutiche delle cellule staminali mesenchimali progenitrici stromali provenienti dal midollo osseo (BM-MSC). Ci siamo quindi proposti di evidenziare la capacità di queste cellule di esercitare attività antitumorale e di analizzare i meccanismi che regolano tali effetti.

Il raggiungimento di questi obiettivi ha richiesto lo sviluppo di un modello animale in topi SCID (Severe Combined Immunodeficiency) di linfoma Non-Hodgkin (NHL), mediante il quale indagare la disseminazione *in vivo* delle cellule tumorali e valutare le potenzialità terapeutiche di TRAIL ricombinante e delle BM-MSC. Tale modello è stato allestito mediante inoculo intraperitoneale di cellule BJAB di linfoma di Burkitt umano

EBV negativo o cellule di linfoma NHL EBV positivo SKW6.4. Per valutare la sopravvivenza indotta da rTRAIL e BM-MSC i topi xenotrapiantati sono stati poi trattati mediante TRAIL ricombinante o cellule mesenchimali iniettati nel lato addominale opposto rispetto al sito d'iniezione delle cellule di linfoma.

Complessivamente i risultati riportati nella presente tesi dimostrano che entrambi i trattamenti risultano efficaci nel ridurre lo sviluppo della massa tumorale.

Inoltre, un impianto di MSC inglobate in matrici di ialuronato, al fine di evitare l'integrazione delle cellule mesenchimali nel network tumorale fibrovascolare, ha dato risultati paragonabili a quelli precedentemente ottenuti e ha inoltre mostrato un significativo miglioramento della funzionalità epatica, verificato mediante misurazione dei livelli degli enzimi ALT/AST nel siero.

In conclusione, i dati da noi raccolti suggeriscono che entrambe le strategie adottate si dimostrano validi strumenti per lo sviluppo di nuove terapie oncologiche.

INDICE

INTRODUZIONE	1
TRAIL	1
La superfamiglia del TNF.....	1
Struttura ed espressione di TRAIL.....	3
I Recettori di TRAIL.....	7
La segnalazione a valle dei recettori di TRAIL	11
Ruoli biologici di TRAIL	14
MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE CRONICHE	17
Mieloma multiplo	18
Leucemia linfatica cronica	24
Linfomi maligni	27
Linfoma Non-Hodgkin's	28
Linfoma di Burkitt o a piccole cellule non clivate	32
SCOPO	33
RISULTATI	35
I Caratterizzazione di modelli tumorali ottenuti mediante trapianti di cellule di linfoma umano BJAB ed SKW6.4 in topi SCID (severe combined immunodeficiency)	35
II Trattamento di topi SCID xenotrapiantati con TRAIL ricombinante (rTRAIL)	37
III Trattamento di topi SCID xenotrapiantati con cellule staminali mesenchimali umane provenienti da midollo osseo (BM-MSC)	40
IV Trattamento di modelli di topi SCID xenotrapiantati con BM-MSC incorporate in matrici di acido ialuronico	45

DISCUSSIONE	50
MATERIALI E METODI	56
I Caratterizzazione di modelli tumorali ottenuti mediante trapianti di cellule di linfoma umano BJAB ed SKW6.4 in topi SCID (severe combined immunodeficiency)	57
II. Analisi immunoistologica ed immunoistochimica	58
III. Produzione di TRAIL umano ricombinante	59
IV. Analisi Statistica	59
BIBLIOGRAFIA	61

INTRODUZIONE

TRAIL

La superfamiglia del TNF

Gli organismi superiori consistono di un sistema ordinato di singole cellule che devono comunicare per mantenere e regolare le loro funzioni. Questo obiettivo è raggiunto tramite una rete complessa e altamente specifica di ormoni, mediatori chimici, chemochine e altre citochine, che agiscono come ligandi per recettori intra o extra-cellulari. L'interazione del ligando con lo specifico recettore induce una varietà di risposte cellulari quali il differenziamento, la proliferazione, la sopravvivenza. In particolare, ligandi e recettori della superfamiglia del Tumor Necrosis Factor (TNF) sono esempi di trasduttori del segnale, le cui azioni influenzano lo sviluppo, l'omeostasi e le risposte adattative di molte cellule e di diversi tessuti.

La superfamiglia di citochine del TNF comprende 18 geni, codificanti per 19 proteine, strutturalmente simili, che rivestono un ruolo importante nella regolazione della morte cellulare, della risposta immunitaria e dell'infiammazione [1]. Esse sono: TNF- α , TNF- β (conosciuta come linfotossina o LT α), linfotossina β , 4-1BBL, OX40L, CD27L, CD30L, CD40L, FasL (Apo-1L o CD95L), TRAIL (Apo-2L), TL1A, LIGHT, TWEAK, APRIL, BLYS (BAFF), RANKL, GITRL, EDA.

Molte di queste proteine sono sintetizzate come proteine transmembrana di tipo 2 e condividono una struttura comune, che corrisponde al dominio C-terminale, denominato dominio di omologia del TNF (THD). Tale dominio è

responsabile del legame al recettore e mostra una analogia di sequenza tra i diversi membri della famiglia tra il 20-30%. La maggior parte dei ligandi sono prodotti come proteine di membrana; forme solubili possono essere generate mediante eventi di splicing alternativo nel trascritto primario dell'esone che codifica per il dominio transmembrana o taglio proteolitico specifico del dominio extracellulare carbossi-terminale.

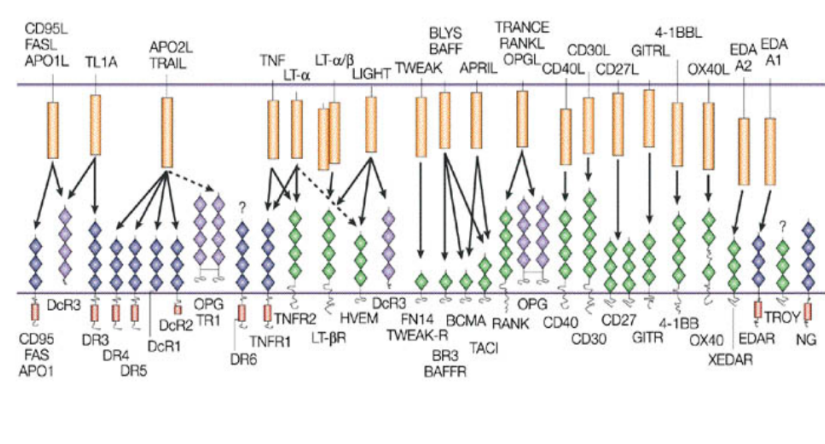


Figura 1. Rappresentazione schematica dei membri della superfamiglia del TNF e dei loro recettori.

I ligandi della superfamiglia del TNF esercitano i loro effetti biologici principalmente, sebbene non esclusivamente, all'interno del sistema immunitario, modulando la risposta immunitaria innata e specifica e l'infiammazione a diversi livelli; molte di queste citochine sono inoltre coinvolte anche nella regolazione di tessuti e organi al di fuori del sistema immunitario [2]. Durante lo sviluppo, ligandi quali TNF- α , LT α , LT β e RANKL inviano segnali essenziali per la morfogenesi degli organi linfoidi secondari [3]. Analogamente anche lo sviluppo e l'attivazione appropriata delle cellule precursori del sistema immunitario dipende da diversi membri della famiglia del TNF, quali BAFF e CD-40 per i linfociti B [4], 4-1BBL, OX-40L e CD-27L per i linfociti T [5], e CD-40L e RANKL per le cellule dendritiche [6]. Citochine proapoptotiche, quali TNF- α e FasL, concorrono alla

funzione delle cellule effettrici citotossiche e partecipano all'omeostasi del compartimento linfoide inducendo la morte delle cellule immunitarie una volta che queste hanno espletato la loro funzione [7]. Altri ligandi infine regolano lo sviluppo e il differenziamento delle strutture epiteliali (EDA-A1, EDA-A2), delle cellule endoteliali (TWEAK) e degli osteoclasti (RANKL e TNF- α) [4,8].

I recettori della superfamiglia del TNF, dei quali sono stati identificati 29 membri, sono principalmente glicoproteine transmembrana di tipo I caratterizzate dalla presenza di domini extracellulari ricchi in cisteina. Esistono inoltre alcune forme di proteine transmembrana di tipo III mancanti di un peptide segnale, e forme solubili, che mancano di un dominio di interazione con la membrana. Il legame tra il recettore e il ligando oltre a modulare la proliferazione, la sopravvivenza, il differenziamento e l'apoptosi cellulare, media ulteriori processi biologici, quali l'infiammazione, la fibrosi, la risposta immunitaria e la riparazione dei tessuti [9].

Struttura ed espressione di TRAIL

Il TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) viene espresso principalmente come una proteina transmembrana di tipo II avente una porzione intracellulare amino-terminale e una porzione carbossi-terminale esterna alla cellula [1]. E' costituita da 281 e 291 aminoacidi, rispettivamente, negli uomini e nel topo, con una massa molecolare di circa 33-35 kDa [9].

Questa proteina è stata identificata e caratterizzata nel 1995 [10] e viene anche denominata APO2L per la sua somiglianza aminoacidica con FAS/APO1L: 38 di 162 aminoacidi sono infatti conservati in entrambe le proteine (23% di identità) [2]. Inoltre, sia TRAIL sia FAS/APO1L (CD95L) sono espresse sia come proteine di membrana sia come proteine solubili [1].

Rispetto agli altri membri della superfamiglia del TNF, invece, TRAIL, mostra bassa omologia di sequenza, eccetto che con TNF- α , con cui ha il 19% di identità [2].

TRAIL non è solo presente in forma di molecola di superficie, ma viene anche rilasciata in seguito a proteolisi del dominio carbossi-terminale, ad opera di proteasi cisteiniche, per generare un ligando extracellulare solubile che mantiene l'attività biologica [12].

L'analisi strutturale ha rivelato che TRAIL in forma biologicamente attiva esiste come omotrimerico; un monomero della proteina contiene due foglietti β piegati antiparalleli che formano un β sandwich come impalcatura centrale e interagiscono con le subunità adiacenti in maniera testa-coda per generare un omotrimerico a forma di campana. La stabilità e l'attività biologica di TRAIL sono mantenute da uno ione zinco, il quale viene coordinato da un residuo di cisteina, precisamente la Cys230, per ognuna delle subunità del ligando, stabilizzando la forma trimerica [13, 14]. Il trimero così generato si assembla infine con tre molecole del recettore transmembrana, come complesso esamerico, confermando la stechiometria alla base dell'unità di segnalazione [10, 15].

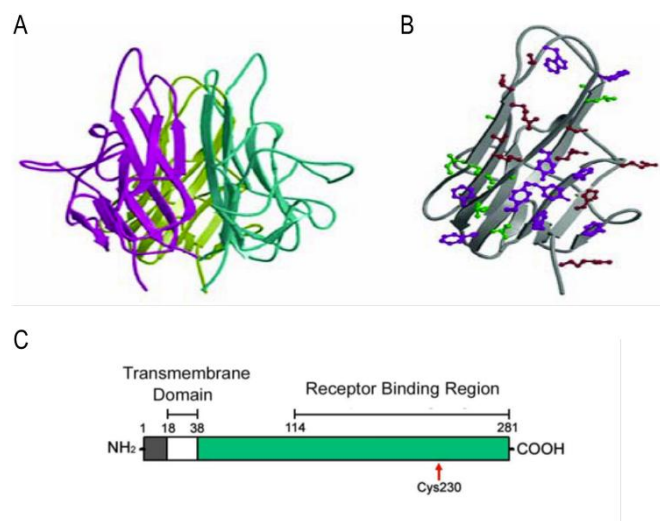


Figura 2. A) Struttura cristallina di TRAIL trimerico. B) Struttura del monomero di TRAIL che illustra i residui coinvolti nella trimerizzazione: anelli aromatici in viola, residui

idrofobici in verde e residui polari in rosso. C) Rappresentazione schematica della struttura di TRAIL. Sono indicati i domini principali e le proprietà biochimiche e/o funzionali. NH2 indica amino-terminale; COOH, carbossi-terminale.

Table 1 Expression pattern of TRAIL and its receptors in chimpanzee and human tissues determined by immunohistochemistry

Type of tissue	TRAIL-R1		TRAIL-R2		TRAIL-R3		TRAIL	
	Chimp ^a	Human	Chimp	Human	Chimp	Human	Chimp	Human
Liver								
Hepatocytes	3 ^b	3	2	2	1	2-3	2	2-3
Bile duct epithelium	0	1-2	0	0	0	2-3	0	2
Brain								
Neurons	1-2	2-3	2	2-3	1	0-2	0	0-1
Vascular endothelium	0	0	0	0-2	0-1	2-3	0	0
Kidney								
Glomeruli	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubuli contorti	1	2	0	1	0	0	1	2-3
Henle's loop	0	0	1	1	0	0	0	0
Heart								
Myocytes	1-2	2-3	1	1	1	2	1-2	2-3
Vascular endothelium	0	0	0	0	0	1	0	0
Colon								
Luminal epithelium	0	3	0	2	0	0	2	0-1
Crypt cells	0	1	0	2	0	0	0	0-1
Lamina propria	0	0	0	2	0	0	0	0
Lung								
Bronchial epithelium	0	1-3	0	1-3	n.e. ^c	n.e.	0	1-2
Alveolar septa	0	1	0	1-2	n.e.	n.e.	0	1-2
Vascular endothelium	0	0	0	0-2	n.e.	n.e.	0	1
Testis								
Germ cells	0	1	0	1	0	2	0	1
Sertoli cells	0	0	0	0	0	0	1-2	0
Leydig cells	1	3	0	1-2	0	3	0	3

^a Chimpanzee.

^b Staining intensity: 0, no staining; 1, weakly positive staining; 2, moderate staining; 3, strong positive staining.

^c Not evaluable.

Tabella 1. Distribuzione dell'espressione tissutale dei recettori di TRAIL nell'uomo e nello chimpanzee [23].

Il gene codificante per le proteine TRAIL è posizionato sul cromosoma 3 (3q26), copre circa 20 kbp e contiene 5 esoni. La regione promotrice, di 1.2 kbp, a monte del codone di inizio della traduzione è stata clonata ed è stato identificato il punto di inizio della trascrizione. Manca di una regione TATA box riconoscibile mentre contiene diversi siti ipotetici di binding per fattori di trascrizione. Costrutti basati sul reporter luciferasi trasfettati in cellule Jurkat indicano che la regolazione trascrizionale del locus dipende dagli interferoni

(IFNs). Infatti in seguito all'interazione degli interferoni con i loro recettori, i fattori di trascrizione STAT si legano agli elementi *cis* nel promotore umano di TRAIL, denominati ISRE, (figura 3) inducendo l'attività trascrizionale del gene [12].

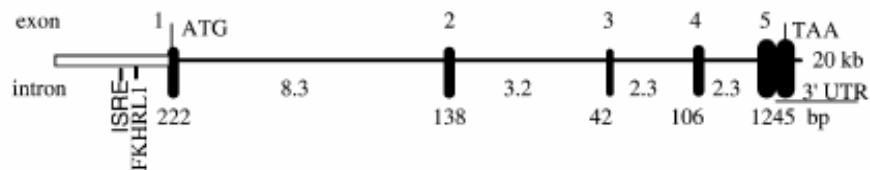


Figura 3. Struttura del gene umano codificante per TRAIL e della sua regione regolatoria in 5'. La sequenza, di 20 kbp, contiene cinque esoni (kbp) e quattro esoni (bp). Sono indicati i codoni di inizio (ATG) e di fine (TAA) della trascrizione. Le barre verticali rappresentano gli esoni, mentre il box specifica il promotore. Tra i diversi siti ipotetici di binding per fattori di trascrizione gli elementi ISRE e FKHL1 probabilmente sono importanti per la regolazione dipendente da IFN e FOXO. Viene indicata infine la regione 3'-UTR, che può contribuire alla regolazione dell'espressione del gene.

Contrariamente agli altri membri della famiglia del TNF, la cui espressione è transitoria, finemente regolata e ristretta alle cellule attivate, livelli significativi di TRAIL sono stati riscontrati in diversi tessuti umani quali milza, prostata, polmoni, timo, rene, intestino, ovaio e, a livelli inferiori, nel cuore, nel tessuto muscolare scheletrico, nel pancreas, nel fegato, nel cervello e nel testicolo [10, 16]. Questo dato suggerisce che la citochina non esercita una funzione citotossica per la maggior parte dei tessuti *in vivo* in normali condizioni fisiologiche. Tuttavia, in condizioni infiammatorie, dati ottenuti su topi *knock-out* per TRAIL suggeriscono che TRAIL può indurre l'apoptosi di cellule parenchimali [9].

Inoltre, la proteina è stata identificata nei sinciziotrofoblasti della placenta del primo trimestre di gravidanza e nelle cellule mesenchimali placentali, denominate anche cellule di Hofbauer. La presenza di TRAIL è stata dimostrata inoltre sulla

superficie dei globuli bianchi T (CD4+ e CD8+) e B attivati [17], così come nelle cellule natural killer, nei macrofagi, nelle cellule dendritiche, dove funziona come molecola effettrice mediando citotossicità antitumorale e sorveglianza immunologica, e in cellule mononucleate purificate da campioni di midollo osseo [18]. Infine, studi più recenti indicano che una forma solubile di TRAIL viene secreta da monociti stimolati con lipopolisaccaride [19] e da cellule T in risposta a stimoli mitogenici [20].

Tra le diverse funzioni esercitate da TRAIL, sia la componente integrale di membrana sia le forme solubili di TRAIL, a differenza del CD95L e del TNF- α , inducono rapidamente l'apoptosi in molte linee cellulari trasformate e in cellule tumorali, mentre le cellule normali sono resistenti [11]. L'apoptosi, o morte cellulare programmata, rappresenta il meccanismo chiave che permette agli organismi multicellulari di regolare finemente la crescita cellulare e di prevenire processi patologici quali il cancro, l'immunodeficienza, l'autoreattività.

Studi effettuati su topi knockout per TRAIL dimostrano che questi sono vitali, fertili e non presentano difetti ematologici, suggerendo che questo ligando di morte non esercita una funzione essenziale per lo sviluppo. Inoltre topi deficitari di TRAIL sono più suscettibili a metastatizzazione tumorale rispetto ai topi wild type, indicando un ruolo importante di TRAIL nella sorveglianza immunitaria specialmente contro l'evoluzione metastatica dei tumori [21, 22].

I recettori di TRAIL

L'effetto biologico di TRAIL viene mediato dall'interazione con specifici recettori cellulari di membrana.

L'unità base dei recettori consiste di tre molecole che vengono legate da un ligando trimero; la trimerizzazione del recettore può essere indotta dal legame del ligando, come nella maggior parte dei casi, oppure essere preesistente. Alcuni

recettori, in seguito all'interazione con la citochina, non trasmettono alcun segnale intracellulare, ma agiscono come recettori decoy che competono con gli altri recettori per legare la proteina [2].

