



Università Campus Bio-Medico di Roma

Corso di dottorato di ricerca in
Patologia Osteoncologica
XXVIII ciclo anno 2013

**Valutazione dell'effetto antitumorale di Cabozantinib
sull'osteosarcoma e sul microambiente osseo**

Marco Fioramonti

Coordinatore
Prof Giuseppe Tonini

Tutore
Prof. Bruno Vincenzi

29 Luglio 2016

1 SOMMARIO

2	OSTEOSARCOMA	5
2.1	Introduzione.....	5
2.2	Epidemiologia.....	5
2.3	Eziologia.....	6
2.4	Sottotipi istologici	7
2.5	Presentazione clinica	11
2.6	Trattamento.....	11
2.6.1	Pazienti con metastasi sincrone	13
2.6.2	Recidiva locale	14
2.6.3	Metastasi metacrone	14
2.6.4	Radioterapia nell'Osteosarcoma.....	15
2.6.5	Nuove sperimentazioni terapeutiche.....	15
3	CABOZANTINIB	20
3.1	Proprietà precliniche e farmacocinetica.....	20
3.2	Studi clinici.....	20
3.2.1	Fase I	20
3.2.2	Fase III EXAM Trial	21
3.2.3	Trials clinici.....	22
3.2.4	Trials clinici ongoing.....	23
4	IL MICROAMBIENTE OSSEO	25
4.1	Il balance RANKL/OPG.....	25
4.2	Il circolo vizioso	26
5	SCOPO DEL LAVORO	29
6	MATERIALI E METODI	30
6.1	colture cellulari e trattamenti farmacologici.....	30
6.1	Trasfezione	31
6.2	analisi del differenziamento osteoblastico.....	31
6.2.1	Colorazione citochimica per la fosfatasi alcalina leucocitaria (ALP)	31
6.2.2	Colorazione citochimica per depositi di calcio (ALIZARIN RED)	32
6.3	Analisi del differenziamento osteoclastico.....	32
6.3.1	Colorazione citochimica per la fosfatasi acida tartrato resistente (TRAP).....	32
6.3.2	Saggio di riassorbimento osseo	32
6.3.3	Saggio di proliferazione (curve di crescita).....	33
6.4	Saggi di vitalità.....	33

6.4.1	MTT assay	33
6.4.2	Live/Dead® assay.....	33
6.5	Analisi del ciclo cellulare	34
6.6	Wound healing assay	34
6.7	Estrazione dell'rna e retrotrascrizione	34
6.8	Real time PCR	35
6.9	Estrazione delle proteine, quantificazione e elettroforesi.....	36
6.10	Western blotting	37
6.11	Immunofluorescenza	38
6.12	Elisa	38
6.13	Co-culture.....	38
6.13.1	Co-culture osteoblasti/osteoclasti	38
6.13.2	Co-culture osteoblasti/cellule tumorali.....	39
6.14	Analisi statistica.....	39
7	RISULTATI	40
7.1	Le linee di osteosarcoma esprimono in modo funzionale il recettore c-MET	40
7.2	CBZ inibisce la proliferazione delle cellule di osteosarcoma in un modo dose-dipendente	40
7.3	CBZ causa un accumulo di cellule nella fase G ₀ /G ₁ del ciclo cellulare nelle linee MG 63, Saos-2 e U-2 OS; nella linea HOS, CBZ provoca un aumento della frazione sub-G ₁	41
7.4	CBZ causa mitosi aberranti nella linea HOS.....	42
7.5	CBZ inibisce la capacità migratoria delle cellule di osteosarcoma	47
7.6	CBZ inibisce l'attività di c-MET e i pathways a valle ERK e AKT	48
7.7	CBZ induce il processo autofagico nelle linee di osteosarcoma	49
7.1	Il recettore c-MET è espresso durante tutto il differenziamento osteoclastico e osteoblastico	51
7.2	Il trattamento con CBZ inibisce sia l'attività che il differenziamento osteoclastico	52
7.3	CBZ modifica l'espressione dei principali geni marker degli osteoclasti	52
7.4	Il CBZ non influenza né il differenziamento né l'attività osteoblastica	53
7.5	CBZ modifica l'espressione di alcuni geni marker degli osteoblasti	54
7.6	CBZ influenza i livelli di OPG e RANKL secreti dagli osteoblasti	55
7.7	CBZ modifica l'attivazione di alcuni pathways intracellulari degli osteoblasti	55
7.8	Osteoblasti pre-trattati con CBZ perdono la capacità di differenziare monociti CD14+ in osteoclasti maturi	56
7.9	Gli osteoblasti trattati con CBZ rimangono vitali anche dopo 15 giorni dalla fine del trattamento	57
7.10	Le linee HOS, MG-63 e Saos-2, ma non U-2 OS, esprimono il recettore RANK	58
7.11	Osteoblasti pre-trattati con CBZ inibiscono la proliferazione delle linee di osteosarcoma che esprimono RANK.....	59
8	DISCUSSIONE	64

Tesi di dottorato in Patologia Osteoncologica, di Marco Fioramonti,
discussa presso l'Università Campus Bio-Medico di Roma in data 29/07/2016.
La disseminazione e la riproduzione di questo documento sono consentite per scopi di didattica e ricerca,
a condizione che ne venga citata la fonte.

9	CONCLUSIONI.....	74
10	BIBLIOGRAFIA.....	75

2 OSTEOSARCOMA

2.1 INTRODUZIONE

L'osteosarcoma, come tutti gli altri sarcomi, è un tumore di origine mesenchimale. Tuttavia le cellule tumorali di tale neoplasia si caratterizzano per la produzione di tessuto osteoide immaturo, dal quale deriva quindi il suo nome (1). E' il sarcoma primitivo osseo più comune nei bambini e nei giovani adulti ed ha tipicamente una distribuzione per età bimodale, con un picco di incidenza prevalente nel secondo decennio di vita ed il successivo nell'età adulta (1).

L'osteosarcoma può a sua volta essere suddiviso in diversi sottotipi istologici, ognuno associato a diversi gradi di aggressività clinica. Nonostante questa sottodivisione istologica, in generale, le strategie di trattamento sono simili tra loro.