Molti studi hanno dimostrato una notevole complessità di espressione e di funzione dei recettori per TRAIL. Nell'uomo sono stati descritti almeno 5 diversi recettori appartenenti alla famiglia del TNF-R, espressi su diverse tipologie cellulari. TRAIL-R1 (DR4) e TRAIL-R2 (DR5) trasducono segnali di apoptosi dopo il legame con TRAIL, mentre TRAIL-R3 (DcR1) e TRAIL-R4 (DcR2), come l'osteoprotegerina (OPG), sono omologhi di DR4 e DR5 nel loro dominio extracellulare, ma privi del dominio di morte intracellulare e quindi incapaci di indurre morte cellulare [1, 24, 25].

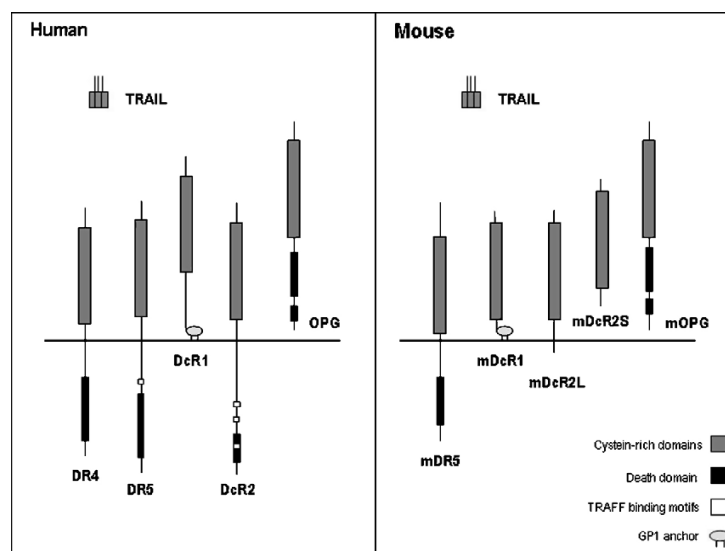


Figura 4. Schema riassuntivo delle interazioni ligando-recettore di TRAIL nell'uomo e nel topo. DR4, DR5 e mDR5 contengono domini di morte intracellulari e il legame con il ligando può determinare apoptosi. DcR2 contiene un dominio di morte troncato. DcR1 e mDcR1 sono recettori ancorati tramite Gp1. mDcR2 ha due varianti, che consistono nella forma intramembranosa (long, L) o nella forma secreta (short, S) [28].

TRAIL-R1 (DR4/TNFRSF10A) è stato il primo recettore clonato. Ed è una

proteina transmembrana di tipo I di 468 aminoacidi contenente nella regione citoplasmatica un dominio di morte, detto TRADD, simile a quello presente nel TNF-R1 e in Fas. Subito dopo la scoperta del recettore TRAIL-R1, diversi gruppi hanno identificato un secondo recettore per TRAIL denominato TRAIL-R2 (DR5/TNFRSF10B). Analogamente a TRAIL-R1, TRAIL-R2 è una proteina transmembrana di tipo I di 411 aminoacidi contenente un dominio citosolico di morte. La funzione più nota di questi due recettori è indurre una risposta apoptotica in seguito all'interazione con TRAIL in diversi tipi di linee cellulari trasformate e in cellule tumorali; per questo motivo essi sono anche denominati recettori di morte [26]. Mentre TRAIL-R1 viene attivato in risposta sia a TRAIL solubile che di membrana, TRAIL-R2 dovrebbe rispondere esclusivamente alla proteina TRAIL ancorata in membrana o cross-linkata [29, 30]. Queste molecole recettoriali esercitano comunque anche altre funzioni non apoptotiche, come gli altri membri della famiglia del recettore del TNF [31].

TRAIL-R3 (DcR1/TNFRSF10C) è stato il terzo recettore identificato in grado di legare TRAIL. È una proteina di 299 aminoacidi che manca di una regione intracitoplasmatica ed è ancorato alla superficie cellulare mediante un glicolipide legato al C-terminale; in origine è stato proposto operare come un recettore antagonizzante decoy per i recettori contenenti il dominio di morte. Analogamente a TRAIL-R1 e TRAIL-R2, esso presenta due domini ricchi in cisteine nella parte extracellulare. Infine TRAIL-R4 (denominato anche DcR2/TNFRSF10D) è stato il quarto recettore per TRAIL clonato. Sebbene presenti un segmento transmembrana, esso contiene un dominio di morte nella regione intracitoplasmatica troncato, che lo rende inefficiente nel trasdurre i segnali intracellulari. Come TRAIL-R3, TRAIL-R4 dovrebbe quindi funzionare come recettore decoy e regolare negativamente la citotossicità dipendente da TRAIL [26].

I geni codificanti per questi recettori di TRAIL sono localizzati in uno stretto cluster genico sul cromosoma 8 p21-22, suggerendo che derivano da un gene ancestrale comune e che la loro espressione potrebbe venire regolata mediante meccanismi simili [32, 33]. Diversi ricercatori infatti hanno verificato che p53 e

NF- κ B up-regolano la trascrizione di tutti i quattro recettori [34-39].

Infine il quinto recettore per TRAIL è costituito dall'osteoprotegerina (OPG), un membro della superfamiglia dei recettori del TNF che viene rilasciato in circolo come glicoproteina solubile [27]. OPG è una proteina di 481 aminoacidi il cui locus si trova sul cromosoma 8 in posizione q23-24 [40].

L'azione principale di OPG è l'inibizione dell'attività degli osteoclasti che viene indotta dall'attivatore del recettore del ligando di NF- κ B (RANKL), prevenendo l'interazione di questa proteina con il rispettivo recettore, denominato recettore attivatore di NF- κ B (RANK) [26].

Tuttavia OPG può anche interagire con TRAIL, con una affinità paragonabile a quella dei recettori transmembrana TRAIL-R3 and -R4 [9, 17].

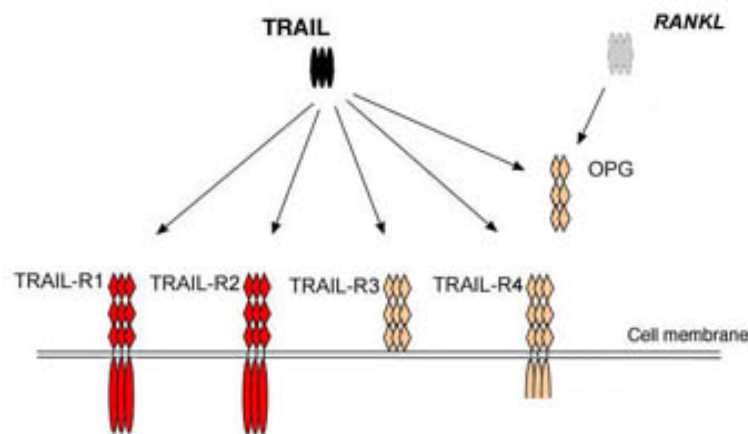


Figura 5. Rappresentazione schematica dei recettori di TRAIL. TRAIL lega i due recettori di morte TRAIL-R1 e TRAIL-R2 con affinità più elevata rispetto ai due recettori decoy TRAIL-R3 e TRAIL-R4 e al recettore solubile OPG.

I livelli relativi di espressione dei recettori di morte e dei recettori decoy potrebbero rappresentare un meccanismo potenziale mediante cui le cellule sono resistenti a TRAIL, ma questa ipotesi non può essere definitivamente confermata perché i profili di espressione di queste proteine molto frequentemente non correlano in modo inequivocabile con la resistenza o la sensibilità a TRAIL [41, 12, 33, 42]. Infatti l'espressione dei recettori decoy era inizialmente pensata

ristretta esclusivamente alle cellule normali, dove avrebbero avuto il ruolo di sequestrare selettivamente TRAIL e quindi di bloccare la sua azione sui recettori di morte e assente sulle cellule tumorali mantenendole così, suscettibili alla morte indotta da TRAIL [43, 44]. Al contrario, studi effettuati su numerose linee cellulari normali e tumorali non sono stati in grado di identificare una correlazione definitiva tra l'espressione dei recettori di TRAIL, sia a livello di messaggero che di proteina, e la protezione o la suscettibilità alla morte cellulare [45-50]. La letteratura descrive molteplici regolatori intracellulari del sistema apoptotico, a valle dei sistemi recettoriali, che controllano la sensibilità a TRAIL, con modalità che dipendono dal tipo cellulare [42, 51]. Quindi la presenza o meno dei recettori decoy non è sufficiente per predire la sensibilità o la resistenza alla morte cellulare.

Nel topo il sistema recettoriale per TRAIL sembra essere meno complesso; è infatti presente un unico recettore di segnalazione, omologo sia al TRAIL-R1 che al TRAIL-R2 umani [52]. L'identificazione recente di recettori decoy nel topo, precisamente mDc-TRAILR1 e mDc-TRAILR2 [53], permetterà di generare ceppi di topi ingegnerizzati nei quali tali recettori siano deleti al fine di studiare definitivamente *in vivo* il loro contributo per quanto riguarda la risposta cellulare indotta da TRAIL.

La segnalazione a valle dei recettori di TRAIL

I recettori TRAIL-R1 e TRAIL-R2 trasducono nella cellula due tipi di segnali: attivano una via di morte cellulare e una via di sopravvivenza mediante il coinvolgimento di fattori di trascrizione differenti. Questi effetti così diversi dipendono dalla formazione di complessi di segnalazione distinti nei quali sono reclutate specifiche proteine adattatrici.

TRAIL induce apoptosi nelle cellule bersaglio che esprimono i recettori di morte, specificamente DR4 e DR5. Il segnale di morte viene mediato attraverso la

formazione del complesso per l'induzione del segnale di morte (DISC, death inducing signaling complex). Questo evento inizia con l'ancoraggio di FADD (Fas-associated death domain) ai domini di morte (DD) dei recettori di TRAIL attivati. Successivamente, il dominio di morte DED della proteina FADD recluta la procaspasi-8, che viene attivata mediante taglio proteolitico. La caspasi-8 così attivata, recluta le caspasi effettrici situate a valle, dando inizio al segnale di morte [33].

Anche la pro-caspasi 10 viene reclutata dal complesso DISC e può trasmettere un segnale di apoptosi in assenza della caspasi-8. Il sistema appena descritto rappresenta uno dei due pathway che attivano l'apoptosi ossia la via estrinseca, che prevede l'intervento dei recettori di morte sulla membrana cellulare. Esiste poi una seconda via che viene invece innescata da segnali interni, quali ad esempio danni al DNA, e che prevede la traslocazione di Bax ai mitocondri, con perdita del potenziale transmembrana, un evento che induce il rilascio di citocromo C nel citoplasma; qui il citocromo C si complessa con la proteina Apaf-1 per attivare la caspasi 9 e di seguito le caspasi effettrici situate a valle [54, 55].

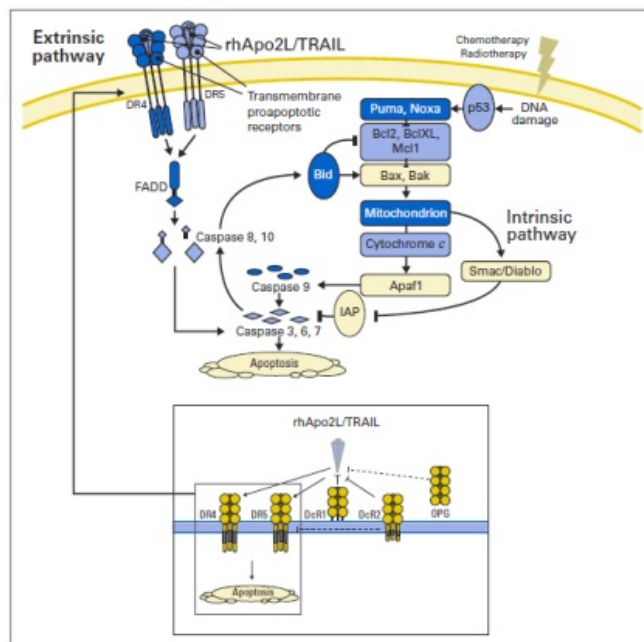


Figura 6. Rappresentazione delle vie di trasduzione del segnale di morte attivate

dai recettori TRAIL-R1/DR4 e TRAIL-R2/DR5.

Studi recenti hanno dimostrato che il sistema di TRAIL esercita anche importanti funzioni anti-apoptotiche, mediante l'attivazione di differenti vie di sopravvivenza e proliferazione, quali NF- κ B, Akt/NOS, MAPK/ERK [47, 49, 67, 59]. Tale attivazione sembra essere dipendente dal tipo cellulare. Le vie di segnalazione per l'attivazione di fattori di trascrizione iniziano con il reclutamento di proteine adattatrici comuni: innanzitutto il dominio di morte del recettore di TRAIL lega la regione omologa della proteina TRADD, la quale a sua volta agisce come punto di ancoraggio al complesso di segnalazione della proteina RIP (receptor interacting protein). Infine quest'ultima recluta TRAF-2, risultando nell'attivazione sia della via mediata da JNK (c-Jun NH₂-terminal kinase) sia della via di NF- κ B [33]. Non è chiaro se l'attivazione del fattore di trascrizione c-Jun media principalmente segnali pro- o anti-apoptotici.

TRAIL, DR4 e DR5 possono attivare il fattore NF- κ B mediante l'attivazione delle proteine inibitorie I κ B: inducono infatti le I κ B chinasi (IKK) che fosforilano I κ B, determinandone la degradazione, con conseguente rilascio delle proteine NF- κ B/Rel dal complesso inibitorio e traslocazione al nucleo. L'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B in origine è stata ipotizzata essere secondaria all'induzione del segnale apoptotico da parte dei recettori TRAIL-R1 e TRAIL-R2, come meccanismo cito-protettivo che spegne il segnale di morte mediante la up-regolazione di geni anti-apoptotici [56]. Un articolo recente ha dimostrato al contrario che la capacità di TRAIL di attivare NF- κ B è inefficace nel proteggere cellule sensibili a TRAIL dalla morte. D'altro canto, la pre-attivazione di NF- κ B è in grado al contrario di conferire resistenza al segnale apoptotico mediato dai recettori DR4 e DR5 [61]. Alcuni dati suggeriscono che anche il recettore DcR2 può attivare NF- κ B e la conseguente up-regolazione di geni anti-apoptotici può antagonizzare il segnale di morte indotto dai recettori DR4 e DR5 [60, 62] o, alternativamente, mediante il dominio intracellulare, può essere in grado di depletare la cellula di adattatori citoplasmatici per prevenirne l'interazione con i recettori di morte [44]. Ciò suggerisce che anche alcuni meccanismi intracellulari

possono esercitare una potenziale funzione decoy. A ulteriore conferma, sono note altre proteine, come c-FLIP (cellular-FLICE-like inhibitory protein) e le proteine IAP (inhibitors of apoptosis proteins) e Bcl-2, in grado di modulare negativamente il segnale apoptotico mediato da TRAIL [48, 63].

Ruoli biologici di TRAIL

Tra le attività fisiologiche di TRAIL *in vivo*, diversi studi hanno definito la funzione di TRAIL nella sorveglianza immunitaria contro lo sviluppo dei tumori, in particolare contro neoplasie di origine ematologica [21, 22, 64, 65]. La somministrazione di un anticorpo monoclonale diretto contro la citochina infatti promuove la crescita dei tumori TRAIL sensibili, ma non dei tumori TRAIL resistenti. Interessante è stato anche notare che, nel tumore dell'ovaio e nella leucemia linfocitica cronica di tipo B, l'espressione di TRAIL è associata a una più lunga sopravvivenza. [28].

Tutte le cellule del sistema immunitario, quali linfociti T, linfociti B, cellule natura killer, cellule dendritiche, monociti, granulociti, mostrano una up-regolazione dell'espressione di TRAIL in seguito a stimoli attivatori. In particolare in risposta agli interferoni, i quali sono agenti antitumorali e antivirali molto potenti.

TRAIL è particolarmente noto proprio per la sua capacità di indurre apoptosi in diverse linee cellulari tumorali, esprimenti i recettori di morte. Infatti, attiva l'apoptosi in alcune cellule infettate da virus e nella maggior parte delle cellule trasformate, comprese numerose linee cellulari tumorali divenute resistenti alle radiazioni ionizzanti e agli agenti chemioterapici a causa di mutazioni nel gene della proteina p53, che regola il pathway apoptotico intrinseco. Tuttavia, mentre altri membri della famiglia del TNF che inducono apoptosi, quali TNF- α e FasL esercitano effetti tossici molto forti sui tessuti normali, limitandone il potenziale uso terapeutico, TRAIL induce apoptosi preferenzialmente in cellule tumorali, ma

non in cellule normali. Questo ha suggerito un suo possibile utilizzo come agente terapeutico antitumorale [66].

E' stato inizialmente proposto che l'induzione di apoptosi mediata da TRAIL preferenzialmente in cellule tumorali sia dovuta al fatto che i recettori di morte TRAIL-R1 e TRAIL-R2 sono espressi soprattutto in tali cellule, mentre i recettori decoys sono espressi preferenzialmente nelle cellule normali. Quindi la regolazione dell'apoptosi TRAIL-indotta potrebbe, almeno in parte, essere determinata dall'espressione dei recettori.

In vitro si è visto che TRAIL ricombinante induce efficacemente apoptosi in linee cellulari provenienti da numerosi tumori umani, quali leucemia, mieloma multiplo, tumore al colon, al polmone, al seno, alla prostata, al rene, al sistema nervoso centrale, alla tiroide. Inoltre TRAIL mostra efficacia non solo in modelli tumorali basati su linee cellulari, ma anche in modelli di cellule tumorali primarie isolate da pazienti e propagate brevemente *in vitro* [2]. Al contrario non sono stati registrati effetti tossici su diversi tipi di cellule umane primarie includendo fibroblasti polmonari, cellule epiteliali di colon, cellule muscolari lisce, epatociti ed osteoblasti [49, 72-74].

Per quanto riguarda l'azione di TRAIL *in vivo*, si è visto che la forma ricombinante umana della proteina iniettata continuamente nel topo promuove una potente induzione di apoptosi nelle cellule tumorali, senza una significativa citotossicità nei confronti di tessuti e organi normali [66, 67].

In modelli di topo, TRAIL ha mostrato una notevole efficacia terapeutica nei confronti di trapianti di carcinoma al colon, carcinoma al seno, mieloma multiplo e glioma. Inoltre, la combinazione di TRAIL con sostanze che danneggiano il DNA o con radioterapici può risultare in una sinergica attività antitumorale sia *in vivo* sia *in vitro* [12].

Negli ultimi tempi nuovi ruoli regolatori, che mediano segnali proliferativi e di sopravvivenza, sono stati attribuiti a questa citochina, non solo in cellule primarie normali ma anche in linee cellulari neoplastiche di origine leucemica e non. Diversi studi *in vitro* hanno dimostrato che TRAIL esercita una funzione

importante nell'emopoiesi in condizioni fisiologiche, in particolare agisce selettivamente a livello degli eritroblasti immaturi [58], mentre non ha effetti citotossici sui progenitori ematopoietici clonogenici normali [75, 76]; d'altro canto TRAIL potrebbe promuovere il differenziamento monocitico, tramite interazioni con le vie delle caspasi e di NF- κ B [16].

In accordo con un ruolo regolatorio nell'omeostasi del sistema immunitario, diversi studi hanno dimostrato che TRAIL è importante quale agente antiinfiammatori, perché inibisce l'infiammazione di origine autoimmunitaria in diverse condizioni indotte sperimentalmente, quali l'artrite reumatoide [68], l'encefalomielite [69], il diabete di tipo I [70] e la tiroidite [71]. Inoltre, la somministrazione di TRAIL rallenta significativamente lo sviluppo e l'estensione delle placche aterosclerotiche in un modello sperimentale di aterosclerosi [78].

Ulteriori studi *in vitro* hanno infine indicato un ruolo di TRAIL anche nel sistema cardiovascolare: la somministrazione di TRAIL solubile ricombinante induce infatti l'attivazione di vie intracellulari, che prevedono il reclutamento di ERK/MAPK, Akt e NF- κ B, responsabili della sopravvivenza e della replicazione delle cellule endoteliali e delle cellule muscolari lisce vascolari [47, 49, 57]. L'attivazione di queste vie di segnalazione comporta l'induzione della sopravvivenza delle cellule endoteliali, il differenziamento in strutture similtubulari in saggi in matrigel e il rilascio di ossido nitrico, il quale costituisce un mediatore chiave nella biologia vascolare, causando sia vasodilatazione che effetti antiinfiammatori [77]. Infine si deve ricordare che TRAIL solubile promuove la sopravvivenza e la crescita anche delle cellule muscolari lisce dei vasi [49].

MALATTIE LINFOPROLIFERATIVE CRONICHE

Il cancro consiste in una neoformazione di tessuto che è indipendente dal punto di vista evolutivo, funzionale e nutrizionale rispetto al tessuto normale dal quale deriva. Una condizione patologica di natura neoplastica può essere causata da mutazioni di geni che controllano la crescita cellulare, da alterazioni di natura genetica che convertono un proto-oncogene in un oncogene, da infezioni da parte di virus oncogeni. La cellula, come conseguenza di questi eventi, non riesce più a controllare nel modo corretto la propria crescita ed il proprio differenziamento [79].

Le neoplasie possono essere divise in benigne e maligne. I tumori benigni presentano un accrescimento localizzato e limitato nel tempo, sono costituiti da cellule uguali o simili a quelle del tessuto dal quale derivano e la massa tumorale benigna che si viene a formare si limita a comprimere i tessuti normali vicini. I tumori maligni hanno un accrescimento più rapido e progressivo, sono dotati di attività invasiva nei confronti dei tessuti circostanti, possono propagarsi a distanza in altri organi attraverso il torrente circolatorio (metastasi) e presentano più o meno spiccati segni di atipia cellulare rispetto all'organo dal quale provengono [79].

I tumori maligni vengono classificati in base all'origine embrionale del tessuto dal quale derivano: i carcinomi derivano da tessuti di origine endodermica o ectodermica come la cute o gli epitelii, le leucemie ed i linfomi originano dalle cellule ematopoietiche del midollo osseo (le prime proliferano come cellule singole mentre i secondi tendono a crescere come masse tumorali), mentre i sarcomi derivano da tessuti connettivi di origine mesodermica (osso, tessuto adiposo e cartilagine) [79].

Mieloma multiplo

Il mieloma multiplo (MM) è un tumore che origina nel midollo osseo, dove un singolo linfocita B, subendo un'alterazione genetica, acquisisce caratteristiche tumorali che verranno trasmesse a tutte le cellule che ne discenderanno, ovvero alle plasmacellule deputate alla produzione degli anticorpi (immunoglobuline). È stato descritto per la prima volta nel 1850 dal dottor Mac Intyre, un medico americano, ma a dargli il nome è stato il maggior esperto vivente della malattia, lo statunitense Robert Kyle, che lavora alla Mayo Clinic di Rochester negli Stati Uniti.

L'aggettivo multiplo si riferisce al fatto che le plasmacellule maligne hanno la tendenza a raggrupparsi nel midollo (raramente in altri organi e tessuti), dando origine a disseminati focolai di malattia che possono portare ad un indebolimento delle ossa. Questi focolai sono stati chiamati dai medici del secolo scorso "mielomi" perché in loro corrispondenza le ossa appaiono molto fragili, molli, di consistenza ed aspetto simile al miele.

Il mieloma è un tumore nettamente più frequente nei soggetti di sesso maschile. È una patologia molto più frequente negli anziani e infatti l'80% delle persone affette hanno un'età superiore a 60 anni. Molto raramente si manifesta in età inferiore ai 50 anni (<http://www.airc.it>).

Nel mieloma le plasmacellule assumono caratteristiche di tipo maligno, proliferano in continuazione e gradualmente tolgono spazio alle cellule normali del midollo osseo. Finché il numero delle cellule tumorali rimane contenuto, e ciò può durare anni, decenni o una vita intera, questa neoplasia non dà segni; la malattia si manifesta solo quando i linfociti B alterati cominciano a proliferare in modo incontrollato e arrivano a superare il 10% di tutti i linfociti (<http://web.tiscali.it/ematologia>).

È per questa ragione che in 1/3 dei casi la malattia viene scoperta casualmente, in occasione dell'esecuzione di esami del sangue prescritti per altro motivo. Le plasmacellule tumorali producono infatti grande quantità di una proteina anomala, chiamata immunoglobulina monoclonale, componente

monoclonale o componente M. A differenza delle immunoglobuline normali, la componente M prodotta dalle cellule del mieloma non è funzionante ed anzi interferisce con la produzione delle immunoglobuline normali, causando una particolare suscettibilità del paziente alle infezioni, peraltro dovuta anche alla leucopenia. La componente M viene riscontrata mediante un esame del sangue comunemente prescritto e chiamato elettroforesi delle proteine sieriche. Questo importante elemento diagnostico è tuttavia affiancato anche da altri elementi clinici, quali un aumento significativo del numero di plasmacellule maligne all'interno del midollo osseo, rilevabile mediante agoaspirato osteomidollare e biopsia ossea eseguiti a livello della cresta iliaca posteriore del bacino, il verificarsi di assottigliamenti, buchi o fratture nelle ossa, evidenziati con esami radiologici, la presenza della proteina di Bence Jones nelle urine. Quest'ultima è formata da una parte degli anticorpi monoclonali, ovverosia dalle catene leggere κ o λ . In rari casi, infatti, le immunoglobuline monoclonali sono formate unicamente dalle catene leggere (malattia delle catene leggere) e per questi pazienti le immunoglobuline monoclonali non sono rilevabili nel sangue, ma la presenza di proteina di Bence Jones nelle urine è abbondante (<http://www.airc.it>). La diagnosi, infine, viene in genere completata con una vera e propria batteria di esami che comprendono:

- esame emocromocitometrico completo per valutare l'esistenza di una eventuale anemia e/o leucopenia e/o piastrinopenia;
- radiografia dello scheletro per escludere la presenza di lesioni ossee causate da un eccesso di plasmacellule;
- funzionalità renale con esame urine, creatinina, azotemia, proteinuria delle 24 ore che può essere alterata a causa del deposito delle proteine monoclonali nel rene e dell'ipercalcemia;
- VES, LDH, proteina C reattiva e β -2 microglobulina che forniscono una misura indiretta della estensione e della velocità di crescita del mieloma;
- calcemia che può essere aumentata a causa di sostanze prodotte dalle plasmacellule stesse (<http://web.tiscali.it/ematologia>).

Completati gli accertamenti diagnostici, il medico può stabilire la diagnosi in base a criteri ben definiti.

Come accennato le plasmacellule maligne rilasciano anche citochine che tendono ad assottigliare il tessuto osseo normale, causando indebolimenti ossei e fratture diffuse; e per questo che molto spesso il primo sintomo del mieloma multiplo è rappresentato dal dolore osseo. Questo può interessare qualsiasi segmento dello scheletro, ma è localizzato nella maggior parte dei casi a livello delle coste e della colonna vertebrale. Evenienze particolarmente temibili sono le fratture a carico dei segmenti ossei sottoposti a carichi di lavoro continuo, come ad esempio le vertebre, fatto che può portare ad una compromissione del midollo spinale ed alla conseguente paralisi di uno o più arti (<http://www.airc.it>).

Molti pazienti hanno tuttavia sintomi molto variabili da caso a caso e combinati, quelli più frequentemente riscontrati sono: astenia e debolezza, anemia, leucopenia, piastrinopenia legate al fatto che quando le plasmacellule diventano molto numerose possono impedire la crescita delle altre cellule normali del midollo, febbre più o meno elevata ed infezioni ripetute, nausea e vomito, emorragie cutanee e delle mucose (petecchie, epistassi, gengivorragie, eccessiva quantità e durata del flusso mestruale ecc.), sudorazioni eccessive, specie notturne, diminuzione del peso corporeo (<http://web.tiscali.it/ematologia>).

La causa del mieloma multiplo è sconosciuta, come per la maggior parte delle malattie. Alcuni studi hanno dimostrato che la malattia ha una frequenza diversa nelle varie regioni del mondo e nei differenti gruppi etnici, per cui è probabile che esista una certa predisposizione genetica, ma sicuramente non è una malattia ereditaria. Oltre che negli Stati Uniti è molto frequente anche in Nuova Zelanda ed in Canada, soprattutto nel Quebec. Piuttosto raro è invece in Asia, Cina e Giappone in testa. L'Europa si colloca a metà classifica, con 3 persone colpite ogni 100.000 abitanti (<http://web.tiscali.it/ematologia>).

Molti fattori ambientali sono fortemente sospetti per avere un ruolo, se non causale, sicuramente importante nell'origine di questa malattia: esposizione a fertilizzanti, pesticidi, erbicidi, sostanze derivate dal petrolio come il benzene, virus come l'Herpes, radiazioni ionizzanti. Il mieloma multiplo è infatti più

frequente nei sopravvissuti ai bombardamenti atomici di Hiroshima e Nagasaki, specialmente nei soggetti che hanno subito l'irradiazione con le dosi maggiori, sebbene l'esposizione alle radiazioni generate dalle comuni procedure mediche diagnostiche e terapeutiche non causi la malattia.

Numerose altre sostanze chimiche cui sono esposti molti soggetti nell'ambiente di lavoro sono state implicate. Tuttavia, non tutti gli studi eseguiti sono concordi fra di loro per cui rimangono molto dubbi sulle cause del mieloma multiplo (<http://www.airc.it>).

Come per la totalità degli altri tipi di neoplasie anche per il mieloma multiplo la stadiazione è un passo fondamentale da un lato per valutare la diffusione della malattia nell'organismo e la gravità, dall'altro per prevederne l'evoluzione e stabilire il tipo di terapia migliore nel singolo caso. Esistono numerosi sistemi di stadiazione del mieloma multiplo, ma quello che si è rivelato più semplice è un sistema di stadiazione in tre stadi. Nello stadio I la massa tumorale è ancora bassa e non ha provocato complicanze gravi. In particolare in questo stadio non c'è anemia, non ci sono lesioni ossee visibili alla radiografia dello scheletro, la quantità d'immunoglobuline nel siero e/o nelle urine non è molto elevata, la calcemia è normale. La malattia in stadio I può essere completamente asintomatica ed in genere non richiede terapia specifica. Al contrario avremo uno stadio III se è presente anemia grave dovuta alla malattia e non ad altre cause, la calcemia è molto elevata, ci sono almeno tre lesioni ossee, le immunoglobuline nel siero e/o nelle urine sono notevolmente aumentate. Nello stadio II sono compresi tutti i pazienti che non soddisfano i criteri per lo stadio I o III. Ogni stadio è inoltre suddiviso in: A (se i reni funzionano normalmente) o B (in presenza d'insufficienza renale, vale a dire di creatininemia superiore a 2 mg/dl).

Per quanto riguarda la prognosi, essa dipende soprattutto dallo stadio: generalmente i pazienti sopravvivono di più e meglio se lo stadio è basso e se non c'è insufficienza renale, ma la qualità di vita dipende anche dalle complicanze e dalle eventuali malattie concomitanti, quindi è difficile prevedere l'evoluzione nel singolo caso. E anche per questo motivo che è necessario sottoporsi al follow-up periodico (<http://web.tiscali.it/ematologia>). Negli ultimi anni è diventata

sempre più importante, ai fini prognostici, una valutazione dei cromosomi delle plasmacellule. Tale tipo di analisi citogenetica può essere effettuata con uno studio in toto dei cromosomi delle cellule midollari oppure con una valutazione mirata verso determinate alterazioni genetiche (FISH). In particolare, per la loro importanza clinica, si segnalano le seguenti alterazioni genetiche:

- _ delezione di parte del cromosoma 13 (50% di casi);
- _ traslocazioni tra il cromosoma 4 ed il cromosoma 14 (15% dei casi);
- _ delezione di parte del cromosoma 17 (10% dei casi).

Queste alterazioni con particolari caratteristiche negative possono guidare i curanti ad optare per un programma di trattamento più aggressivo.

Anche la terapia del mieloma multiplo dipende essenzialmente dallo stadio e dall'età del paziente. Lo stadio I non richiede in genere alcuna terapia, almeno al momento della diagnosi. Soprattutto se il paziente è anziano, per risparmiargli gli effetti collaterali della terapia che potrebbero essere più fastidiosi dei sintomi causati dal mieloma multiplo stesso, prima di iniziare la terapia si preferisce aspettare l'eventuale progressione della malattia e l'insorgenza di una o più complicanze. E' inoltre noto che il mieloma multiplo in stadio I non progredisce sempre e in ogni caso: la progressione può essere spesso lenta ed avvenire anche dopo molti anni, durante i quali il paziente può godere di una buona qualità di vita senza rischio degli effetti collaterali dei farmaci o dell'ospedalizzazione. In pratica la terapia va riservata ai pazienti con mieloma multiplo in III stadio; a molti (ma non tutti) di quelli con malattia in stadio II ed eccezionalmente a quelli con stadio I (<http://web.tiscali.it/ematologia>).

Nella terapia del mieloma multiplo un ruolo fondamentale svolge la chemioterapia, essendo la malattia disseminata nel corpo già al momento della diagnosi. La radioterapia da sola ha un ruolo marginale, questa modalità terapeutica ha invece un importante ruolo palliativo nel trattamento ad esempio delle aree d'osteolisi specie se causa di frattura patologica e/o d'intenso dolore (<http://web.tiscali.it/ematologia>). Nella maggioranza dei casi la forma di chemioterapia più frequentemente usata e l'associazione di prednisone, un cortisonico, con un farmaco chiamato melfalan; sono somministrati per os per 4

giorni ogni 4-6 settimane. Nei pazienti più giovani (orientativamente con meno di 70 anni), il trapianto di midollo autologo con cellule staminali del sangue periferico è divenuto oramai la terapia di prima scelta, qualora le condizioni del paziente permettano di sopportare la chemioterapia ad alte dosi che precede sempre l'infusione delle cellule staminali. Negli ultimi anni la procedura è divenuta molto più sicura per il paziente, tanto che si può ripetere anche più di una volta in caso di recidiva.

Recentemente risultati promettenti sono stati ottenuti con la combinazione dell'autotrapianto seguito dal trapianto allogenico a condizionamento ridotto, il cosiddetto minitrapianto. Tuttavia anche il trapianto di midollo, riservato ai pazienti più giovani, riesce ad eliminare definitivamente il mieloma multiplo solo in un'incerta percentuale di soggetti, variabile da studio a studio, ma a quanto sembra finora, in non più del 50%.

Sorprendenti possono essere considerati invece i risultati ottenibili in circa 1/3 dei pazienti con la talidomide da sola o associata con il desametasone (un cortisonico), tanto che sono in corso studi di valutazione dell'associazione dei due farmaci come terapia di prima linea nei pazienti con mieloma multiplo. Un farmaco che è stato utilizzato in molti pazienti è l'interferone, ma l'analisi della sopravvivenza dei pazienti così trattati non ha dimostrato un sicuro e definitivo beneficio (<http://web.tiscali.it/ematologia>).

Un altro farmaco che sta suscitando grandi speranze è il bortezomib, capostipite della generazione di farmaci inibitori del proteasoma, molto spesso in associazione singola con il desametasone o doppia con desametasone e talidomide, trattamento che raggiunge una risposta clinica dell'84% nei pazienti trattati in prima linea, ma che può dare disturbi clinici anche gravi come piastrinopenia e comparsa di una neuropatia periferica.

Sicuramente negli ultimi anni le conoscenze sul mieloma multiplo sono notevolmente aumentate. I progressi si sono tradotti nella disponibilità di nuovi farmaci, nell'aumento della qualità di vita dei pazienti con mieloma e della durata della sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi dal 24% all'attuale 30% (<http://www.airc.it>). Nuovi farmaci molto selettivi sulle cellule tumorali e privi

degli effetti collaterali della chemioterapia stanno per essere autorizzati. Molte speranze poggiano inoltre sui progressi della terapia biologica. In molti centri si stanno sperimentando vaccini contro le cellule mielomatose; nuove citochine che potrebbero consentire di controllare la crescita delle plasmacellule in modo più naturale, permettendo una diminuzione dell'uso della chemioterapia o il suo completo abbandono; anticorpi in grado di neutralizzare le citochine prodotte in eccesso dalle plasmacellule; la terapia genica, con lo scopo di rinforzare le cellule normali del sistema immunitario o le altre cellule normali del midollo rendendole più resistenti all'azione tossica dei chemioterapici, cosa che consentirebbe di usare dosi maggiori di farmaci o nuovi farmaci.

Grazie all'avvento di questi nuovi farmaci e al perfezionamento dei trapianti di midollo osseo (la cui comparsa risale ai primi anni Novanta), il mieloma multiplo è entrato nel novero dei tumori che possono essere guariti o con i quali è possibile convivere mantenendo un'ottima qualità di vita per molti anni (<http://web.tiscali.it/ematologia>).

Leucemia linfatica cronica

Sulla base della cellula da cui prende origine la neoplasia le leucemie vengono comunemente distinte in mieloidi e linfoidei, inoltre dipendentemente dalla velocità di progressione della malattia le leucemie vengono comunemente distinte in acute e croniche. Nella leucemia acuta il numero di cellule tumorali aumenta più velocemente e la comparsa dei sintomi è precoce; nella cronica invece le cellule maligne tendono a proliferare più lentamente, anche se con il tempo anche queste ultime diventano aggressive e provocano un aumento delle cellule leucemiche all'interno del flusso sanguigno (<http://www.airc.it>).

La leucemia linfatica cronica (LLC) è dunque una patologia onco-ematologica, caratterizzata da un processo linfoproliferativo cronico che coinvolge linfociti B attivati. Gli elementi cellulari tipici della LLC, morfologicamente simili ai piccoli linfociti maturi e in parte funzionanti del sangue periferico, tendono ad

accumularsi progressivamente a livello di midollo osseo, sangue periferico, linfonodi e milza.