Circa l'80% dei pazienti si presenta con un osteosarcoma metastatico o con micro-metastasi al momento della diagnosi, quasi tutti i pazienti sono trattati, quindi, con polichemioterapia e, se possibile, resezione chirurgica. I progressi nel trattamento chirurgico hanno significativamente ridotto il numero di amputazioni eseguite, adottando sempre, ove possibile, la tecnica del limb sparing (1). Nel corso del tempo, la prognosi è migliorata da meno del 30% di sopravvivenza a cinque anni fino a più del 70% come risultato di una evoluzione delle conoscenze della malattia e dei suoi possibili trattamenti (2). Nonostante questi progressi, c'è ancora molto terreno da indagare nel campo dei trattamenti sistemici e chirurgici.

2.2 EPIDEMIOLOGIA

I dati più completi per quanto riguarda l'epidemiologia dell'osteosarcoma negli Stati Uniti proviene dal Surveillance, Epidemiology, e End Results (SEER) del programma del National Institute of Health. Questa è una raccolta di statistiche oncologiche tratte da un considerevole numero di centri oncologici statunitensi. Più di recente, Mirabello e collaboratori hanno esaminato i dati SEER dal 1973 al 2004 riguardanti l'osteosarcoma, che comprendevano 3.482 pazienti (3). I loro dati hanno confermato la distribuzione anagrafica di tipo bimodale dell'osteosarcoma con un picco di incidenza nell'età adolescenziale ed uno in quella anziana. Il picco nell'età adolescenziale vedeva come età mediana i 15 anni ed era rappresentato prevalentemente da osteosarcomi primari. L'incidenza dell'osteosarcoma nella fascia di età da 0 a 24 anni è stata di 4,4 per milione. Il secondo picco aveva un'età mediana di 75 anni ed era rappresentato prevalentemente da osteosarcomi secondari associati a malattia di Paget o altre lesioni ossee. Analizzando le differenze per sesso i maschi hanno mostrato un'incidenza lievemente aumentata rispetto alle femmine con un rapporto di

1,22: 1. In termini di sedi anatomiche più frequenti, l'osteosarcoma sembra avere una predilezione per le porzioni metafisarie delle ossa lunghe.

Secondo il lavoro di Dahlin e colleghi le ossa più comunemente coinvolte sono: femore circa il 40% (dei quali circa tre quarti nel femore distale); tibia circa il 20%; omero il 10% e bacino l'8% (4). Pertanto, questi siti costituiscono quasi l'80% dei casi segnalati. I casi rimanenti sono sparsi tra le altre ossa del corpo, comprese fibula, radio, ulna, coste, mascella, colonna vertebrale. Viene segnalata inoltre, che, pur essendo molto rara, vi è la possibilità di riscontrare un osteosarcoma extraosseo (5). Tuttavia, l'identificazione e la classificazione di queste lesioni extraossee è considerevolmente controversa. È difficile, infatti, distinguere se si tratti di veri e propri osteosarcomi a localizzazione atipica o di sarcomi dei tessuti molli con diagnosi istologica errata.

2.3 EZIOLOGIA

La vera eziologia dell'osteosarcoma rimane tuttora sconosciuta. Sembra essere una neoplasia a genesi multifattoriale influenzata da entrambe le componenti, genetiche ed ambientali. Mentre in altri sarcomi, come ad esempio il sarcoma di Ewing, sono state dimostrate traslocazioni cromosomiche, la maggior parte degli osteosarcomi sono aneuploidi (6). Tuttavia, sembra che ci sia una base molecolare nello sviluppo dell'osteosarcoma. Alcune malattie genetiche, con mutazioni note di geni oncosoppressori, hanno infatti una maggiore incidenza di questo tipo di neoplasia. Sono state registrate, in oltre, incidenze aumentate tra i familiari di primo grado (7). Nonostante ciò, la maggior parte dei casi sembrano essere il risultato di mutazioni sporadiche.

Il retinoblastoma ereditario è il risultato di un difetto genetico del gene *RBI* localizzato sul cromosoma 13q14.2. Questa mutazione comporta prevalentemente tumori della retina dell'età pediatrica. Il ruolo del gene *RB* è quello di contribuire a regolare il passaggio tra G_0/G_1 e la fase S del ciclo cellulare (8). Quando mutato, la crescita cellulare continua incontrollata e porta allo sviluppo del tumore. Si è dimostrato che questi pazienti hanno un rischio aumentato di 500 volte di sviluppare un osteosarcoma rispetto alla popolazione generale (9). Inoltre, mutazioni nel gene *RBI* sono state dimostrate rilevanti anche nei casi di osteosarcoma sporadico (10).

Un'altra malattia genetica associata ad un'aumentata incidenza di osteosarcoma è sindrome di Li-Fraumeni. Questa è una sindrome caratterizzata da una varietà di diversi tipi di cancro, compresi: tumore della mammella femminile, sarcoma dell'osso o dei tessuti molli, carcinoma della corteccia surrenalica, tumori cerebrali (11). Tale sindrome ereditaria, autosomica dominante, provoca l'inattivazione del gene oncosoppressore *p53*, che aiuta a regolare la progressione del ciclo cellulare in presenza di danni al DNA.

È stato anche dimostrato che la mutazione in altri geni coinvolti nella via p53 come *MDM2*, *p14ART* e *CDK4* possono favorire lo sviluppo di osteosarcoma (6). Infine, anche anomalie nella DNA elicasi sono state associate con lo sviluppo di tale neoplasia.

La sindrome Rothman-Thomas è una malattia autosomica recessiva, associata ad alterazioni cutanee, bassa statura, alopecia, cataratta, ed osteosarcoma, caratterizzata da un difetto del gene che codifica per una DNA elicasi *RECQL4*. Simili anomalie DNA elicasi sono state trovate nella sindrome di Werner, dove un difetto del gene *WRN* o *RECQL2* causa sarcomi dei tessuti molli, melanomi, e osteosarcomi; e nella sindrome di Bloom, dove difetti del gene *BLM* o *RECQL3* comportano la predisposizione per molti tipi di cancro in giovane età (8).

L'osteosarcoma nella popolazione adulta sembra avere un comportamento diverso rispetto a quello insorto in bambini e giovani adulti.

Come accennato in precedenza, i pazienti con malattia di Paget hanno un rischio aumentato di sviluppare osteosarcomi secondari. È stata dimostrata, infatti, un'associazione genica tra il morbo di Paget e l'osteosarcoma. Entrambe le patologie mostrano mutazioni geniche a livello di *SQSTM1*, gene coinvolto nelle vie del TNF e RANKL per la regolazione del turnover osseo. Questa mutazione sembra avere un ruolo decisivo nel sottogruppo di pazienti che secondariamente svilupperà l'osteosarcoma (12). Circa il 20% dei pazienti con più di 40 anni affetti da morbo di Paget andranno incontro a sviluppo di osteosarcoma secondario, questi pazienti, fortunatamente, presentano una prognosi favorevole (13).

Come alla malattia di Paget, l'osteosarcoma è stato associato ad altri processi patologici benigni a carico delle ossa, tra questi riscontriamo: infarti ossei, encondromi, fibrodisplasie, e osteomieliti (14-16).

Le radiazioni ionizzanti costituiscono la causa ambientale meglio studiata. È stato dimostrato che alte dosi di radiazioni terapeutiche si associano allo sviluppo di osteosarcomi secondari, specialmente nei pazienti affetti sarcoma di Ewing radiotrattati, che necessitano quindi di dosi terapeutiche (17). Tuttavia, è interessante notare che gli studi non hanno mostrato una maggiore incidenza di osteosarcoma nelle popolazioni esposte agli effetti della bomba atomica esplosa in Giappone (18).

2.4 SOTTOTIPI ISTOLOGICI

L'osteosarcoma, oltre ad essere distinto in primario e secondario, come già trattato nella sezione eziologia, può essere suddiviso in ulteriori sottoclassi basate sulla localizzazione anatomica all'interno delle componenti ossee (endomidollari o superficiali) e questi a loro volta ulteriormente categorizzati in base alla loro istologia.

I diversi sottotipi sono noti per avere storie naturali o comportamenti clinici divergenti (19, 20).

L'osteosarcoma convenzionale è la forma archetipica di osteosarcoma ed è ciò su cui la maggior parte della letteratura e le statistiche si basano. Si presenta come un tumore intramidollare ad alto grado, più comunemente localizzato nelle regioni metafisarie delle ossa lunghe. Ha natura aggressiva e di solito si presenta al momento della diagnosi con erosione della corteccia ossea ed invasione dei tessuti molli circostanti. Poiché è osteogenico, l'osso può apparire sclerotico o radiodenso ai raggi X. Istologicamente, mostrerà cellule pleomorfe con significative quantità di atipie cellulari, associate a produzione di matrice osteoide (1).

L'osteosarcoma convenzionale è istologicamente ulteriormente suddiviso in osteoblastico, fibroblastico o condroblastico in base all'aspetto della matrice di cui si circonda. La forma osteoblastica è due volte più comune rispetto agli altri due, e la distinzione è principalmente istologica, i trattamenti e la prognosi sono, infatti, simili tra loro (1).

L'osteosarcoma può anche presentarsi sia in forme istologiche insolite che mimare altre lesioni ossee, quali gli osteoblastomi, il sarcoma a cellule chiare, il tumore a cellule giganti, o i tumori epitelioidi. Il comportamento di queste varianti istologiche è simile a quella dell'osteosarcoma convenzionale, quindi sono considerati sottotipi (19-21).

L'osteosarcoma telangectasico ha caratteristiche molto particolari rispetto al sottotipo convenzionale. Sebbene possa essere riscontrato anche in metafisi delle ossa lunghe, assomiglia ingannevolmente alla radiografia ad una cisti ossea aneurismatica (ABC) (19, 22). Sebbene la presenza di matrice ossea maligna all'interno della lesione possa aiutare a differenziarlo da un ABC, il più delle volte questa non è rilevabile (19). Le due entità possono essere distinte quindi in base all'esame istologico poiché l'osteosarcoma telangectasico avrà atipie cellulari e la formazione di osteoide all'interno del rivestimento (19). Si tratta di uno dei tipi più aggressivi a livello sia locale che sistemico di osteosarcoma (23). A causa della sua spiccata aggressività e conseguente distruzione ossea, molti pazienti di presentano al momento della diagnosi con fratture patologiche. In generale, il trattamento e la prognosi sono simili a quelli dell'osteosarcoma convenzionale.

L'osteosarcoma a piccole cellule è un raro sottotipo endomidollare, che comprende circa l'1% di tutti gli osteosarcomi (24). La sua caratteristica citologica è unica nella famiglia degli osteosarcomi e presenta molte somiglianze con il sarcoma di Ewing. Come l'osteosarcoma convenzionale, si trova in genere nella regione metafisaria delle ossa lunghe. Tuttavia, essi sono spesso associati a lisi della corteccia ossea e conseguente invasione dei tessuti molli con grandi masse infiltranti che ricordano il sarcoma di Ewing (22-24).

Alla biopsia, sono osservabili molte piccole cellule blu rotonde, tuttavia la loro caratteristica peculiare, oltre alla produzione di materiale osteoide, è la presenza di "spindle" all'interno del

tumore che lo differenzia dagli altri istotipi di osteosarcoma (24). È interessante notare che risulta tipicamente positivo alla colorazione per CD99 ed è stata dimostrata la presenza della traslocazione t (11; 22), comunemente presente nel sarcoma di Ewing. Dal momento che queste caratteristiche non si trovano in altri tipi di osteosarcomi, alcuni autori hanno ipotizzato che questo sottogruppo possa in realtà far parte della famiglia dei tumori di Ewing / PNET. Questo è ovviamente un argomento di fondamentale importanza da approfondire in quanto i protocolli di trattamento sono differenti tra i due tipi di tumori (19).