Questa patologia è più comunemente riscontrata in pazienti di età superiore ai 50 anni, ma una diagnosi più accurata identifica molti pazienti più giovani. La LLC, che risulta essere la forma leucemica più frequente negli Stati Uniti e, più in generale, nei Paesi occidentali industrializzati, è contraddistinta da maggior incidenza nel sesso maschile (57%).

Le cellule della LLC presentano solitamente una trisomia del cromosoma 12 isolata oppure associata ad altre anomalie cromosomiche. La clonalità è stata dimostrata anche dall'espressione di una singola catena leggera (κ o λ) o con la specificità dell'idiotipo immunoglobulinico. Di rado, cellule che sembrano essere di leucemia linfatica cronica possono essere di origine T o natural killer (NK); queste varietà meno comuni comprendono malattie un tempo riconosciute come T-LLC, ma attualmente definite come leucemie linfocitiche a grandi cellule granulari, leucemia a cellule T suppressor, leucemia a cellule T dell'adulto e leucemia prolinfocitica T [80].

La diagnosi di LLC si basa sull'esame obiettivo e sull'osservazione dello striscio periferico. Gli esami di laboratorio denotano la presenza di leucocitosi e le cellule maligne appaiono tipicamente come piccoli linfociti con morfologia normale apparentemente maturi, l'agoaspirato e la biopsia midollare mettono generalmente in luce una infiltrazione linfocitaria del midollo osseo superiore al 30% con cellule a fenotipo B. La coespressione in superficie di antigeni cellulari B (CD19, CD20, CD21 e CD24) con un antigene cellulare T (CD5) è di solito diagnostica di LLC. Nella maggior parte dei casi può inoltre essere dimostrata una immunoglobulina monoclonale sulla superficie cellulare, benché l'immunofluorescenza sia di solito debole.

I segni obiettivi e i sintomi della LLC sono correlati con l'infiltrazione tissutale, la citopenia periferica o l'immunosoppressione. I pazienti possono presentarsi con i segni dell'anemia, con linfoadenomegalia o con infezioni intercorrenti. La splenomegalia è raramente sintomatica e vi è epatomegalia, ma in misura molto modesta, in circa metà dei pazienti. Il decorso clinico è assai variabile e la

prognosi e direttamente correlata allo stadio ed alle variazioni strutturali molecolari. Nella LLC la conta leucocitaria varia tra 5×10^3 e 200×10^3 / mmc, con una preponderanza di linfociti di aspetto maturo. I pazienti con malattia avanzata possono presentarsi con anemia, granulocitopenia e trombocitopenia che derivano dall'infiltrazione leucemica del midollo (<http://www.airc.it>).

Particolarmente rilevanti nella pratica clinica, utili per fornire indicazioni sulla sopravvivenza e come guida alla terapia sono le due classificazioni clinico-prognostiche di Rai e di Binet: esse prendono in esame i parametri clinici correlati all'estensione della proliferazione linfocitaria periferica (linfocitosi periferica, linfadenomegalia, epatosplenomegalia) e alla compromissione secondaria dell'ematopoiesi (anemia, trombocitopenia) (<http://www.aimilano.it>).

Il sistema terapeutico maggiormente in uso è la chemioterapia, somministrata per via orale o endovenosa, o per mezzo di un catetere inserito attraverso due vertebre lombari nel caso in cui siano presenti cellule neoplastiche nel liquido cefalorachidiano. La radioterapia viene utilizzata per ridurre le localizzazioni voluminose della malattia, la compromissione di organi vitali o le lesioni ossee dolorose.

La terapia è inoltre considerata vantaggiosa in pazienti con malattia in progressione o in stadio avanzato, non allo stadio iniziale poiché il decorso della malattia è generalmente molto lento e rimandare il trattamento consente al paziente di ritardare gli effetti tossici correlati alla terapia stessa [81]. Data l'assenza di un trattamento curativo convenzionale, negli ultimi anni si è anche concretizzata la possibilità di sottoporre il paziente al trapianto di midollo. Esso viene prelevato da un donatore compatibile o anche dal paziente stesso prima di ricevere alte dosi di farmaci o radiazioni.

In ogni caso la terapia della LLC dà una risposta parziale, ma quasi mai remissione completa; tuttavia negli ultimi quarant'anni la sopravvivenza a cinque anni dalla diagnosi è molto aumentata e riguarda il 75% dei pazienti (<http://www.aimilano.it>). Probabilmente tale percentuale potrà anche essere aumentata da nuovi farmaci recentemente introdotti in clinica e indirizzati contro proteine di superficie dei linfociti leucemici: tra questi, gli anticorpi monoclonali.

Circa il 3% dei pazienti con disordini linfoproliferativi presenta la variante a cellule T oppure, ancora più raramente, una neoplasia a cellule NK: le cellule neoplastiche T solitamente, non possono essere distinte morfologicamente dalle cellule B della LLC, ma l'espressione di marcatori di cellule T è facilmente rilevata dalla citofluorimetria a flusso; la leucemia a cellule NK è positiva per il CD16 ed i relativi linfociti neoplastici sono solitamente granulati.

In conclusione è utile precisare che la LLC può essere anche classificata come un linfoma a basso grado di malignità con tendenza ad invadere il sangue periferico fin dalle prime fasi della malattia.

Nei linfomi, molti dei quali originano appunto dai linfociti B, la malattia interessa principalmente i linfonodi, la milza ed altri organi, mentre il numero di linfociti nel sangue è normale. Tuttavia, con metodiche di laboratorio, è possibile dimostrare nel sangue la presenza di cellule neoplastiche anche in molti casi di linfoma. Le somiglianze fra i due tipi di malattia sono dimostrate anche dalla possibile evoluzione clonale della LLC in linfoma vero e proprio. In questo caso si tratta di un linfoma linfocitico aggressivo (linfoma diffuso a grandi cellule) definito sindrome di Richter (<http://web.tiscali.it/ematologia>).

Linfomi maligni

I linfomi maligni, a differenza delle leucemie, sono trasformazioni neoplastiche delle cellule che risiedono principalmente nei tessuti linfatici, cioè dei linfociti. Questi spesso si accumulano nei linfonodi, causandone la tumefazione. Tuttavia i linfociti, attraverso i vasi linfatici, circolano in tutto l'organismo, perciò i linfomi sono considerati malattie sistemiche. Possono insorgere anche in sedi extranodali come milza, midollo osseo, più raramente (30% dei casi) in organi quali stomaco, intestino, cute e sistema nervoso centrale, timo nei bambini.

I linfociti tumorali non sono in grado di svolgere la loro funzione all'interno del sistema immunitario, quindi i pazienti sono più suscettibili a infezioni. Le principali varianti sono il linfoma Non-Hodgkin's (LNH) e il linfoma (o morbo) di Hodgkin

(LH), una forma tumorale meno comune. Nonostante queste due varianti tumorali infiltrino entrambe gli organi reticolo-endoteliali, sono distinte sia biologicamente che clinicamente. I linfomi Non-Hodgkin's si distinguono dai linfomi di Hodgkin in base alla derivazione cellulare, le sedi di malattia, la presenza di sintomatologia sistemica, le traslocazioni cromosomiche, la curabilità (<http://www.airc.it>).

Linfoma Non-Hodgkin's

I LNH sono un gruppo eterogeneo di malattie linfoproliferative; vengono riconosciuti circa una trentina di tipi di LNH, classificati in base al tipo di cellula tumorale o in base alla velocità di crescita (indolente o aggressivo). La maggioranza delle neoplasie linfoidi (80-85%) originano da cellule B. Sebbene si possano descrivere diverse entità cliniche e patologiche, la maggioranza dei casi di linfoma dell'età adulta rientrano nel linfoma follicolare (45%) e nel linfoma diffuso a grandi cellule B (20%), mentre per i casi dell'infanzia la forma più frequente è il linfoma di Burkitt di cui parleremo più dettagliatamente in seguito [82].

Negli Stati Uniti si osservano circa 40 000 nuovi casi di LNH ogni anno e con una progressiva tendenza all'incremento, si parla di 66.000 casi nel 2008. Sebbene il numero totale di pazienti sia relativamente limitato, se paragonato a quello di tumori solidi più comuni, i linfomi maligni sono le neoplasie più comuni nei pazienti di età compresa fra i 20 e 40 anni [83].

Nonostante vi siano stati pochi progressi nell'identificazione degli agenti che potrebbero essere coinvolti nell'indurre LNH, progressi interessanti si sono ottenuti con l'identificazione di geni potenzialmente coinvolti nella trasformazione linfomatosa. Anomalie citogenetiche sono state documentate in numerosi LNH: l'analisi delle sequenze di DNA di numerose traslocazioni cromosomiche ha evidenziato che i geni, che normalmente regolano la sintesi delle catene pesanti e leggere delle immunoglobuline, sono affiancati ai geni che regolano la normale attivazione e proliferazione cellulare. Si presume che questi oncogeni siano sotto

il controllo di quegli elementi di regolazione che in condizioni normali controllano la proliferazione e la differenziazione delle cellule B [84].

In un certo numero di patologie primitive si osserva un' aumentata incidenza nello sviluppo successivo di LNH e in misura minore del linfoma di Hodgkin. Le malattie da immunodeficienza congenita e acquisita, così come quelle autoimmuni, sono associate ad un' aumentata incidenza di linfomi. L' associazione tra immunosoppressione e induzione di LNH sembra essere convincente poiché, se l' immunosoppressione è reversibile (per esempio, farmaci immunosoppressori somministrati in maniera discontinua in seguito ad un trapianto d' organo), una parte di questi casi di linfomi regredisce spontaneamente. L' incidenza dei linfomi nell' immunosoppressione iatrogena, nell' AIDS e nelle malattie autoimmuni suggerisce fortemente l' ipotesi di una deregolazione immune che contribuisce allo sviluppo del linfoma (<http://www.airc.it>).

Alla fine degli anni Settanta erano in uso nel mondo sei schemi anatomicopatologici differenti e perciò non si è potuto fare dei paragoni tra i diversi studi terapeutici. Data questa mancanza di chiarezza fu proposta una classificazione operativa con le caratteristiche migliori delle varie classificazioni e, cosa ancor più importante, con rilevanza clinica. La classificazione operativa suddivide i LNH in tre diversi sottogruppi a basso, intermedio e alto grado di malignità, in base a diversi parametri: il grado di aggressività (più attive sono le cellule tumorali, maggiore è il grado di malignità), il sottotipo (classificato in base alle caratteristiche istologiche), lo stadio (ovvero la localizzazione e l' estensione). I linfomi a basso grado sono caratterizzati da un decorso clinico lento e la loro storia naturale non viene significativamente modificata dalla terapia. I linfomi a grado intermedio e alto erano in passato associati ad una sopravvivenza molto breve; con l' avvento di aggressive associazioni chemioterapiche e con nuovi approcci di immunoterapia, alcuni di questi pazienti con tumori di grado intermedio ed alto dimostrano una buona sopravvivenza a lungo termine libera da malattia. Il grado di aggressività è molto importante al momento della diagnosi per intraprendere la terapia corretta: ad esempio, linfomi indolenti hanno un decorso lento e spesso sono asintomatici, ma anche dopo remissione completa si

ripresentano quasi sempre; mentre linfomi aggressivi si espandono molto rapidamente e richiedono spesso intervento immediato, tuttavia rispondono molto meglio alla terapia e ci può essere guarigione totale.

I sottotipi di linfomi non-Hodgkin sono stabiliti in base alla presenza, in prevalenza, di cellule B o cellule T, al tipo di marcatori presenti sulla superficie cellulare, all'aspetto dei linfonodi aggrediti: se l'organizzazione cellulare è pressoché normale il linfoma è detto follicolare; altrimenti si parla di linfoma diffuso.

Il metodo di stadiazione dei LNH e quello di Ann-Arbor si basa sul numero di siti di localizzazione del tumore (linfonodali ed extra linfonodali) e sulla presenza o assenza di sintomi sistemici. Negli stadi I e II le localizzazioni di malattia sono poste dalla stessa parte del diaframma. Nello stadio III la malattia interessa entrambi i lati del diaframma, mentre nello stadio IV si ha un interessamento extralinfonodale, più frequentemente del midollo osseo e del fegato. Possono inoltre essere aggiunte le lettere A o B per indicare, rispettivamente, assenza o presenza di sintomi generali come febbre, sudorazione notturna, perdita di peso.

Poiché solo il 10% dei pazienti con linfoma follicolare ha malattia localizzata, molti pazienti in stadio avanzato sono trattati in modo simile. La maggioranza dei pazienti con linfoma diffuso hanno infatti malattia allo stadio avanzato e vengono perciò trattati con approccio sistemico. La stadiazione, quindi, è utilizzata nei LNH per identificare quel piccolo numero di pazienti che può essere trattato con terapia locale e per classificarlo nelle sottoclassi istologiche in modo da stabilire la prognosi e valutare il tipo di schema terapeutico.

Numerosi studi scientifici hanno preso in esame, nei LNH, la correlazione esistente tra l'espressione di marcatori della superficie cellulare e la prognosi. Sebbene molti studi abbiano trovato che il fenotipo della superficie cellulare può essere una variabile prognostica, questi studi spesso hanno fallito nella stratificazione dei pazienti per i differenti sottotipi istologici del LNH e, a dispetto dei molti tentativi di determinare se l'immunofenotipo si correla con la prognosi, questo aspetto rimane ancora controverso.

L'espressione di marcatori di superficie in relazione alla prognosi è stata esaminata in diverse casistiche. E' stata esaminata ad esempio l'espressione del recettore della transferrina (CD71), che identifica cellule proliferanti normali, ed è stato studiato un antigene nucleare espresso anche in normali cellule proliferanti, identificato dall'anticorpo monoclonale Ki-67. Recentemente, un'analisi multivariata ha riportato che in linfomi diffusi a grandi cellule questo antigene era un fattore predittivo indipendente della sopravvivenza e che pazienti con più del 60% delle cellule positive per Ki-67 avevano una sopravvivenza media significativamente più breve.

Ulteriori sforzi scientifici sono stati inoltre compiuti per correlare la linea cellulare tumorale con la risposta al trattamento ed alla sopravvivenza. Rimane controverso se la derivazione cellulare sia una variabile che influenza la prognosi, nonostante alcuni studi suggeriscano che LNH di origine T abbiano una prognosi peggiore di tumori derivati da cellule B. Saranno comunque necessari molti studi prospettici per confermare queste osservazioni.

Sebbene in generale si concordi sul trattamento dei LNH, gli approcci terapeutici per tutti i sottotipi istologici sono in continua evoluzione. Le opzioni da considerare sono l'età biologica del paziente e la presenza di eventuali comorbidità (in particolare patologie cardiache, renali, polmonari), le quali potrebbero influenzare in modo significativo la tossicità finale d'organo.

La chemioterapia, ovvero la polichemioterapia basata sulla combinazione di più farmaci, è il trattamento principale dei LNH ed è spesso associata al trapianto di midollo osseo. In caso di tumore localizzato si può ricorrere anche alla radioterapia. Al momento attuale, inoltre, il trattamento dei LNH è influenzato dall'immunofenotipo delle cellule tumorali, soprattutto per quel che riguarda i nuovi approcci immunoterapici: recentemente è stato infatti approvato l'utilizzo di alcuni anticorpi monoclonali diretti contro antigeni di superficie iperespressi sulle cellule tumorali (www.airc.it).

Linfoma di Burkitt o a piccole cellule non clivate

Il linfoma di Burkitt, descritto per la prima volta nel 1958 e incluso nei linfomi maligni dal 1962, come la maggior parte dei LNH, è una neoplasia nella quale i pazienti al momento della diagnosi mostrano una malattia a stadio già avanzato. Il linfoma di Burkitt è un tumore tipicamente pediatrico che colpisce principalmente bambini e giovani adulti caratterizzato da due principali presentazioni cliniche. La forma endemica, o africana, si presenta come un tumore ad origine mandibolare che si diffonde a sedi extralinfonodali, specialmente nel midollo osseo e nelle meningi. L'incidenza annuale è di 10 casi su 100.000 bambini. La forma non endemica, o americana, ha una presentazione addominale con malattia massiva, ascite, coinvolgimento cutaneo, osseo, linfonodale superficiale e, al pari della forma africana, con interessamento del midollo osseo e del SNC. L'incidenza annuale in questo caso è di 0,2 casi su 100.000 bambini. Negli Stati Uniti costituisce da solo il 30% dei LNH dell'infanzia. Il vero Linfoma di Burkitt è raro negli adulti, ma occasionalmente si riscontra in pazienti al di sopra dei 35 anni. La patologia rivela un alto tasso mitotico e un aspetto a cielo stellato di linfociti B maligni rapidamente proliferanti.

Nel linfoma endemico la malattia ha un grado di associazione del 95% con il virus di Epstein-Barr (EBV), mentre l'associazione è solo del 15% nella forma americana. Tuttavia è incerto se l'EBV giochi un ruolo eziologico. Il linfoma di Burkitt presenta in oltre il 90% dei casi una caratteristica citogenetica precisa: la traslocazione reciproca $t(8;14)$, con le sue varianti $t(2;8)$ o $t(8;22)$, in seguito alla quale l'oncogene *c-myc* sul cromosoma 8 viene unito o al locus delle catene pesanti delle immunoglobine sul cromosoma 14, o al locus della catena leggera kappa sul cromosoma 2, o al locus della catena leggera lambda sul cromosoma 22, portando all'attivazione e all'aumento dell'espressione del prodotto del gene *cmyc*, un fattore di trascrizione che gioca un ruolo centrale nel regolare la proliferazione cellulare così come nel promuovere, se deregolato, l'insorgenza di neoplasie [85].

SCOPO

Nel corso degli ultimi dieci anni la chemioterapia, trattamento tradizionale dei tumori, si è andata integrando con l'immunoterapia. Infatti i progressi scientifici in ambito oncologico, immunologico e biotecnologico hanno consentito l'acquisizione di nuove potenzialità terapeutiche nel campo delle malattie oncoematologiche. Tuttavia i trattamenti antitumorali utilizzati in clinica contro i linfomi non-Hodgkin (NHL) non risultano ancora definitivi; restano infatti difficoltà terapeutiche legate alle ricadute e alla malattia residua, soprattutto a livello del midollo.

Abbiamo focalizzato il nostro studio sul potenziale terapeutico del sistema del TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL, e dei suoi recettori con l'obiettivo di identificare molecole in grado di agire come agenti antitumorali, capaci di attivare meccanismi d'azione più efficaci o di potenziare quelli già sperimentati. TRAIL è infatti in grado di indurre apoptosi in cellule tumorali primarie e in diversi modelli murini di neoplasie maligne umane attraverso il legame ai recettori TRAIL-R1 e TRAIL-R2 [11, 90, 91], mentre non ha alcuna attività citotossica nella maggior parte delle cellule non trasformate [86, 87, 90]. Per questo motivo dal punto di vista clinico l'uso di forme solubili ricombinanti di TRAIL come agenti antitumorali sembra promettente per il trattamento di diverse forme neoplastiche [11].