L'osteosarcoma centrale a basso grado è l'unico sottotipo endomidollare che, essendo istologicamente di basso grado, è più indolente in termini di progressione. Tipicamente si presenta nel femore e nella tibia, come l'osteosarcoma convenzionale.

Le sue caratteristiche radiografiche sono variabili e può presentarsi con un bordo sclerotico, alludendo alla sua progressione lenta. Si può avere un aspetto a "vetro smerigliato", presentazione simile alla displasia fibrosa, ma la presenza di perturbazioni della corticale può fornire un indizio sulla malignità di tale lesione (22). Istologicamente, le cellule hanno meno atipie rispetto alla maggior parte degli altri osteosarcomi e di solito è presente uno stroma fibroso. Nonostante la loro natura indolente, questi tumori devono essere trattati con un'ampia resezione in quanto hanno una elevata incidenza di recidiva quando non adeguatamente asportati (19).

Gli osteosarcomi superficiali includono il parostale, il periostale, ed i tumori superficiali ad alto grado. Si distinguono per la loro localizzazione tipica sulla superficie dell'osso, in assenza di invasione del canale midollare a differenza dell'osteosarcoma convenzionale. Essi tendono inoltre ad essere più indolenti e il loro trattamento, quindi, tende generalmente a limitarsi ad un'ampia escissione chirurgica.

Gli osteosarcomi parostali o juxtacorticali furono descritti la prima volta da Geschickter e Copeland nel 1951 (25). Sono lesioni a lenta crescita presenti sulla superficie dell'osso. Sono più comunemente localizzati a livello del femore distale posteriormente, tanto da rendere una lesione in questa zona quasi patognomonica per questo tipo di tumore (26). Clinicamente, i pazienti notano una massa indolente che cresce lentamente nel cavo popliteo. Le radiografie comunemente rivelano una lesione sclerotica, liscia, ben delimitata. La lesione può sembrare attaccata all'osso solo in una piccola porzione ed esserne separata da una linea sottile radiotrasparente. Se abbastanza grandi, possono crescere sia longitudinalmente che circonferenzialmente attorno all'osso (27).

Mentre in alcuni casi possono invadere il canale midollare negli stadi avanzati di malattia, la maggior parte di queste neoplasie rimangono limitate alla superficie ossea, e questa caratteristica distintiva è importante, al fine di differenziarli dagli osteocondromi benigni. Istologicamente, dimostrano trabecole ossee mature disposte in modo parallelo, tale caratteristica istologica può

simulare la formazione periostale di nuovo osso. Possono avere una delimitazione osteoblastica, ma l'osso non è organizzato in un modello lamellare. Inoltre, ci saranno alcune prove di cellule fusiformi con lievi atipie cellulari. Come nel caso dell' osteocondroma, ci può essere la presenza di tessuto cartilagineo, ma non ci sarà evidenza di continuità con gli elementi midollari (19). Citogeneticamente, questi tumori sono associati a cromosomi ad anello in sovrannumero più comunemente sul cromosoma 12 (20). Questi tumori indolenti sono in genere trattati con un'ampia resezione chirurgica e successiva ricostruzione con buoni risultati. Tuttavia, esiste un sottotipo dedifferenziato con maggiore atipie cellulari che ha un tasso di recidiva e di metastasi più alto che richiede di essere trattato come l'osteosarcoma convenzionale (26-28).

Gli osteosarcomi periostali sono un'altra variante di superficie. Essi si presentano più comunemente lungo la diafisi delle ossa lunghe con una predilezione per la tibia. Hanno una presentazione clinica simile agli osteosarcomi parostali con masse a crescita lenta ed indolori.

Radiograficamente, sono caratterizzati dalla presenza di un innalzamento periostale ed in segno tipico a raggera costituito a spicolature ossee perpendicolari all'asse maggiore della sede di insorgenza. Si presentano caratteristicamente con un pattern misto litico e blastico (27). Istologicamente sono caratterizzati dall'abbondante presenza di tessuto cartilagineo, per tale ragione vengono definiti come osteosarcomi condroblastici a grado intermedio (19). Il trattamento è chirurgico e consiste in una chirurgia altamente demolitiva.

L'ultima variante di superficie è l'osteosarcoma ad alto grado superficiale. Questi tumori si trovano sulla superficie delle ossa lunghe e, dato l'elevato grado, possono crescere più rapidamente e causare più dolore rispetto alle altre lesioni superficiali. Il loro aspetto radiografico è variabile e spesso è caratterizzato dalla compresenza di regioni litiche e blastiche contemporaneamente (22).

Istologicamente, mostrano le tipiche atipie cellulari associate ai tumori ad alto grado (19). Sono principalmente localizzati sulla superficie ossea, ma erodono la corticale ossea più frequentemente rispetto agli altri osteosarcomi superficiali che hanno un andamento più indolente. Il trattamento per questo particolare sottotipo è identico a quello per l'osteosarcoma convenzionale con un'ampia resezione e chemioterapia.

Va notato che, sebbene rarissimi, osteosarcomi extrascheletrici sono stati descritti nei tessuti molli (29). Più comunemente si presentano alle estremità, ma sono stati riportati nel seno, cuore, e del colon tra gli altri organi viscerali (5, 29-31). Ci può essere una associazione con pregresse radiazioni. Sono di origine mesenchimale, di alto grado, e producono istologicamente il caratteristico tessuto osteoide. Il trattamento è simile ad altri sarcomi dei tessuti molli e include la resezione, il trattamento chemioterapico ed eventualmente il trattamento radioterapico (5).

2.5 PRESENTAZIONE CLINICA

Il sintomo d'esordio più frequente che porta i pazienti affetti da osteosarcoma ad effettuare indagini diagnostiche è la sintomatologia algica nella sede di insorgenza della neoplasia. Generalmente, l'insorgenza del dolore è correlata alle dimensioni della neoplasia, le lesioni di piccole dimensioni sono, infatti, generalmente asintomatiche. Tuttavia, col progredire della crescita neoplastica e la distruzione dell'osso circostante la sintomatologia dolorosa si fa progressivamente più viva. La maggior parte dei pazienti descrivono tale dolore come un sordo e persistente, esacerbabile con l'attività, ma comunque presente anche a riposo o di notte quando il paziente sta cercando di dormire. Pur non tipicamente associati con trauma, molti pazienti possono associare il dolore a qualche evento traumatico pregresso.