Lo scopo del lavoro di questi tre anni è stato dunque quello di studiare e mettere a punto nuove strategie basate sull'utilizzo di TRAIL al fine di indurre preferenzialmente morte delle cellule neoplastiche che si sono dimostrate resistenti alle terapie convenzionali. A questo proposito abbiamo condotto degli studi *in vitro* e *in vivo* utilizzando la molecola di TRAIL ricombinante.

Parallelamente le nostre ricerche si sono focalizzate anche sulle potenzialità terapeutiche delle cellule staminali mesenchimali umane di midollo osseo, che sono considerate le cellule staminali progenitrici stromali a livello del midollo osseo; si tratta di cellule che vengono solitamente isolate dalla porzione aderente mononucleare di aspirati da midollo osseo. Ci siamo quindi proposti di valutare le capacità di queste cellule di esercitare attività antitumorale e i potenziali meccanismi cellulari coinvolti.

Il raggiungimento di questi obiettivi ha richiesto inizialmente lo sviluppo di un modello animale di linfoma Non-Hodgkin utilizzando topi SCID (Severe Combined Immuno Deficiency), mediante il quale indagare la disseminazione *in vivo* delle cellule tumorali e valutare le potenzialità terapeutiche di TRAIL ricombinante e delle cellule mesenchimali stromali.

RISULTATI

I. Caratterizzazione di modelli tumorali ottenuti mediante trapianti di cellule di linfoma umano BJAB ed SKW6.4 in topi SCID().

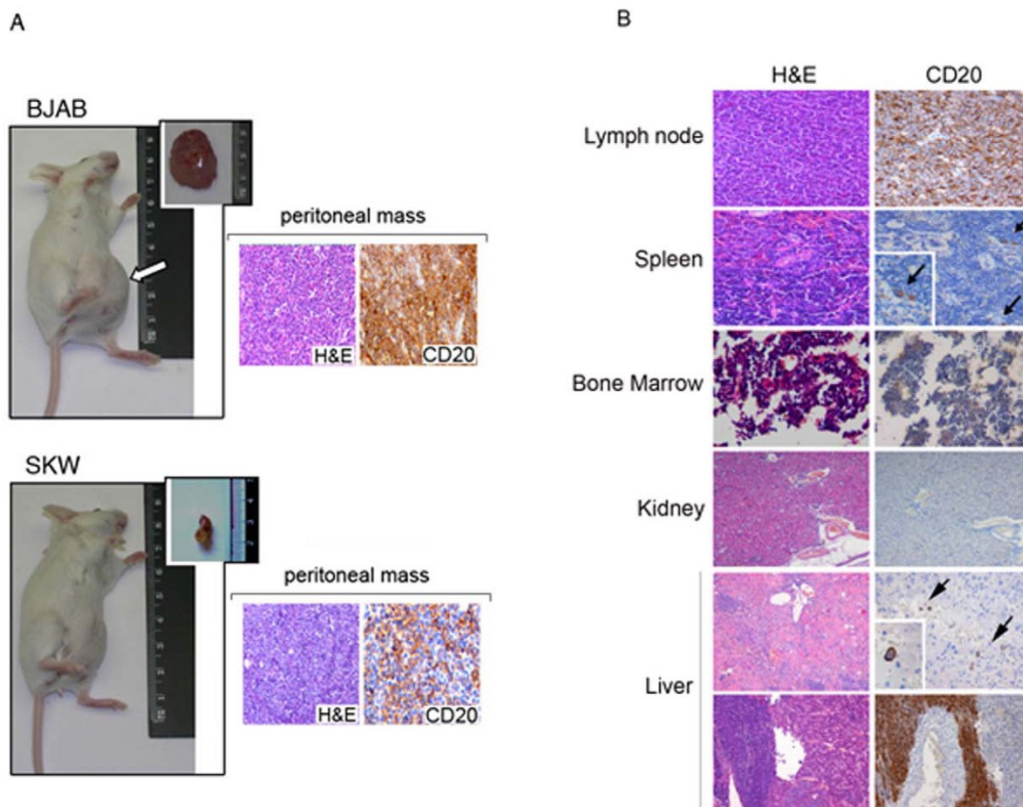
Abbiamo allestito modelli animali utilizzando topi SCID in cui sono state iniettate cellule BJAB di linfoma di Burkitt umano EBV negativo e cellule di linfoma non Hodgkin (NHL) linfoblastoide EBV positivo SKW6.4.

Le linee di cellule linfoblastoidi umane sono state espanse *in vitro*, quindi 2×10^6 cellule/topo sono state impiantate intraperitonealmente (i.p.) nel fianco sinistro dei topi SCID. I topi hanno evidenziato la formazione di una massa tumorale intraperitoneale visibile ma non troppo estesa già dopo circa 20-25 gg dall'inoculo. [92].

In particolare gli xenotrapianti di cellule BJAB dimostrano lo sviluppo di tumori nella cavità peritoneale, oltre alla presenza di disseminazioni neoplastiche in ulteriori organi inclusi i linfonodi addominali e i tessuti epatici; già dopo 18-20 giorni dall'inoculo incominciano ad essere palpabili e misurabili ad un'osservazione esterna e progrediscono stabilmente fino al sopraggiungere della morte dei topi (figura 7-A). Diversamente, negli xenotrapianti di cellule SKW6.4, la massa tumorale risulta difficilmente palpabile in qualsiasi momento dell'esperimento. L'analisi istologica delle masse peritoneali mostra che i tumori derivati sia da BJAB sia da SKW6.4 hanno una crescita costante di cellule linfoblastoidi CD20+ (figura 7-A) che risultano una disseminate in quantità variabile sia nei linfonodi sia nella milza, mentre non si evidenziano a livello del midollo osseo e dei reni (figura 7-B). Infine, entrambi i modelli murinici e in

particolare quello inoculato con SKW6.4 mostrano spesso delle infiltrazioni isolate o massicce di cellule linfoblastoidi CD20+ nel fegato (figura 7-B).

Dato interessante è stato notare che mentre le dimensioni del tumore intraperitoneale indotto dalle BJAB risultava nettamente maggiore rispetto a quello indotto dalle SKW6.4. Nei topi xenotrapiantati, la mediana di sopravvivenza era significativamente più corta ($p < 0,001$) nel modello inoculato con SKW6.4 (27 giorni) rispetto a quello inoculato con BJAB (47 giorni; figura 7-C) [92].



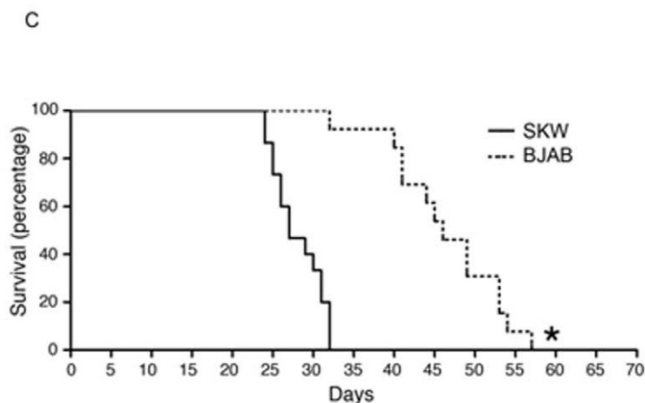


Figura 7. Caratterizzazione di modelli di xenotrapianto di cellule BJAB ed SKW6.4. Topi SCID sono stati inoculati i.p. con 2×10^6 cellule. A) I trapianti con cellule BJAB, a differenza di quelli di cellule SKW6.4, danno origine a tumori peritoneali misurabili mediante osservazione esterna. Le frecce indicano la massa tumorale visibile esternamente. Nell'inserito sono mostrate sezioni tissutali delle masse peritoneali ottenute mediante colorazione istologica con ematossilina ed eosina e con anticorpo anti-CD20+ (ingrandimento originale 20X). B) Analisi istopatologica di sezioni di tessuto necrotico ottenuto da xenotrapianti SKW6.4 che mostrano infiltrati di cellule linfoide umane CD20+: massivi (linfonodi e fegato), isolati (milza e fegato, evidenziati dalle frecce), assenti (rene e midollo osseo) (ingrandimento originale 20X). C) Analisi mediante il metodo di Kaplan-Meier della sopravvivenza dei modelli murini dopo trapianto. La percentuale di sopravvivenza di topi iniettati con cellule BJAB (n=15) o SKW6.4 (n=15) viene misurata a partire dal giorno dell'inoculo fino alla morte. Asterisco, $p < 0.01$. [92].

II. Trattamento di topi SCID xenotrapiantati con TRAIL ricombinante (rTRAIL).

La caratterizzazione della funzionalità *in vitro* di TRAIL è stata precedentemente eseguita dal nostro gruppo di ricerca ed i risultati ottenuti dimostrano che rTRAIL ha una buona capacità di indurre l'apoptosi in differenti

linee tumorali, ovvero in linfoblastiche quali le SKW6.4 e le BJAB, in cellule di leucemia mielocitica acuta HL-60 e in cellule di leucemia promielocitica MOLM13 [78].

Sulla base dei dati presenti in letteratura e degli esperimenti portati a termine *in vitro* ho sviluppato un protocollo per i trattamenti *in vivo*. Una volta effettuato lo xenotrapianto, con cellule BJAB o alternativamente con cellule SKW6.4, i topi SCID nei quali si è sviluppato il tumore, sono stati trattati con la proteina ricombinante rTRAIL mediante inoculo intraperitoneale (i.p.) nel fianco destro, ovvero dalla parte opposta rispetto alla regione in cui sono state precedentemente impiantate le cellule linfoblastoidi.

Nel dettaglio lo schema del trattamento per ciascun gruppo di topi è presentato in Tabella 2.

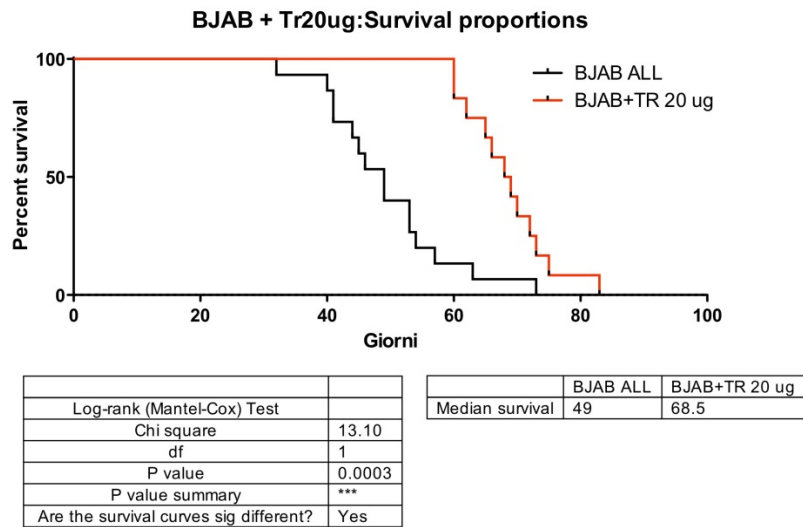
LINEA CELLULARE	QUANTITA' SOMMINISTRATA	VIA DI SOMMINISTRAZIONE	GIORNI DI TRATTAMENTO*	TOTALE SOMMINISTRAZIONI
SKW6.4	20 µg/topo/die	i.p.	4°-5°-6°-7°-8° 11°-12°-13°- 14°-15°	10
BJAB	20 µg/topo/die	i.p.	4°-5°-6°-7°-8° 11°-12°-13°- 14°-15°	10

Tabella 2. Schema di trattamento adottato per gli esperimenti con rTRAIL.

* Il conto dei giorni inizia a partire dal giorno di inoculo del graft tumorale che è il giorno 1.

Tutti i trattamenti sono iniziati a partire dal quarto giorno dopo l'inoculo, con l'obiettivo di garantire che intercorra un tempo sufficiente a permettere l'impianto e la disseminazione del tumore prima di iniziare la potenziale terapia. Sono stati effettuati due cicli di trattamento, ciascuno dei quali prevedeva cinque somministrazioni ciascuna da 20 µg di rTRAIL con un intervallo di due giorni. I risultati ottenuti, in termini di giorni di sopravvivenza e percentuale degli animali trattati, sono rappresentati nelle figure 8A e 8B, relative rispettivamente agli xenotrapianti di cellule BJAB e SKW6.4.

A



B

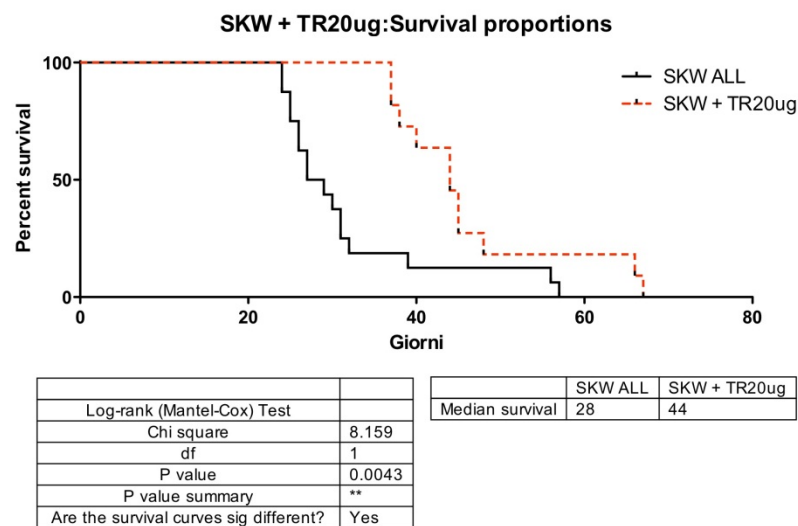


Figura 8. Curve di sopravvivenza dei topi SCID inoculati i.p. 2×10^6 cellule BJAB (in A) ed SKW6.4 (in B) trattati con rTRAIL 20 $\mu\text{g}/\text{topo}/\text{die}$. Le differenze di sopravvivenza tra i gruppi trattati sono state analizzate utilizzando la curva di Kaplan-Meier. I p value sono stati calcolati utilizzando il log-rank test; le differenze sono state considerate significative per p value < 0.001. Nel gruppo di controllo, rappresentato in nero, gli animali non hanno ricevuto alcun trattamento.

Come si nota dai grafici riportati nella figura 8 il trattamento con rTRAIL alla dose di 20 $\mu\text{g}/\text{topo}/\text{die}$ aumenta significativamente il tempo di sopravvivenza degli animali trattati rispetto ai controlli sia dopo xenotrapianto con cellule BJAB

($p < 0.0003$) che con cellule SKW6.4 ($p < 0.0043$). È interessante notare che l'efficacia del trattamento, espressa in termini di sopravvivenza dei topi, è maggiore per la linea tumorale BJAB, derivata da un linfoma non-Hodgkin di Burkitt EBV negativo, a parità di condizioni sperimentali e di dosaggio, rispetto alla linea tumorale SKW6.4, derivata da un linfoma non-Hodgkin linfoblastoide EBV positivo, più aggressivo.

Gli animali che non hanno ricevuto alcun tipo di trattamento e che sono stati utilizzati quindi come controlli hanno sviluppato una massa intraperitoneale chiaramente visibile dopo circa 18-20 giorni dall'inoculo delle BJAB e delle SKW6.4 rispettivamente, mostrano una sopravvivenza media di circa 49 e 28 giorni, mentre gli animali trattati con rTRAIL mostrano una sopravvivenza media di 68.5 giorni per BJAB+rTRAIL e di 44 giorni per SKW6.4+rTRAIL.

III. Trattamento di topi SCID xenotrapiantati con cellule staminali mesenchimali umane provenienti da midollo osseo (BM-MSC).

Successivamente, ho studiato nei nostri due modelli disseminati di linfoma Non-Hodgkin i potenziali effetti terapeutici derivati dalla somministrazione di cellule staminali mesenchimali (MSC) derivanti da midollo osseo (BM). A tale scopo, come precedentemente valutato utilizzando rTRAIL, mi sono inizialmente focalizzato sui livelli di sopravvivenza dei topi SCID precedentemente inoculati intraperitonealmente con cellule BJAB o con cellule SKW6.4. [92].

L'iniezione di BM-MSC è stata effettuata 4 giorni dopo il trapianto tumorale; ho inoculato un quantitativo di cellule mesenchimali in rapporto di 1:10 rispetto alle cellule tumorali. Un gruppo di topi è stato inoculato con le sole MSC e utilizzato come controllo.

I miei risultati dimostrano che l'inoculo delle MSC non esercita alcun effetto tossico all'interno del gruppo di controllo; al contrario, il trattamento con MSC prolunga in maniera significativa la sopravvivenza in entrambi i modelli murini di linfoma ($p < 0,01$) (figura 9-A). Da notare che, aumentando la quantità di cellule inoculate fino ad un rapporto di 2:1 cellule tumorali: MSC, non aumenta la sopravvivenza totale e quindi l'efficacia terapeutica delle cellule mesenchimali (dato mostrato solo per l'inoculo con cellule BJAB, figura 9-B) [92].

Il risultato più importante di questo esperimento è stato osservare che una singola iniezione di cellule MSC, in rapporto di 1:10 rispetto alle cellule tumorali, porta ad una sopravvivenza significativamente maggiore degli animali sia inoculati con BJAB sia con SKW6.4. Questo dato è particolarmente rilevante in quanto i modelli murini di xenotrapianto intraperitoneale, dando origine a tumori disseminati, sono più rilevanti in termini clinici di quelli sottocutanei utilizzati nei precedenti studi [92].