Alcuni pazienti, inoltre, possono riferire l'insorgenza in una massa palpabile che protrude dislocando i tessuti molli circostanti. Questo è ovviamente più frequente nelle neoplasie che originano in ossa superficiali, e permettono una diagnosi più precoce. Al contrario, ci può essere un ritardo diagnostico in quei pazienti che presentano neoplasie con sedi di insorgenza più profonde come ad esempio le ossa del bacino.

In termini di sintomi sistemici, la maggior parte dei pazienti non riportano febbre o significativo calo ponderale a meno che la malattia non sia molto avanzata.

Gli esami di laboratorio non si sono dimostrati utili nella diagnosi di osteosarcoma. Tuttavia, è consigliabile valutare i livelli basali di fosfatasi alcalina, LDH ed emocromo per valutare l'andamento della malattia. La fosfatasi alcalina sierica e l'LDH, in particolare, possono essere utilizzati come valutazione del trend durante trattamento ed alcuni studi hanno suggerito una correlazione prognostica negativa con valori elevati alla valutazione basale (32, 33).

2.6 TRATTAMENTO

Lo standard di trattamento dell'osteosarcoma ad alto grado è rappresentato dalla combinazione di chirurgia e chemioterapia. Scopo della chirurgia è quello di rimuovere con margini chirurgici adeguati il tumore e preservare al contempo la migliore funzione alla parte operata. Quando questo non sia pianificabile alla valutazione prechirurgica, l'amputazione deve essere raccomandata. In casi selezionati l'intervento di giroplastica deve essere proposto. I margini chirurgici vengono definiti secondo la classificazione di Enneking (34) in radicali, ampi, marginali, intralesionali e contaminati. Un intervento chirurgico è considerato adeguato quando il tumore viene interamente rimosso con margini ampi o radicali. La determinazione dei margini chirurgici deve essere frutto della stretta collaborazione fra chirurgo e patologo. La valutazione finale dei margini chirurgici può

richiedere ulteriori interventi fino a giungere ad una amputazione in caso di residui macroscopici. Non vi sono attualmente criteri univoci relativamente alla scelta del tipo di ricostruzione.

Completata l'eventuale chemioterapia primaria, l'intervento chirurgico sarà preceduto da ristadiatione locale con RM \pm TC. Nelle forme localizzate è consigliabile la ripetizione di TC torace per escludere la comparsa di metastasi polmonari. La chemioterapia è parte integrante del trattamento dell'osteosarcoma ad alto grado. Può essere utilizzata preoperatoriamente e comunque sempre utilizzata postoperatoriamente. Stante l'elevato rischio di sterilità maschile secondaria al trattamento chemioterapico si raccomanda di segnalare a tutti i soggetti maschi adulti in età fertile la possibilità della conservazione dello sperma. Ai minori tale opzione è da proporre sentito il parere dei genitori. Non vi sono indicazioni di un aumentato rischio di menopausa anticipata in adolescenti e giovani donne secondario alla chemioterapia.

L'uso di chemioterapia primaria può indurre modificazioni nel tumore primitivo che consentono un più esteso ricorso ad una chirurgia conservativa. I farmaci utilizzati nel trattamento dell'osteosarcoma sono il methotrexate ad alte dosi, il cisplatino, l'adriamicina, l'ifosfamide usata singolarmente o in associazione ad etoposide (35). Sarà presto disponibile per il trattamento delle forme localizzate, in associazione alla chemioterapia, il muramiltripeptide (MEPACT).

Evidenze da un unico studio randomizzato depongono per un vantaggio in termini di sopravvivenza, particolarmente se utilizzato in combinazioni chemioterapiche che utilizzano l'ifosfamide. Non vi sono comunque chiare evidenze di quali pazienti possano maggiormente beneficiare del farmaco. Sono da incoraggiare studi clinici di conferma e per l'identificazione di sottogruppi che ne traggano un maggiore beneficio (36). Sulla base di una decisione condivisa, tenendo conto del rapporto costo/beneficio, un suo uso individualizzato può essere preso in considerazione. Un suo uso in pazienti in fase avanzata deve essere considerato sperimentale. Non esistono chiare evidenze circa la migliore combinazione chemioterapica possibile.

Nei pazienti con osteosarcoma delle estremità non metastatici, i migliori risultati riportati in letteratura (sopravvivenza libera da eventi a 5 anni del 65%) sono ottenuti con combinazioni con MTX-CDP-ADM \pm IFO (36). Non esistono evidenze sulla necessità di un trattamento chemioterapico differenziato in funzione della sede. L'uso di infusione intraarteriosa di cisplatino aumenta la probabilità di avere una buona risposta istologica, ma non vi sono evidenze che possa migliorare la sopravvivenza (35). La chemioterapia primaria consente la valutazione della sensibilità del tumore ai farmaci utilizzati mediante lo studio istologico del pezzo di resezione. La necrosi indotta dalla chemioterapia primaria è il principale fattore condizionante la prognosi nell'osteosarcoma non metastatico dell'estremità (37).

Non esistono evidenze che il trattamento chemioterapico debba essere differenziato in funzione dell'età, almeno fino ai 40 anni (38). Il trattamento chemioterapico deve sempre essere raccomandato a prescindere dall'età di insorgenza della malattia. Adattamenti nel programma chemioterapico proposto dovranno essere posti in essere in funzione dell'età e delle condizioni generali del paziente. La valutazione della risposta alla chemioterapia primaria deve essere eseguita in centri dotati di adeguata esperienza.

La classificazione più largamente adottata in Italia prevede una valutazione percentuale della necrosi. La risposta istologica viene definita buona quando la percentuale di necrosi chemio-indotta è uguale o superiore al 90% (pazienti *good responders*) Strategie miranti a recuperare pazienti *poor responders* modificando la terapia post operatoria (terapia di salvataggio) sono state utilizzate, ma non vi è dimostrazione che esse aumentino l'efficacia della terapia (39).

Non vi è evidenza circa la durata ottimale e la dose cumulativa di farmaci da utilizzare, tuttavia i principali studi riportati in pazienti di età inferiore ai 40 anni hanno utilizzato dosi cumulative di Methotrexate almeno di 60 g/m², Cisplatino 500-600 mg/m², Adriamicina 350-450 mg/m², Ifosfamide almeno 30 g/m² per una durata di circa 9 mesi. Non vi è evidenza che un'intensificazione di trattamento mediante una compressione dell'intervallo grazie all'uso di fattori di crescita possa migliorare la prognosi (39).

2.6.1 Pazienti con metastasi sincrone

Lo standard di trattamento è rappresentato dalla combinazione di chirurgia e chemioterapia. La chemioterapia precede di norma il trattamento chirurgico. L'obiettivo della chirurgia è quello della rimozione di tutti i focolai evidenti di malattia (40). Il trattamento del tumore primitivo deve seguire gli stessi criteri e le stesse raccomandazioni date per le forme localizzate. Il trattamento chirurgico delle metastasi polmonari è raccomandato in caso di risposta o stazionarietà di malattia dopo chemioterapia preoperatoria (41).

Il trattamento chirurgico delle metastasi polmonari è sconsigliato in caso di progressione di malattia o in caso di malattia extrapolmonare non suscettibile di trattamento chirurgico. Non vi sono evidenze che un trattamento diverso e più intenso da quello somministrato ai pazienti con malattia localizzata possa offrire un vantaggio in termini di sopravvivenza. Si raccomanda che questi pazienti vengano trattati all'interno di studi clinici (41, 42).

2.6.1.1 Osteosarcoma multicentrico

I trattamenti chirurgici e chemioterapici attualmente disponibili possono influire sulla durata della sopravvivenza del paziente, ma non ne modificano la prognosi. Questi pazienti sono candidabili a trattamenti sperimentali da associare agli approcci tradizionali chemioterapici data l'elevata

probabilità di ottenere risposte clinico-radiografiche dopo terapia standard. La chirurgia potrà essere un'opzione da valutare caso per caso in relazione all'estensione di malattia e al quadro clinico avendo come finalità il controllo dei sintomi e la qualità di vita. La radioterapia può rappresentare un'opzione (vedi radioterapia nell'osteosarcoma) (42).

2.6.2 Recidiva locale

L'incidenza di recidive locali in forme delle estremità è in recenti casistiche del 5-8%. In circa il 50% dei casi si associa a metastasi. In caso di recidiva locale associata a metastasi la probabilità di sopravvivenza a tre anni è inferiore al 10%. La qualità dei margini chirurgici è il principale fattore condizionante la recidiva locale. Anche la necrosi chemio-indotta è un fattore condizionante il rischio di recidiva locale. In caso di recidiva locale il trattamento chirurgico deve essere valutato da un chirurgo esperto (43). Non ci sono evidenze che un trattamento demolitivo nel caso di recidive locali agli arti sia in grado di modificare la prognosi in questi pazienti. Nella scelta dell'opzione chirurgica la qualità di vita del paziente rappresenta un elemento determinante. Non vi sono evidenze che un trattamento chemioterapico sia in grado di modificare la sopravvivenza dei pazienti liberi da malattia dopo chirurgia per la recidiva. In caso di recidiva locale concomitante a metastasi il trattamento chemioterapico viene di norma associato (44).

2.6.3 Metastasi metacrone

2.6.3.1 Metastasi polmonari

In caso di metastasi polmonari isolate la chirurgia rappresenta il trattamento standard. Si raccomanda che i pazienti con recidiva polmonare vengano trattati all'interno di studi clinici. Intervallo libero, numero di noduli e reseccabilità sono i principali fattori condizionanti la prognosi in questi pazienti. In caso di metastasi monolaterali, non vi è evidenza che un approccio chirurgico che consenta una palpazione del polmone contro laterale possa rappresentare un vantaggio in termini di sopravvivenza (45). La metastasectomia mediante uso di video toracosopia non è raccomandata. In caso metastasi polmonari la metastasectomia reiterata è sempre raccomandata ovunque tecnicamente fattibile. C'è evidenza che il trattamento chemioterapico possa offrire un vantaggio in termini di durata della sopravvivenza qualora non sia possibile rendere chirurgicamente liberi da malattia il paziente. Nei pazienti chirurgicamente liberi da malattia un trattamento chemioterapico post operatorio non è dimostrato che possa influenzare la durata della sopravvivenza. Non vi sono evidenze certe in favore di uno specifico schema di trattamento di seconda linea. Gli schemi più frequentemente adottati prevedono l'uso di alte dosi di ifosfamide e carboplatino ed etoposide (41, 46).

2.6.3.2 Metastasi extrapolmonari

La comparsa di metastasi extrapolmonari, più frequentemente a livello scheletrico, rappresenta un evento raro, ma rende la prognosi particolarmente severa. Il numero delle lesioni e la possibilità di trattarle chirurgicamente sono fattori condizionanti la prognosi e la durata della sopravvivenza. La chirurgia delle metastasi è raccomandata in tutte le situazioni in cui è ipotizzabile una rimozione chirurgica completa della malattia metastatica oppure in caso di metastasi sintomatiche. La strategia chirurgica deve sempre privilegiare trattamenti conservativi e qualità di vita del paziente. La radioterapia delle lesioni scheletriche è una possibile opzione in caso di non fattibilità chirurgica. Non vi è evidenza di trattamenti chemioterapici in grado di modificare la probabilità di sopravvivenza. Questi pazienti sono candidati a trattamenti sperimentali (47).