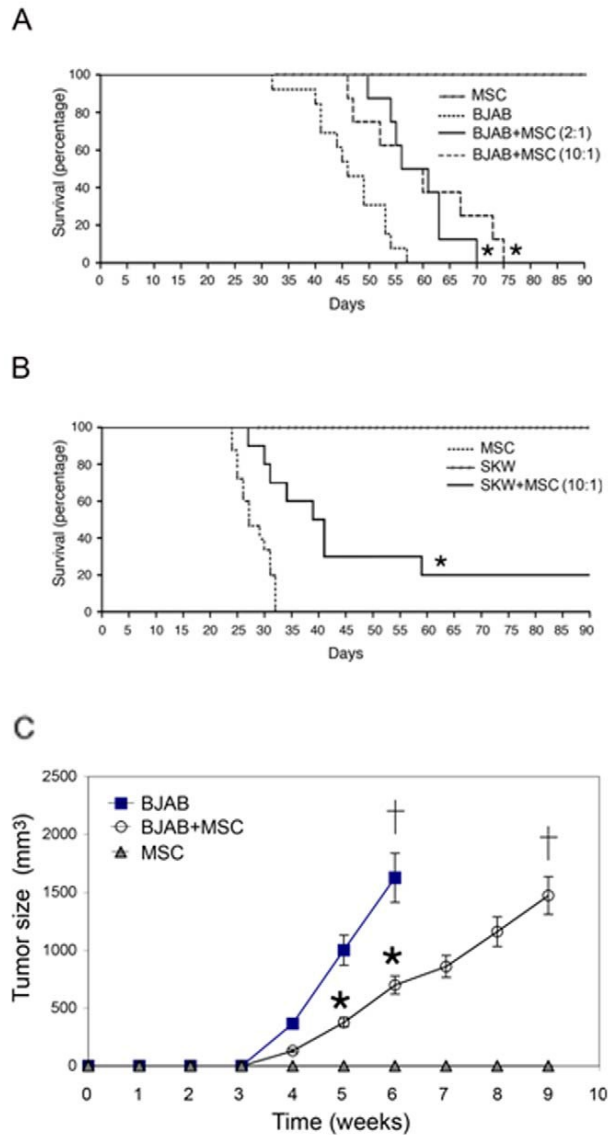


Figura 9. L'inoculo di BM-MSC prolunga la sopravvivenza di topi xenotrapiantati. I topi sono stati inoculati intraperitonealmente sia con BJAB (n=10) sia con SKW6.4 (n=10) e dopo 4 giorni con cellule mesenchimali in rapporto 1:10 rispetto alle tumorali. Come controllo, un gruppo di topi (n=10) è stato inoculato con le sole MSC. L'analisi di sopravvivenza dei modelli murini di NHL, confrontati con la sopravvivenza dei topi inoculati con BJAB+MSC (A) o SKW6.4+MSC (B) è stata eseguita con il metodo di Kaplan-Meier. In (A) viene anche mostrato il grafico della sopravvivenza dei topi xenotrapiantati con cellule BJAB e trattati con MSC in rapporto di 1:2 rispetto alle cellule tumorali (n=10). La percentuale di sopravvivenza è stata misurata dal

giorno di inoculo del tumore fino al sopraggiungimento della morte (*= $p < 0,05$). C) I tumori peritoneali sono stati misurati ogni settimana, fino al decesso, come descritto nei Materiali e Metodi. I risultati sono la media \pm SD (*= $p < 0,05$) [92].

Poiché il modello tumorale murino generato mediante inoculo di cellule BJAB permette di misurare più accuratamente la massa peritoneale attraverso l'ispezione esterna rispetto ai topi xenotrapiantati con cellule SKW6.4, le analisi successive sono state quindi svolte principalmente sul primo modello di xenotrapianto (caratteristiche simili dal punto di vista istopatologico sono state comunque osservate anche nel modello con SKW6.4). Ho inizialmente valutato l'effetto del trattamento con cellule mesenchimali sullo sviluppo del tumore nel tempo, riscontrando che tale trattamento comporta un significativo ($p < 0,05$) ritardo nella crescita della massa tumorale nei topi inoculati con BJAB+MSC rispetto al gruppo di controllo (figura 9-C) [92].

Successivamente è stata eseguita l'analisi istopatologica del tessuto tumorale il quale evidenzia caratteristiche ben distinte tra le masse sviluppate dai topi inoculati con le sole cellule tumorali e quelli inoculati BJAB/SKW6.4+MSC. Come mostrato in figura 10, negli xenotrapianti di NHL l'inoculo di MSC non solo ritarda lo sviluppo delle masse tumorali peritoneali, ma, come evidenziato dall'analisi necroscopica, esistono significative differenze a livello istologico per quanto riguarda le masse tumorali nelle masse sviluppate in presenza o assenza di cellule MSC. Mentre le linee tumorali BJAB o SKW6.4 sviluppano masse peritoneali che mostrano lo stesso scarso network capillare che si riscontra nei tumori di tipo Non-Hodgkin umani [92], dove si riscontrano a masse tumorali compatte circondate da una scarsa matrice stromale (evidenziato dalla colorazione tricromica di Masson, specifica per le fibre interstiziali), la presenza di MSC promuove un esteso aumento di cellule α -sma+, ossia di cellule miofibroblastiche, e di cellule endoteliali CD31+ a livello dei compartimenti stromali. Inoltre, si osservano un numero maggiore di aree di necrosi intra-tumorali nei topi trattati con MSC (evidenziato mediante colorazione con ematossilina ed

eosina) e una massa tumorale di minor entità rispetto al gruppo di controllo inoculato con le sole cellule tumorali [92].

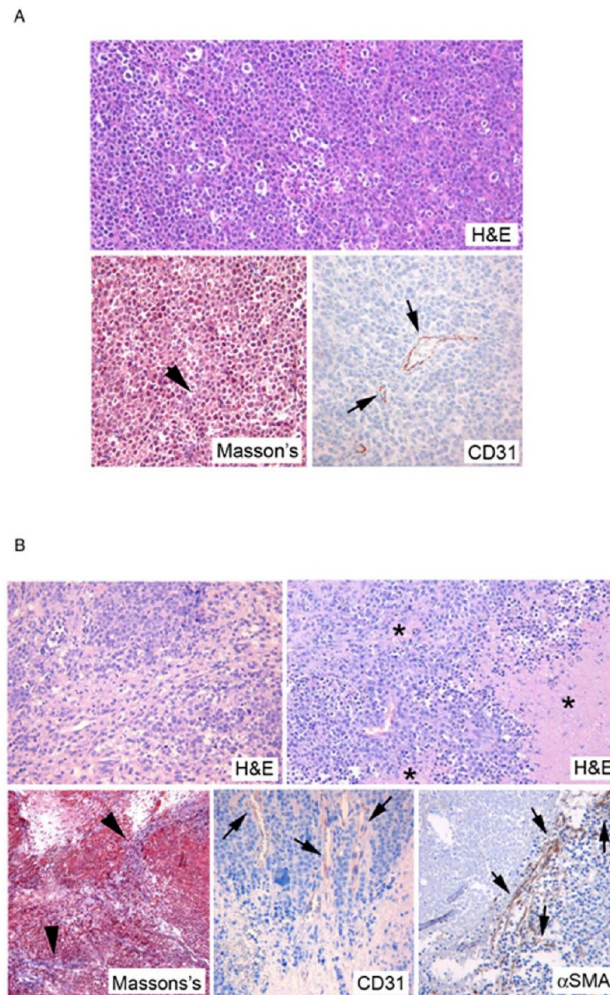


Figura 10. Sezioni tissutali derivanti da masse tumorali di topi trapiantati con cellule di linfoma B2B, trattati (B) o non trattati con cellule MSC (A). I tessuti sono stati analizzati dopo colorazione con ematossilina ed eosina (E&E) e Tricromica di Masson; l'analisi immunofenotipica è stata eseguita con anticorpi anti-CD31 o anti- α -SMA, come indicato. Nelle colorazioni con E&E gli asterischi indicano piccoli foci di necrosi all'interno delle masse tumorali (B). Nelle colorazioni tricromatiche di Masson, le fibre di collagene sono colorate in blu; il network stromale risulta sottile e poco appariscente in A, mentre acquisisce una architettura più diffusa e spessa in B. Le

cellule endoteliali CD31⁺ e quelle α -sma⁺ mio-fibroblastiche sono colorate in marrone (freccie in A e B). (Ingrandimento originale 20X) [92].

In conclusione, da questi esperimenti si è potuto dedurre che nei trattamenti *in vivo* l'effetto positivo delle MSC sulla sopravvivenza di topi xenotrapiantati si esplica mediante la regolazione in maniera significativa del network stromale, incrementando il numero di cellule α -sma⁺ ed inducendo necrosi intra-tumorale, con conseguente riduzione della crescita della massa tumorale [92].

IV. Trattamento di modelli di topi SCID xenotrapiantati con BM-MSC incorporate in matrici di acido ialuronico.

Successivamente ho valutato l'effetto delle MSC derivate da midollo osseo confinate in scaffold di matrici di acido ialuronico (HYAFF-11) in un modello di NHL disseminato, generato dopo iniezione intraperitoneale in topi SCID (n=20) di cellule SKW6.4 [96].

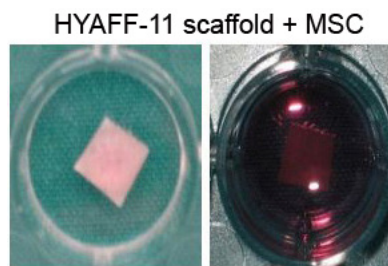
Gli scaffold di ialuronato sono stati preparati risospendendo 8×10^5 cellule MSC/cm² in 30 μ l e, seminando tali cellule sopra matrici di HYAFF-11, un materiale derivato dall'esterificazione di acido ialuronico con alcool benzilico, per ottenere infine un polimero lineare insolubile in soluzione acquosa. Dopo dieci giorni di incubazione le garze erano pronte per poter procedere con l'impianto *in vivo*.

Una volta inoculati i topi sono stati suddivisi in due gruppi: uno di controllo e l'altro in cui è stata impiantata la garza di HYAFF-11, in cui sono state incorporate le MSC. L'impianto della matrice è stato effettuato 4 giorni dall'inoculo delle cellule SKW6.4 sul lato addominale opposto rispetto all'iniezione delle cellule tumorali SKW6.4, al fine di limitare il contatto diretto tra le cellule mesenchimali

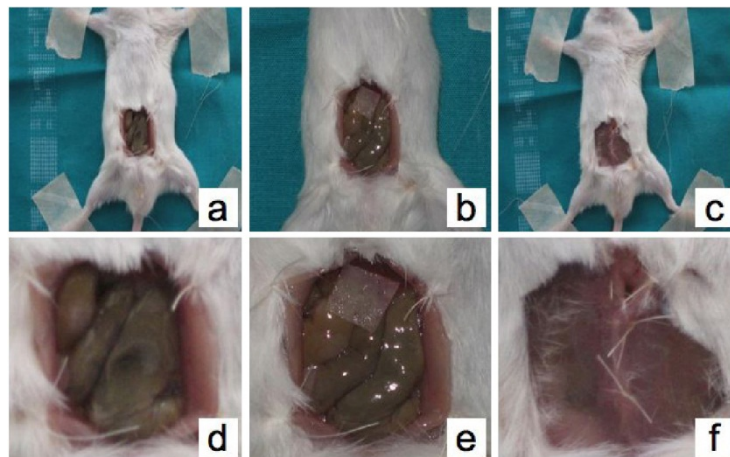
e le cellule di linfoma. La posizione anatomica scelta per l'intervento chirurgico è compatibile con una possibile applicazione clinica [96].

Come negli esperimenti precedenti, è stata calcolata la sopravvivenza dei topi a partire dal giorno in cui è stato effettuato l'inoculo delle cellule tumorali fino alla morte, mediante il metodo di Kaplan-Meier. La sopravvivenza di topi inoculati nei quali sono stati impiantati gli scaffold di MSC è risultata significativamente superiore rispetto al gruppo di controllo, con un valore medio di sopravvivenza rispettivamente di 39.5 giorni rispetto a 27 giorni ($p < 0.05$) (figura 11) [96].

A



B



C

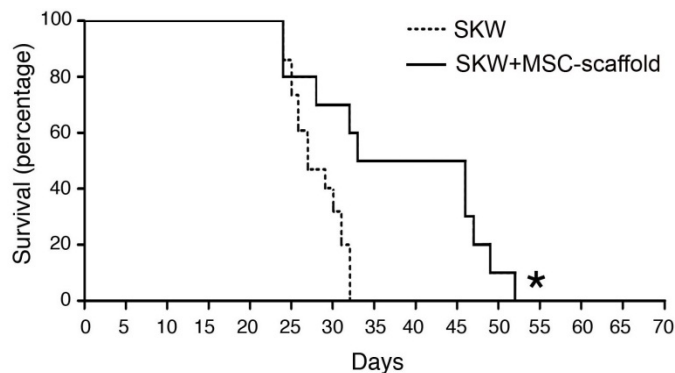


Figura 11. Le cellule mesenchimali staminali inglobate in uno scaffold di ialuronato aumentano la sopravvivenza di topi xenotrapiantati. A) Le MSC sono state seminate su una matrice HYAFF-11 (pannello a sinistra) e coltivate fino a 10 giorni prima dell'impianto (pannello a destra). B) Impianto *in vivo* di MSC incorporate in uno scaffold HYAFF-11: (a, d) immagine della sacca ottenuta sotto la cavità addominale; (b, e) immagini dell'impianto dello scaffold in situ; (c, f) immagini dell'incisione dopo chiusura. C) Analisi di Kaplan-Meier di topi trapiantati con cellule SKW6.4; sono confrontate le curve di sopravvivenza di topi non trattati e topi trattati con MSC inglobate nella matrice di acido ialuronico. La percentuale di sopravvivenza è misurata dal giorno dell'inoculo del linfoma fino alla morte (*= $p < 0,05$) [96].

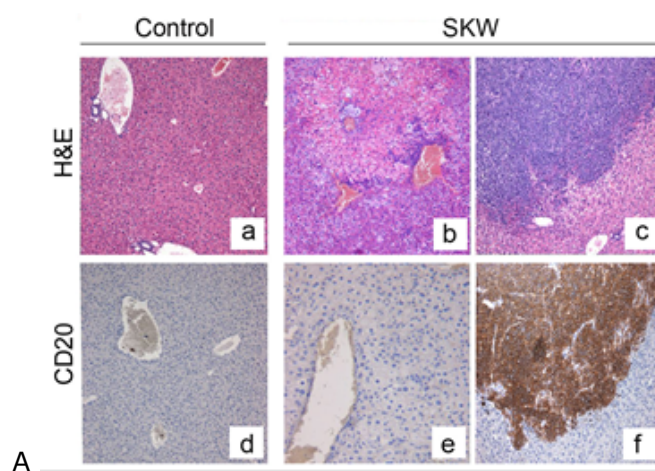
Abbiamo potuto verificare che i topi trapiantati con cellule di linfoma SKW6.4 mostrano frequentemente una severa distorsione dell'architettura dei tessuti epatici: l'analisi istologica rivela regioni di morte cellulare, in cui le cellule presentano estesa vacuolizzazione citoplasmatica, ed infiltrati massivi o isolati di cellule linfoblastoidi CD20+ (figura 11-A). Quest'evento rappresenta probabilmente una causa importante di morte nei topi [96].

Per determinare se l'impianto di cellule mesenchimali incorporate nelle garze di acido ialuronico può avere qualche effetto sulla funzionalità epatica, abbiamo quindi analizzato i livelli degli enzimi epatici alanina aminotransferasi (ALT) e aspartato aminotransferasi (AST) in circolo. Questi valori, infatti, permettono di valutare un danno epatico in atto. Per i saggi di misurazione delle attività enzimatiche sono stati effettuati dei prelievi di campioni di sangue dalla vena

caudale da cinque animali per ciascun gruppo: wild type e xenotrapiantati con SKW6.4, che abbiano ricevuto o meno l'impianto di cellule MSC.

I topi inoculati presentano un aumento significativo ($p < 0.05$) della concentrazione di ALT e AST nel siero a due/tre settimane dopo l'iniezione delle cellule tumorali; d'altro canto, nei topi che hanno ricevuto l'impianto di cellule mesenchimali i livelli dei due enzimi sono paragonabili ai topi wild type. Inoltre l'impianto delle garze di acido ialuronico e cellule staminali di per sé non altera la funzionalità epatica, non comportando variazioni nei livelli serici degli enzimi epatici analizzati (figura 12) [96].

Poiché è stato precedentemente verificato che la somministrazione di cellule mesenchimali può prevenire la perdita di cellule parenchimali e promuovere il riparo tissutale in modelli di danno epatico acuto tramite l'azione di molecole trofiche secrete [88, 89], il nostro gruppo di ricerca ha misurato il rilascio *in vitro* di citochine epatotrofiche secrete dalle cellule staminali mesenchimali coltivate da sole o in presenza di cellule SKW6.4. Dopo aver verificato che le cellule tumorali non influiscono sulla vitalità delle cellule staminali, si è constatato che le MSC secernono quantità rilevabili di HGF (hepatic growth factor), ma non di EGF (epidermal growth factor) o IGF-1 (insulin-like growth factor-1). Tale capacità risulta significativamente ($p < 0,05$) potenziata dalla presenza di cellule di linfoma (figura 12) [96].



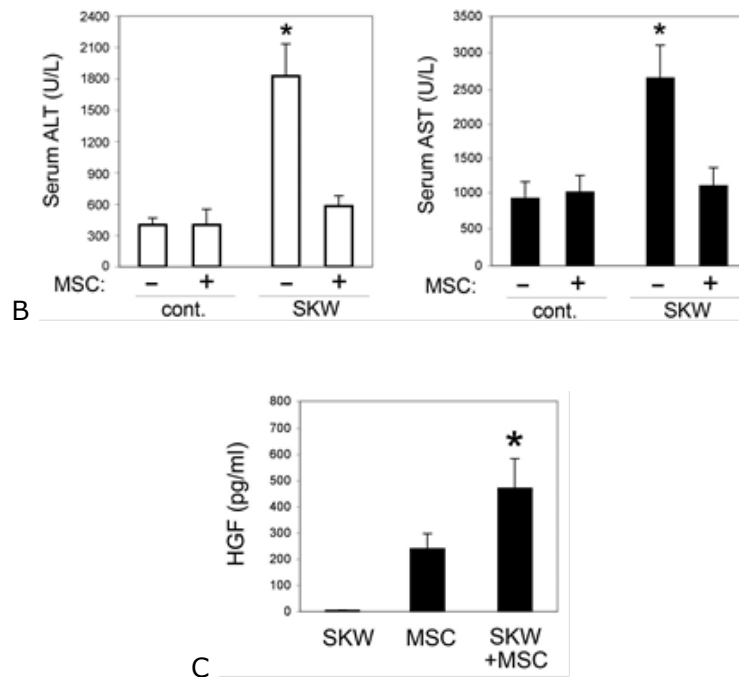


Figura 12. L'inoculo di cellule staminali mesenchimali in topi trapiantati con cellule di linfoma migliora la funzionalità epatica. A) Analisi istologica di sezioni tissutali in necrosi di fegato ottenute da topi controllo e topi trapiantati con cellule SKW6.4; è visibile l'architettura cellulare normale (a, d) o alterata con infiltrati di cellule linfoidi umane CD20+ rari o assenti (b, e) o massivi (c, f). (Ingrandimento originale 20X). B) I livelli sierici di ALT e AST sono stati misurati in topi controllo e topi trapiantati con cellule SKW6.4, che hanno ricevuto o meno impianto di cellule mesenchimali. I dati sono ottenuti da 5 topi per ogni gruppo e sono espressi come media \pm SD (*= $p < 0,05$ rispetto al topo di controllo). C) le MSC sono state coltivate in assenza o in presenza di cellule di linfoma. Dopo 72h sono stati misurati i livelli di citochine rilasciate nei surnatanti mediante saggio ELISA. Sono riportati in grafico i valori di concentrazione di HGF come media \pm SD derivanti da tre esperimenti indipendenti, ognuno eseguito in duplicato (*= $p < 0,05$) [96].