2.6.4 Radioterapia nell'Osteosarcoma

In caso di situazioni cliniche non suscettibili di trattamento chirurgico anche demolitivo, la radioterapia a dosaggi superiori a 60 Gray è un'opzione terapeutica che deve essere valutata. Nelle localizzazioni assili la radioterapia può essere presa in considerazione nelle situazioni in cui dall'intervento chirurgico non si attendono margini adeguati sia pre che post operatoriamente. Tale approccio deve essere riservato a centri con specifica esperienza nel trattamento radioterapico dei sarcomi. La radioterapia può essere presa in considerazione a scopo antalgico nelle sedi ossee sia primitive che secondarie non altrimenti trattabili (48).

2.6.5 Nuove sperimentazioni terapeutiche

Uno studio sull'inibitore di mTOR (ridaforolimus) nei pazienti con sarcoma metastatico ha suggerito un'attività potenziale di questa classe di composti in pazienti con osteosarcoma (49), aumentando la possibilità di utilizzare gli agenti di questa classe di farmaci in pazienti con malattia metastatica; dal momento che il tasso di risposta RECIST in questo studio è stato molto basso, però, gli inibitori di mTOR rimangono in fase di sperimentazione.

Tra gli altri agenti interessanti che possono avere utilità clinica troviamo gli inibitori del recettore del fattore di crescita I insulino-simile (IGF-IR), poiché la segnalazione IGF è fondamentale per la formazione ossea durante lo sviluppo. Sono stati completati i primi studi con una varietà di anticorpi monoclonali e piccole molecole inibitrici della IGF-IR, con risultati sostanzialmente deludenti anche per la combinazione di un inibitore mTOR e un inibitore IGF-IR (50).

Uno studio che ha valutato l'applicabilità dell'aggiunta del trastuzumab alla chemioterapia standard per i pazienti con osteosarcoma HER2-positivo è stato appena completato dal Children Oncology Group(COG) (51). I risultati di questo studio non sono ancora disponibili.

2.6.5.1 I bifosfonati

Numerosi studi *in vitro* e su modelli xenotrapiantati supportano il concetto che i bifosfonati hanno attività contro l'osteosarcoma da soli o in combinazione con chemioterapia (52); la sicurezza della combinazione pamidronato con la chemioterapia nei pazienti con osteosarcoma di nuova diagnosi è stata dimostrata in un piccolo studio di fase II (52). Tuttavia, fino a quando non saranno disponibili ulteriori dati, questo approccio non dovrebbe essere considerato al di fuori del contesto di una sperimentazione clinica. La COG sta valutando la fattibilità di aggiunta di acido zoledronico alla chemioterapia standard per i pazienti con osteosarcoma metastatico.

2.6.5.2 Immunoterapia

Risposte immunitarie possono influenzare la sopravvivenza dei pazienti con osteosarcoma. Linfociti citotossici sono presenti in tali pazienti (53, 54), e in almeno uno studio, il grado di infiltrazione linfocitica correla con la sopravvivenza (54). Questi risultati hanno spinto i ricercatori a esplorare una varietà di approcci di immunoterapia per i pazienti con osteosarcoma in fase avanzata.

L'aggiunta di Bacillo di Calmette-Guerin (BCG) e interferone non ha migliorato la sopravvivenza quando aggiunto alla chemioterapia multiagente (55). Tuttavia, come osservato in precedenza, il muramil tripeptide-fosfatidil-etanolamina liposomiale (mifamurtide), un agente derivato dal BCG che attiva i macrofagi e aumenta i livelli di citochine circolanti (56), è stato studiato in uno studio randomizzato, di cui sopra, in cui sono stati assegnati i pazienti, usando un disegno fattoriale 2 x 2, alla chemioterapia standard con o senza ifosfamida e quindi di ricevere o non ricevere mifamurtide (37). L'aggiunta di mifamurtide alla chemioterapia standard ha migliorato significativamente la sopravvivenza globale, ma c'era solo una tendenza verso un miglioramento della sopravvivenza libera da eventi. Tuttavia, quando l'analisi è stata limitata a 91 pazienti con malattia metastatica al momento della diagnosi, c'era solo un trend non statisticamente significativo verso un miglioramento della sopravvivenza libera da eventi a cinque anni (42 contro 26 per cento) e la sopravvivenza globale (53 contro 40 per cento) che ha favorito mifamurtide (57). Pertanto, il ruolo di mifamurtide nei pazienti con osteosarcoma metastatico rimane incerto e un ulteriore studio randomizzato sembra necessario.

Un altro approccio immunoterapico che viene perseguito per la malattia metastatica polmonare è l'inalazione di aerosol di fattori stimolanti le colonie granulocitarie e macrofagiche (GM-CSF). GM-CSF stimola la proliferazione e la differenziazione delle cellule progenitrici ematopoietiche e aumenta l'attività funzionale dei neutrofili, monociti, macrofagi e cellule dendritiche. I primi dati che utilizzano aerosol GM-CSF in una varietà di tumori con metastasi polmonari suggerito potenziale efficacia (58). Tuttavia, i dati preliminari dello studio condotto su 43 pazienti con recidiva polmonare da osteosarcoma del gruppo americano [AOST] sembra non mostrare beneficio

dall'inalazione GM-CSF (59). Non c'era infatti alcun rilevabile effetto immunostimolante sulle metastasi polmonari. L'inalazione di GM-CSF non è un approccio standard e deve essere considerato solo nel contesto di una sperimentazione clinica.