DISCUSSIONE

I progressi scientifici verificatisi nel corso degli ultimi decenni in ambito oncologico, immunologico e biotecnologico hanno consentito l'acquisizione di nuove potenzialità terapeutiche nel campo delle malattie oncoematologiche.

Attualmente i trattamenti antitumorali utilizzati in clinica contro i linfomi non-Hodgkin (NHL) prevedono la combinazione di più metodiche, quali la chemioterapia e la radioterapia, che permettono la remissione di molti tipi di linfoma; tuttavia un numero significativamente elevato di pazienti presenta ricadute, con esito fatale.

Per questo motivo un trattamento definitivo ed efficace per queste neoplasie resta ancora una seria necessità medica, considerando anche che l'incidenza dei linfomi non-Hodgkin continua ad aumentare [97]. Le forme prevalenti di NHL sono rappresentate dai tumori delle cellule B, di cui il linfoma follicolare e il linfoma a grandi cellule B diffuse ne costituiscono la maggioranza [98]. Il linfoma di Burkitt è una forma meno prevalente di NHL, caratterizzata dalla traslocazione dell'oncogene c-myc nella regione promotrice della catena pesante delle immunoglobuline [99].

Con l'obiettivo di identificare molecole in grado di agire come agenti antitumorali, abbiamo centrato il nostro studio sul potenziale terapeutico del sistema del TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL, e dei suoi recettori. Negli ultimi anni infatti, sono stati identificati diversi nuovi membri della famiglia dei ligandi del TNF e dei suoi recettori, ma nessuna di queste molecole ha attirato così tanta attenzione come il sistema TRAIL/TRAIL receptors. La citochina TRAIL viene espressa come proteina di membrana di tipo II o come proteina solubile in diversi tessuti umani, a livelli significativi [27].

La ragione dell'interesse per questa citochina è determinata dal fatto che studi condotti utilizzando derivati ricombinanti solubili di TRAIL si sono dimostrati capaci di indurre apoptosi in un ampio spettro di linee cellulari immortalizzate e in cellule tumorali primarie attraverso il legame ai recettori TRAIL-R1 e TRAIL-R2 [11, 90], in diversi modelli murini di neoplasie maligne umane, tra le quali diversi tumori di origine epiteliale come il cancro al colon, al pancreas, al polmone, ma anche di origine non epiteliale come il glioblastoma, il mieloma multiplo e altre neoplasie ematologiche [91], mentre nessuna attività citotossica è stata descritta nella maggior parte delle cellule non trasformate [90]. Per questo motivo l'uso di forme solubili ricombinanti di TRAIL, come agenti antitumorali sembra particolarmente promettente per il trattamento clinico di diverse forme neoplastiche [93].

Anche i dati preliminari raccolti dal nostro gruppo di ricerca sembrano confermare questa ipotesi. Brevemente, abbiamo verificato innanzitutto che alti livelli di TRAIL solubile sono rilasciati naturalmente, e che sono in grado di esercitare un'azione di sorveglianza immunologica contro lo sviluppo tumorale *in vivo*. Abbiamo poi caratterizzato la funzionalità *in vitro* della molecola ed i risultati ottenuti affermano che rTRAIL induce apoptosi in differenti linee tumorali [78]. Infine ne abbiamo testato l'efficacia terapeutica allestendo modelli murini di forme leucemiche e valutando la risposta al trattamento con rTRAIL [78].

In una serie di esperimenti preliminari *in vitro* abbiamo confermato l'attività antineoplastica di molecole di TRAIL ricombinante, testandone l'effetto su linee cellulari derivate da linfomi non-Hodgkin, quali le SKW6.4 e le BJAB; tuttavia è da tener presente che questi risultati spesso non tengono conto dell'eterogeneità di aspetti che caratterizza una determinata patologia. Per questi motivi dunque lo studio di un modello animale risulta determinante per avvalorare ogni dato ottenuto *in vitro* nel contesto fisiopatologico di un organismo vivente. Abbiamo quindi cercato di allestire un modello murino di linfoma di Burkitt in topi SCID adeguato a riflettere l'evoluzione clinica del linfoma Non-Hodgkin e che dimostrasse le potenzialità per essere utilizzato nello studio di nuovi farmaci anti-

tumorali. Questo modello è stato generato mediante inoculo intraperitoneale, anziché iniezione tramite sottocutanea, di cellule tumorali di linfoma, BJAB ed SKW6.4, il quale ha indotto lo sviluppo di masse tumorali con disseminazioni in altri organi, mimando così la progressione sistemica degli NHL [92].

Tale modello ci permette quindi di studiare l'evoluzione biologica di un tumore, sia per quanto concerne la sua crescita e la metastatizzazione, sia per quanto concerne lo studio della risposta ad un farmaco, in termini degli eventuali effetti terapeutici [92].

In questo modello murino abbiamo saggiato molecole capaci di attivare meccanismi proapoptotici, con riferimento al sistema mediato da TRAIL e dai suoi recettori, allo scopo, come precedentemente detto, non solo di aumentare gli effetti dell'immunoterapia e della chemioterapia, ma anche di ridurre gli effetti collaterali. TRAIL umano ricombinante, anche se esercita effetti positivi ed è oggetto di indagine in molti studi preclinici di fase I e II, come possibile terapia antitumorale, presenta comunque alcuni importanti limiti che ne impediscono l'utilizzo nella pratica clinica [93]. Innanzitutto non discrimina tra i diversi recettori espressi dalle cellule, interagendo non solo con i recettori che mediano apoptosi ma anche con i recettori decoy e con l'osteoprotegerina, che ne riducono l'effetto terapeutico. Molte cellule tumorali, infatti, possono aggirare il segnale apoptotico indotto da TRAIL mediante l'iperespressione di recettori decoy, precisamente TRAIL-R3 e TRAIL-R4, che sono recettori specifici per TRAIL di membrana, e dell'osteoprotegerina (OPG), un recettore solubile per TRAIL i cui livelli sierici risultano significativamente elevati in diversi tipi di tumori [94]; essi riducono la disponibilità di TRAIL, legando questa molecola e risultando incapaci di innescare l'apoptosi [93], sebbene non sia stata definitivamente verificata una stretta correlazione tra la citotossicità mediata da TRAIL e l'espressione in membrana dei recettori che trasducono i segnali di morte TRAIL-R1 e TRAIL-R2 o i recettori decoy TRAIL-R3 e TRAIL-R4 [95, 100].

In termini di farmacodinamica, a causa del basso peso molecolare, rTRAIL viene velocemente eliminato dalla circolazione attraverso il glomerulo renale, riducendone l'emivita a 30' [101]. Questo comporta l'adozione di protocolli di

iniezioni giornaliere di alte concentrazioni di TRAIL, ripetute per dieci giorni, per ottenere una risposta clinica efficace.

Parallelamente le nostre ricerche si sono focalizzate anche sulle potenzialità terapeutiche delle cellule staminali, precisamente le cellule isolate dalla frazione aderente mononucleare di aspirati da midollo osseo, che sono considerate le cellule staminali progenitrici stromali multipotenti di midollo, che hanno la capacità di differenziare in osteociti, condrociti e adipociti [92]; sono relativamente non immunogeniche [102], possono essere facilmente isolate e proliferano per numerosi passaggi *in vitro*, presentandosi quindi come interessanti agenti terapeutici [92]. Gli effetti di tali cellule sulla crescita tumorale risultano effettivamente controversi: numerosi studi infatti riportano che le MSC, una volta trapiantate, potrebbero favorire l'attecchimento e la progressione tumorale *in vivo* [103, 104] a causa della comprovata capacità di migrare verso siti di attiva tumorigenesi, di insediarsi nella nicchia tumorale e qui concorrere allo sviluppo di fibroblasti e miofibroblasti associati al tumore [105], di stimolare l'angiogenesi [105, 106] e di promuovere infine la crescita e l'acquisizione della resistenza ai farmaci, sia nei tumori solidi sia nei leucemici [105, 107-110].

Il nostro gruppo ha saggiato la potenziale azione antitumorale delle BM-MSK mediante trapianto nei modelli murini di NHL. Il risultato più importante di questo esperimento è stato notare che una singola iniezione di cellule MSC, in rapporto di 1:10 rispetto a quelle tumorali, porta ad una sopravvivenza significativamente maggiore degli animali, inoculati sia con BJAB sia con SKW6.4. Questo è particolarmente importante in quanto i modelli murini di xenotrapianto intraperitoneale di NHL, dando origine a tumori disseminati, sono più rilevanti in termini clinici di quelli sottocutanei utilizzati nei precedenti studi [111]. E' anche significativo che l'aumento delle cellule MSC fino ad un rapporto di 1:2 con quelle tumorali non ha portato miglioramenti significativi a livello terapeutico.

L'analisi istologica delle masse tumorali ci ha permesso di concludere che le MSC agiscono promuovendo lo sviluppo del network vascolare mediante la regolazione in maniera significativa del network stromale, aumentando il numero

di cellule miofibroblastiche α -sma+ incorporate nello stroma tumorale ed inducendo necrosi intra-tumorale, con conseguente riduzione della crescita della massa tumorale [92].

In conclusione, sebbene la letteratura riporti dati controversi sul ruolo delle MSC nello sviluppo del tumore e sul loro potenziale effetto terapeutico [112], i nostri risultati suggeriscono che le cellule mesenchimali possono esercitare attività oncosoppressiva [92].

Per spiegare il meccanismo molecolare alla base di questo effetto, il nostro gruppo ha condotto una serie di esperimenti *in vitro* i quali ci hanno permesso di concludere che non c'è un effetto citotossico significativo diretto delle MSC sulle cellule tumorali, piuttosto, come verificato nei saggi transwell, in presenza di cellule di linfoma, le cellule mesenchimali rilasciano livelli ancora più elevati di citochine angiogeniche, quali VEGF, IL-8, angiogenina e CCL2, promuovendo in maniera significativa la chemiotassi e la migrazione di cellule endoteliali. Il contatto diretto MSC-cellule endoteliali al contrario comporta la morte apoptotica di queste ultime [92].

A conferma di questi dati preliminari, abbiamo impiantato MSC inglobate in matrici di ialuronato nella parte addominale opposta rispetto al sito di iniezione di cellule SKW6.4, al fine di limitare il contatto diretto con le cellule di linfoma; questo ha portato ad un aumento significativo nella sopravvivenza dei topi, evitando l'integrazione delle cellule mesenchimali nel network tumorale fibrovascolare, risultando un valido strumento per lo sviluppo di nuove terapie. Nel contempo questo tipo di trattamento permette di confinare le cellule mesenchimali in una regione anatomica compatibile con una potenziale applicazione clinica [96].

Poiché i topi che sviluppano tumori in seguito a trapianto di cellule SKW6.4 frequentemente presentano una distorsione importante dell'architettura del tessuto epatico, con conseguente danno e perdita di funzionalità d'organo, che probabilmente rappresenta una causa importante di morte; abbiamo quindi valutato i livelli sierici di due enzimi epatici, precisamente ALT e AST, dopo

impianto di cellule staminali mesenchimali. I nostri dati dimostrano che la loro attività terapeutica si esplica anche mediante recupero della funzionalità epatica. Per completare lo studio e avvalorare ulteriormente il risultato, poiché dati di letteratura riportano che MSC possono prevenire la perdita di cellule parenchimali e promuovere riparo tissutale in modelli di scompenso epatico acuto tramite l'azione di molecole trofiche rilasciate in circolo [113, 114], il nostro gruppo di ricerca ha infine misurato il rilascio *in vitro* di citochine epatiche in colture di MSC. E' stato evidenziato che, in presenza di cellule SKW6.4, le MSC secernono quantità aumentate HGF, senza esercitare effetti sulla vitalità delle MSC a causa delle cellule di linfoma [96].

L'osservazione più importante che derivante dai nostri studi è che l'impianto di cellule BM-MSK è in grado di prolungare la sopravvivenza di modelli murini di linfoma Non-Hodgkin (LNH) anche dopo aver inglobato le cellule mesenchimali in una matrice di acido ialuronico, che limita i contatti cellula-cellula *in vivo*. Infine i nostri dati suggeriscono che l'azione antitumorale dipende probabilmente dal rilascio mediato dalle MSC [113, 114], e potenziato dalle cellule tumorali, di citochine epatotrofiche, come l'HGF [96].

Siamo comunque consapevoli che un limite importante nel nostro modello sperimentale consiste nell'impossibilità di valutare nel topo SCID la risposta antitumorale del sistema immunitario, che probabilmente esercita invece un ruolo importante sull'effetto complessivo delle MSC sulla crescita tumorale [96].

Concludendo, l'esperienza sperimentale e la collaborazione con gruppi di ricerca vicini alla clinica hanno evidenziato le ricadute applicative efficaci dell'immunoterapia e dell'utilizzo delle cellule staminali nel campo oncologico. Il bersaglio principale viene individuato nella malattia residua agli attuali standard terapeutici e non nelle masse tumorali, la cui eliminazione rimane a carico della chirurgia. Tuttavia la conoscenza accurata dei meccanismi di funzionamento delle molecole utilizzate in clinica e delle modalità per ottenere un potenziamento della loro efficacia terapeutica potrebbe essere una strategia per vincere vari

meccanismi di farmacoresistenza e rimane quindi l'endpoint principale della ricerca in campo oncologico.

MATERIALI E METODI

I. Sviluppo di modelli tumorali di linfoma in topi SCID.

Il modello murino di linfomi non-Hodgkin (NHL) è stato allestito utilizzando topi SCID in cui sono state iniettate la linea cellulare di linfoma di Burkitt umano EBV negativo BJAB o la linea cellulare di linfoma non Hodgkin (NHL) linfoblastoide EBV positivo SKW6.4. Gli animali utilizzati sono stati quelli nei quali tali linee cellulari avevano reso possibile la formazione di una massa tumorale intraperitoneale visibile ma non troppo estesa, dopo cioè circa 20-25 gg dall'inoculo. Precisamente per l'allestimento di questi modelli sono state utilizzate femmine di 4-6 settimane di topo SCID acquistate presso i laboratori della Charles River e mantenute in condizioni di sterilità presso il nostro stabulario. Le linee di cellule linfoblastoidi umane sono state espanse *in vitro*, quindi 2×10^6 cellule/topo sono state impiantate intraperitonealmente (i.p.) nel fianco sinistro degli SCID.

Tutte le procedure sperimentali sono state eseguite in accordo con le linee guida della legislazione Europea (86/609/EEC) ed Italiana (D.L. 116/92) e sono state approvate dal Ministero Italiano dell'Università e della Ricerca.

I trattamenti (rTRAIL o BM-MSD, diluiti in PBS sterile) sono stati eseguiti mediante inoculo intraperitoneale sul lato opposto rispetto a quello in cui sono state trapiantate le cellule di linfoma secondo le cadenze dei rispettivi protocolli descritti in dettaglio nei risultati.

L'impianto degli scaffold di acido ialuronico in cui sono state incluse le cellule mesenchimali è stato eseguito nella regione addominale mediante procedura

chirurgica effettuando piccole incisioni in condizioni asettiche e sotto anestesia da parte di un chirurgo.

Gli animali sono stati monitorati giornalmente per cambiamenti di peso e dello stato di salute. Il volume della massa tumorale è stato misurato tramite un calibro di precisione e calcolato con le misure dell'ellissoide $(L \times l^2)/2$.

La sopravvivenza è stata calcolata come la durata della vita dell'animale dalla data dell'inoculo delle cellule tumorali fino al sopraggiungimento della sua morte. Il calcolo della curva è stato eseguito con il metodo di Kaplan-Meier tramite il programma Prism di GraphPad; le distribuzioni di sopravvivenza dei topi trattati rispetto ai controlli sono state confrontate mediante il log-rank test. Le differenze sono state considerate significative per un valore di p minore di 0,05.

L'analisi necroscopica è stata eseguita per determinare l'estensione e le caratteristiche istologiche delle masse peritoneali. Gli organi principali, inclusi cuore, reni, midollo osseo prelevato dai femori, fegato, milza e linfonodi sono stati recuperati per determinare tramite esame microscopico la disseminazione del tumore.

II. Analisi immunoistologica ed immunoistochimica.

Gli organi espuntati per l'analisi istopatologica sono stati immersi in formalina al 10% per 24h, poi inclusi in paraffina ed effettuate delle sezioni di 4 μ m.

L'analisi immunoistochimica è stata eseguita mediante la colorazione con streptavidina-biotina-perossidasi, usando anticorpi primari mAbs specifici per CD20, α -Sma e CD31 (Dako, Glostrup, Danimarca). Le cellule sono state opportunamente colorate con ematossilina & eosina per la visualizzazione al microscopio (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Per la determinazione del contenuto di collagene, le sezioni sono state colorate con il metodo tricromatico di Masson. Infine, i vetrini sono stati esaminati con un microscopio ottico Leica DM2000 ed acquisiti digitalmente con una Leica DFC320.

III. Produzione di TRAIL umano ricombinante.

La forma di TRAIL umano ricombinante legato ad una coda di istidine (Recombinant human histidine 6-tagged TRAIL₍₁₁₄₋₂₈₁₎) è stata prodotta in un ceppo di batteri BL21, trasformati con il vettore pTRc-His6 TRAIL. L'espressione della sequenza codificante per i residui 114-281 della proteina, clonata in frame con una coda di sei istidine, dipende da un promotore inducibile, che viene stimolato mediante aggiunta di IPTG (Isopropil β -D-1-tiogalattopiranoside) 1mM al terreno quando i batteri sono in fase logaritmica di crescita ($O.D._{620\text{ nm}} = 0,80$) per 3h. Al termine i batteri sono centrifugati per 15' a 4000 rpm alla temperatura di 4°C e poi conservati a -80°C.

La purificazione si svolge in tutte le sue parti alla temperatura di 4°C. I batteri congelati a -80°C vengono risospesi in un Sonication Buffer e messi in ruota per 30'. Successivamente si procede alla Sonicatura del preparato ed alla separazione delle membrane tramite ultra-centrifuga. Il surnatante così ottenuto viene mescolato con imidazolo e addizionato alla resina di nichel (Ni-NTA) per procedere alla separazione mediante cromatografia per affinità; il tutto viene incubato in ruota per 3h. Infine viene utilizzata una colonna (Qiagen polypropylen columns) per la separazione della resina dalla proteina tramite eluizione.

La preparazione così ottenuta viene messa in dialisi per 48h in una soluzione salina per poi essere aliquotata e conservata a -80°C.

Infine, l'attività biologica di TRAIL ricombinante viene testata sulla linea cellulare HL-60 (sensibile a TRAIL), tramite colorazione con ioduro di propidio (PI) ed analisi citofluorimetrica dell'apoptosi.

IV. Analisi statistica

I risultati sono stati analizzati utilizzando il software Prism (GraphPad Software): l'analisi delle varianze e successivo confronto sono stati effettuati

mediante test di Student, ANOVA ed il test di Mann–Whitney–Wilcoxon. I gruppi di topi sono stati confrontati con il metodo di Bonferroni. Le curve di sopravvivenza sono state calcolate con il metodo di Kaplan-Meier e confrontate mediante il Log-rank test. I valori riportati nei grafici consistono nelle medie \pm SD, eccetto quando specificato diversamente. Una differenza statistica significativa è definita per un valore di $p < 0,05$.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Vaccarezza M., G. Delbello, G. Zauli, 2007. A role of the TRAIL-TRAIL receptor system in the pathogenesis of diabetes ACTA BIOMED; 78; Suppl 1: 262-267
- [2] Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. Nat Rev Cancer. 2002 Jun;2(6):420-30.
- [3] Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell* 2001; 104:487-501.
- [4] Mackay F, Woodcock SA, Lawton P, et al. Mice transgenic for BAFF developmental lymphocytic disorders along with autoimmune manifestations. *J Exp Med* 1999; 190:1697-1710.
- [5] Gravestien LA, Borst J. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol* 1998; 10:423-434.
- [6] Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, et al. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signaling. *Nature* 1998; 393:478-480.
- [7] Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407:789-795.
- [8] Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:3597-3602.

- [9] Sanchez-Nino M. D., A. Benito-Martin, S. Gonc, A. B. Sanz, A. C. Ucerro, M. C. Izquierdo, A. M. Ramos, S. Berzal, R. Selgas, M. Ruiz-Ortega, J. Egido, and A. Ortiz, 2010. TNF Superfamily: A Growing Saga of Kidney Injury Modulators. *Mediators Inflamm.*: 182958
- [10] Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al., 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*; 3:673-682.
- [11] Mori E, Kazuhiro M, Kataoka S, Current status of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL-R) targeting cancer therapy, *Ann Cancer Res* 2005; 13: 11-16
- [12] Almasan A, Ashkenazi A. Apo2L/TRAIL: apoptosis signaling, biology, and potential for cancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14:337-348.
- [13] Gruss HJ. Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *Int J Clin Lab Res* 1996; 26:143-159.
- [14] Hymowitz SG, Ultsch MH, Hurst A, et al. A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry* 2000; 39:633-640.
- [15] Mongkolsapaya JGJ, Chen N, Xu XN, et al. Structure of the TRAIL-DR5 complex reveals mechanisms conferring specificity in apoptotic initiation. *Nat Struct Biol* 1999; 6:1048-1053.
- [16] Corallini F, Milani D, Nicolini V, et al. TRAIL, caspases and maturation of normal and leukemic myeloid precursors. *Leukemia Lymphoma* 2006; 47:1459-1468.
- [17] Mariani SM, Krammer PH. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur J Immunol* 1998; 28:973-982.

- [18] Zamai L, Secchiero P, Pierpaoli S, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) as a negative regulator of normal human erythropoiesis. *Blood* 2000; 95:3716-3724.
- [19] Halaas O, Vik R, Ashkenazi A, Espevik T, 2000. Lipopolysaccharide induces expression of APO2 ligand/TRAIL in human monocytes and macrophages. *Scand J Immunol.*;51(3):244-50
- [20] Martínez-Lorenzo MJ, Anel A, Gamen S, Monle n I, Lasierra P, Larrad L, Piñeiro A, Alava MA, Naval J. Activated human T cells release bioactive Fas ligand and APO2 ligand in microvesicles. *J Immunol.* 1999 Aug 1;163(3):1274-81.
- [21] Cretney E, Takeda K, Yagita H, et al. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand deficient mice. *J Immunol* 2002; 168:1356-1361.
- [22] Sedger LM, Glaccum MB, Schuh JC, et al. Characterization of the *in vivo* function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *Eur J Immunol* 2002; 32:2246-2254.
- [23] Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, de Jong S, 2004. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem.*;52(6):821-31
- [24] Pan G, Ni J, Wei YF, et al. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997; 277:815-818
- [25] Emery JG, McDonnell P, Burke MB, Deen KC, Lyn S, Silverman C, Dul E, Appelbaum ER, Eichman C, DiPrinzio R, Dodds RA, James IE, Rosenberg M, Lee JC, Young PR, 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.*;273(23):14363-7.

- [26] Zauli G, Secchiero P. The role of the TRAIL/TRAIL receptors system in hematopoiesis and endothelial cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 4:245-257.
- [27] Corallini F, Rimondi E, Secchiero P. TRAIL and osteoprotegerin: a role in endothelial physiopathology? *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:135-47.
- [28] Kavurma M., R. Bennett, 2007. Expression, regulation and function of trail in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol.* ;75(7):1441-50.
- [29] Muhlenbeck F, Schneider P, Bodmer JL, et al. The tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are nonredundant in JNK activation. *J Biol Chem* 2000; 275:32208-32213.
- [30] Wajant H, Moosmayer D, Wuest T, et al. Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene* 2001; 20:4101-4106.
- [31] Park SM, Schickel R, Peter ME. Nonapoptotic functions of FADD-binding death receptors and their signaling molecules. *Cur Op Cell Biol* 2005; 17:1-7.
- [32] Ozoren N, El-Deiry WS. Cell surface death receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2003; 13:135-147.
- [33] Kimberley FC, Screatton GR. Following a TRAIL: update on a ligand and its five receptors. *Cell Res* 2004; 14:359-372.
- [34] Sheikh MS, Fornace AJ Jr. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia* 2000; 14:1509-1513.
- [35] Ruiz de Almodovar C, Ruiz-Ruiz C, Rodriguez A, et al. TRAIL decoy receptor TRAIL-R3 is upregulated by p53 in breast tumor cells through a mechanism involving an intronic p53 binding site. *J Biol Chem* 2004; 279:4093-4101.

[36] Baetu TM, Kwon H, Sharma S, et al. Disruption of NF-kappaB signaling reveals a novel role for NF-kappaB in the regulation of TNF-related apoptosis-inducing ligand expression. *J Immunol* 2001; 167:3164-3173.

[37] Bernard D, Quatannens B, Vandebunder B, et al. Rel/NfkappaB transcription factors protect against tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by up-regulating the TRAIL decoy receptor DcR1. *J Biol Chem* 2001; 276:27322-27328.

[38] Ravi R, Bedi GC, Engstrom LW, et al. Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF-kappaB. *Nat Cell Biol* 2001; 3:409-416.

[39] Chen X, Kandasamy K, Srivastava RK. Differential roles of RelA (p65) and c-Rel subunits of nuclear factor kappa B in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling. *Cancer Res* 2003; 63:1059-1066.

[40] Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997; 89:309-319.

[41] Bouralexis S, Findlay DM, Evdokiou A. Death to the bad guys: targeting cancer via Apo2L/TRAIL. *Apoptosis* 2005; 10:35-51.

[42] Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, et al. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells. *Clin Cancer Res* 2000; 6:335-346.

[43] Pan G, Ni J, Wei YF, et al. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 1997; 277:815-818.

[44] Meng RD, McDonald ER 3rd, Sheikh MS, et al. The TRAIL decoy receptor TRUNDD (DcR2, TRAIL-R4) is induced by adenovirus-p53 overexpression and can delay TRAIL, p53-, and KILLER/DR5-dependent colon cancer apoptosis. *Mol Ther* 2000; 1:130-144.

- [45] Lincz LF, Yeh TX, Spencer A. TRAIL-induced eradication of primary tumour cells from multiple myeloma patient bone marrows is not related to TRAIL receptor expression or prior chemotherapy. *Leukemia* 2001; 15:1650-1657.
- [46] Wuchter C, Krappmann D, Cai Z, et al. *In vitro* susceptibility to TRAIL-induced apoptosis of acute leukemia cells in the context of TRAIL receptor gene expression and constitutive NF- κ B activity. *Leukemia* 2001; 15:921-928.
- [47] Secchiero P, Gonelli A, Carnevale E, et al. TRAIL promotes the survival and proliferation of primary human vascular endothelial cells by activating the Akt and ERK pathways. *Circulation* 2003; 107:2250-2256.
- [48] Mirandola P, Ponti C, Gobbi G, et al. Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors, but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. *Blood* 2004;104:2418-2424.
- [49] Secchiero P, Zerbinati C, Rimondi E, et al: TRAIL promotes the survival, migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61:1965-1974.
- [50] Secchiero P, Tiribelli M, Barbarotto E, et al. Aberrant expression of TRAIL in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *J Cell Physiol* 2005; 205:246-252.
- [51] Griffith TS, Chin WA, Jackson GC, et al. Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells. *J Immunol* 1998; 161:2833-2840.
- [52] Wu GS, Burns TF, Zhan Y, et al. Molecular cloning and functional analysis of the mouse homologue of the KILLER/DR5 tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) death receptor. *Cancer Res* 1999; 59:2770-2775.
- [53] Schneider P, Olson D, Tardivel A, et al. Identification of a new murine tumor necrosis factor receptor locus that contains two novel murine receptors for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J Biol Chem* 2003; 278:5444-5454.

- [54] Li H, Zhu H, Xu CJ, et al. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998; 94:491-501.
- [55] Grossn A, Yin XM, Wang K, et al. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999; 274:1156-1163.
- [56] Secchiero P, Milani D, Gonelli A, et al. Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TNF-alpha promote the NF kappaB-dependent maturation of normal and leukemic myeloid cells. *J Leukoc Biol* 2003; 74:223-322.
- [57] Zauli G, Pandolfi A, Gonelli A, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) sequentially upregulates nitric oxide and prostanoid production in primary human endothelial cells. *Circ Res* 2003; 92:732-740.
- [58] Secchiero P, Melloni E, Heikinheimo M, et al. TRAIL regulates normal erythroid maturation through an ERK-dependent pathway. *Blood* 2004; 103:517-522.
- [59] Melloni E, Secchiero P, Celeghini C, et al. Functional expression of TRAIL and TRAIL-R2 during human megakaryocytic development. *J Cell Physiol* 2005; 204:975-82.
- [60] Hu WH, Johnson H, Shu HB. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *J Biol Chem* 1999; 274:30603-30610.
- [61] Brauer SJ, Buneker C, Mohr A et al. Constitutively activated nuclear factor-KB, but not induced NF-KB, leads to TRAIL resistance by up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 2006; 4:715-728.
- [62] Degli-Esposti MA, Dougall WC, Smolak PJ, et al. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 1997; 7:813-820.

- [63] Wachter T, Sprick M, Hausmann D, et al. cFLIPL inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated NF-kappaB activation at the death-inducing signaling complex in human keratinocytes. *J Biol Chem* 2004; 279:52824-52834.
- [64] Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, et al. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 2002; 195:161-169.
- [65] Zerafa N, Westwood JA, Cretney E, Mitchell S, Waring P, Iezzi M, Smyth MJ. 2005. TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. *J Immunol* 175:5586-5590.
- [66] Baetu TM, Hiscott J. On the TRAIL to apoptosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 Jun;13(3):199-207. Review.
- [67] Secchiero P, Vaccarezza M, Gonelli A, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a potential candidate for combined treatment of hematological malignancies. *Curr Pharm Des* 2004; 10:3673-3681.
- [68] Secchiero P, Corallini F, Castellino G, Bortoluzzi A, Caruso L, Bugatti S, Bosco R, Montecucco M, Trotta F. Baseline serum concentrations of TRAIL in early rheumatoid arthritis: relationship with response to disease-modifying antirheumatic drugs. *J Rheumatol.* 2010 Jul;37(7):1461-6. Epub 2010 May 15.
- [69] Cretney E, McQualter JL, Kayagaki N, et al. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Immunol Cell Biol* 2005; 83:511-519.
- [70] Mi QS, Ly D, Lamhamedi-Cherradi SE, et al. Blockade of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand exacerbates type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2003; 52:1967-1975.
- [71] Wang SH, Cao Z, Wolf JM, et al. Death ligand tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand inhibits experimental autoimmune thyroiditis. *Endocrinology* 2005; 146:4721-4726.

- [72] Walczak H, Miller RE, Ariail K, et al. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand *in vivo*. *Nat Med* 1999; 5:157-163.
- [73] Atkins GJ, Bouralexis S, Evdokiou A, et al. Human osteoblasts are resistant to Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis. *Bone* 2002; 31:448-456.
- [74] Rimondi E, Secchiero P, Quaroni A, et al. Involvement of TRAIL/TRAIL-receptors in human intestinal cell differentiation. *J Cell Physiol* 2006; 206:647-654.
- [75] Zang DY, Goodwin RG, Loken MR, et al. Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, Apo2L, and its receptors in myelodysplastic syndrome: effects on *in vitro* hemopoiesis. *Blood* 2001; 98:3058-3065.
- [76] Plasilova M, Zivny J, Jelinek J, et al. TRAIL (Apo2L) suppresses growth of primary human leukemia and myelodysplasia progenitors. *Leukemia* 2002; 16:67-73.
- [77] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
- [78] Secchiero P, Sblattero D, Chiaruttini C et al (2009) Selection and characterization of a novel agonistic human recombinant anti- TRAIL-R2 minibody with anti-leukemic activity. *Int J Immunopathol Pharmacol* 22:73-83.
- [79] Goldsby RA, Kindt TJ, and Osborne BA *Kuby Immunologia*, 2000.
- [80] Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46:219-34.
- [81] Zent CS, Call TG, Shanafelt TD, Early Treatment of High-risk chronic Lymphocytic Leukemia with Alemtuzumab and Rituximab, *Cancer* 2008, 113: 2110-2118.

[82] Kuppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas, *Oncogene* 2001; 20: 5580-94.

[83] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al., *Cancer Statistics, 2008. CA Cancer J Clin* 2008; 58:71-96.

[84] Thomas-Tikhonenko A, Cozma D. PAX5 and B-cell neoplasms: transformation through presentation, *Future Oncol* 2008; 4: 5-9.

[85] Hooker CW, Hurlin PJ, Of Myc and Mnt, *J of Cell Science* 2006; 119: 208-216.

[86] Campioni D, Secchiero P, Corallini F, Melloni E, Capitani S, Lanza F, Zauli G. Evidence for a role of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) in the anemia of myelodysplastic syndromes. *Am J Pathol.* 2005; 166:557-63.

[87] Secchiero P, Corallini F, Barbarotto E, Melloni E, di Iasio MG, Tiribelli M, Zauli G. Role of the RANKL/RANK system in the induction of interleukin-8 (IL-8) in B chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *J Cell Physiol.* 2006; 207:158-64.

[88] Choi JW. 2005. Relationships between tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosisinducing ligand (TRAIL) and hematopoietic activity in healthy adults. *Ann Hematol* 84:728–733.

[89] Michowitz Y, Goldstein E, Roth A, Afek A, Abashidze A, Ben Gal Y, Keren G, George J. 2005. The involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 45:1018–1024.

[90] Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich O, TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy, *Apoptosis* 2002; 7: 449-459.

[91] Daniel D, Yang B, Lawrence DA, Totpal K, Balter I, Lee WP, Gogineni A, Cole MJ, Fong Yee SF, Ross A, Ashkenazi A. Cooperation of the proapoptotic receptor agonist rhApo2L/TRAIL with the CD20 antibody rituximab against non-Hodgkin lymphoma xenografts. *Blood* 2007; 110: 4037-46.

- [92] Secchiero P, Zorzet S, Tripodo C, Corallini F, Melloni E, Caruso L, Bosco R, Ingraio S, Zavan B, Zauli G. Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Display Anti-Cancer Activity in SCID Mice Bearing Disseminated Non-Hodgkin's Lymphoma Xenografts. *PLoS ONE* June 2010; 5-6, 11140.
- [93] Ashkenazi A, Holland P, Eckhardt SG (2008) Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *J Clin Oncol* 26:3621–3630
- [94] Zauli G, Melloni E, Capitani S, Secchiero P (2009) Role of full-length osteoprotegerin in tumor cell biology. *Cell Mol Life Sci* 66:841–851
- [95] Di Pietro R, Zauli G (2004) Emerging non-apoptotic functions of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L. *J Cell Physiol* 201:331–340
- [96] Secchiero P, Corallini F, Zavan B, Tripodo C, Vindigni V, Zauli G. Mesenchymal stem cells display hepato-protective activity in lymphoma bearing xenografts *Invest New Drugs*. 2012 Apr;30(2):803-7. Epub 2010 Sep 9.
- [97] Clarke CA, Glaser SL (2002) Changing incidence of non-Hodgkin lymphomas in the United States. *Cancer* 94: 2015–2023.
- [98] Armitage JO, Weisenburger DD (1998) New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes: Non-Hodgkin's Lymphoma classification project. *J Clin Oncol* 16: 2780–2795.
- [99] Taub R, Kirsch I, Morton C, Lenoir G, Swan D, et al. (1982) Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 7837–7841.
- [100] Secchiero P, Zauli G (2008) TNF-related apoptosis-inducing ligand and the regulation of hematopoiesis. *Curr Opin Hematol* 15:42–48

- [101] Kelley SK, Harris LA, Xie D et al (2001) Preclinical studies to predict the disposition of Apo2L/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in humans: characterization of *in vivo* efficacy, pharmacokinetics, and safety. J Pharmacol Exp Ther 299:31–38.
- [102] Aggarwal S, Pittenger MF (2004) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood 105: 1815–1822.
- [103] Guest I, Ilic Z, Ma J, Grant D, Glinsky G, et al. (2009) Direct and indirect contribution of bone marrow derived cells to cancer. Int J Cancer [Epub ahead of prin].
- [104] Ramasamy R, Lam EW, Soeiro I, Tisato V, Bonnet D, et al. (2007) Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on *in vivo* tumor growth. Leukemia 21: 304–310.
- [105] Spaeth EL, Dembinski JL, Sasser AK, Watson K, Klopp A, et al. (2009) Mesenchymal stem cell transition to tumor-associated fibroblasts contributes to fibrovascular network expansion and tumor progression. PLoS One 4: e4992.
- [106] Au P, Tam J, Fukumura D, Jain RK (2008) Bone marrow derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. Blood 111: 4551–4558.
- [107] Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, et al. (2006) Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth *in vivo*. Exp Mol Pathol 80: 267–274.
- [108] De Wever O, Demetter P, Mareel M, Bracke M (2008) Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. Int J Cancer 123: 2229–2238.
- [109] Ame´-Thomas P, Maby-El Hajjami H, Monvoisin C, Jean R, Monnier D, et al. (2007) Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis. Blood 109: 693–702.

[110] Lwin T, Hazlehurst LA, Li Z, Dessureault S, Sotomayor E, et al. (2007) Bone marrow stromal cells prevent apoptosis of lymphoma cells by upregulation of anti-apoptotic proteins associated with activation of NF- κ B (RelB/p52) in non-Hodgkin's lymphoma cells. *Leukemia* 21: 1521–1531.

[111] Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, et al. (2009) Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 23: 925–933.

[112] Lazennec G, Jorgensen C (2008) Concise Review: Adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells* 26: 1387–1394.

[113] Parekkadan B, van Poll D, Sukanuma K, et al. (2007) Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* 2:e941.

[114] van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, et al. (2008) Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology* 47:1634-1643.

SITI INTERNET CONSULTATI

<http://web.tiscali.it/ematologia> Sito Italiano di Ematologia

<http://www.ailmilano.it>

<http://www.airc.it>