2.6.5.3 Studi in vitro su possibili nuove targeted therapies nell'osteosarcoma

In questi ultimi anni, la ricerca di base sull'osteosarcoma ha compiuto numerosi passi in avanti, portando alla scoperta di diversi recettori tirosin-chinasici overespressi in questo tipo di tumore. Tra questi recettori si annoverano: KIT, Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) -2, -3, Platelet derived growth factor (PDGFR)- β e c-MET (2, 60). Questa overespressione è stata correlata con la comparsa di metastasi e scarsa sopravvivenza in pazienti con osteosarcoma. Per questo motivo, con il fine di scoprire nuove strategie terapeutiche, diversi gruppi di ricerca hanno iniziato numerose sperimentazioni di nuovi farmaci biologici su modelli in vitro e in vivo di osteosarcoma. Ad esempio il sorafenib, un inibitore di RAF, VEGFR-2/3, FLT-3, KIT, FGFR-1, RET, MCL- 1 e PDGFR- β ha mostrato una forte inibizione della proliferazione e l'induzione di apoptosi in linee cellulari di osteosarcoma (61). Inoltre, la combinazione di sorafenib e everolimus, un inibitore di mTOR, ha aumentato l'effetto antiproliferativo e proapoptotico, impedendo la crescita tumorale e riducendo la capacità migratoria e metastatica in modelli murini di osteosarcoma (62). Un altro inibitore multi-chinasico, il sunitinib (anti- PDGFR α/β , VEGFR1/2/3, KIT, FLT3, CSF- b1R e RET), ha la capacità di inibire la proliferazione del tessuto tumorale primario e di ridurre la neo-vascularizzazione tumorale in modelli intratibiali di osteosarcoma in topi SCID (63, 64). Anche il pathway di hedgehog, essendo deregolato nell'osteosarcoma, è stato esplorato come un possibile target terapeutico. In particolare, la sua inibizione mediante ciclopamina o triossido di arsenico, ha mostrato una forte inibizione della crescita tumorale e un'induzione di apoptosi in modelli cellulari di osteosarcoma (65, 66.). Oltre ai recettori di membrana, sono stati presi in considerazione come obiettivi terapeutici anche alcuni target intracellulari. Tra questi ci sono le istone deacetilasi (HDAC); la loro inibizione causa alle cellule di osteosarcoma un decremento della capacità di riparazione del DNA, sensibilizzandole al trattamento con radiazioni ionizzanti e doxorubicina, e provoca una riduzione dell'espressione di FLIP, un regolatore negativo della caspasi 8 (67-70). Trametinib, AZD8330 e TAK-733, tre diversi inibitori di MEK1/2, hanno mostrato un effetto inibitorio e un'attivazione di apoptosi in modelli cellulari di osteosarcoma con iperattivazione del pathway ERK (71).

Sebbene diversi studi abbiano dimostrato una buona efficacia di questi farmaci in modelli preclinici di osteosarcoma, l'alta eterogeneità caratteristica di questo tipo tumorale, sia intra- che inter-paziente, non permette di trovare facilmente dei nuovi regimi terapeutici (72). In particolare, questa

eterogeneità, può essere suddivisa e schematizzata in tre diversi livelli. Il primo livello riguarda l'alto numero di sottotipi istologici di osteosarcoma, come precedentemente descritto. Il secondo livello è riferito all'organizzazione genomica, alle aberrazioni geniche e allo stato mutazionale del tumore; in particolare, nell'osteosarcoma, e più in generale nei tumori ossei, è molto frequente il fenomeno della *chromothripsis*, un catastrofico evento di instabilità genomica che causa riarrangiamento genomico. Il terzo livello di eterogeneità riguarda il sistema immunitario del paziente colpito da osteosarcoma, che può giocare un ruolo fondamentale sia nella crescita tumorale sia nella risposta ai trattamenti (73). Il microambiente tumorale dell'osteosarcoma e in particolare le cellule dell'osso, invece, grazie alla loro fisiologia più omogenea, potrebbero rappresentare un utilissimo target terapeutico da prendere in considerazione. Inoltre, è stato dimostrato che il microambiente osseo può comunicare e interagire con le cellule di osteosarcoma, giocando un ruolo chiave nella loro proliferazione e capacità metastatica (74). In questo scenario, il recettore RANK (receptor activator of nuclear factor κ B), espresso dalle cellule di osteosarcoma, e il suo ligando RANKL, prodotto dagli osteoblasti, potrebbero esercitare un effetto protumorale sull'osteosarcoma (75). Infatti, l'espressione di RANK è significativamente associata ad una sopravvivenza libera da malattia più breve in pazienti con osteosarcoma (76). Tutti questi dati insieme fanno capire come ci sia un urgente bisogno di identificare nuovi target molecolari, non solo nelle cellule tumorali, ma anche nel microambiente tumorale.

2.6.5.4 Il pathway di c-MET come target terapeutico nell'osteosarcoma

La tirosinchinasi c-MET è il recettore per il fattore di crescita epatocitario (HGF), una citochina con attività antiapoptotica, pro-migratoria e mitogena. L'attivazione di c-MET comporta l'attivazione di plurime cascate di segnale intracellulari come MEK, PI3K e Jak/Stat. L'attivazione di c-MET può distruggere l'interazione cellula-cellula facilitando la migrazione cellulare (77). Questo effetto promigratorio mediato da c-MET gioca un ruolo fondamentale durante l'embriogenesi ed è attivo nell'adulto durante i meccanismi di riparazione cellulare (77).

È stato inoltre dimostrato che il pathway HGF/c-MET ha un'azione protettiva in numerose patologie degenerative come la cirrosi epatica, le nefropatie e la fibrosi polmonare (78, 79). Inoltre, c-MET è espresso nelle cellule endoteliali e gioca un ruolo fondamentale nella via del segnale pro-angiogenico (80).

Messe insieme, queste caratteristiche fanno di c-MET un tipico candidato per l'aberrazione oncogenica e la trasformazione neoplastica.

Fin dalla sua scoperta, alterazioni al livello del recettore c-MET sono state descritte in numerosi tumori. Queste consistono in mutazioni attivanti, duplicazioni geniche o attivazioni trascrizionali, che causano una sovra espressione di c-MET wild-type. L'attivazione di c-MET può sia verificarsi

durante la cancerogenesi primaria sia come evento secondario, determinando un'ulteriore progressione del fenotipo maligno (77).

Mutazioni attivanti sono state identificate nel carcinoma renale papillare ereditario e sporadico (81, 82); mentre la sovra espressione del recettore c-MET è stata rilevata in molti tumori, tra cui tumore del pancreas, cancro della prostata, carcinoma polmonare non a piccole cellule (non-small cells lung cancer, NSCLC) e carcinoma gastrico (81-84).

Nel NSCLC, la sovra espressione del recettore c-MET rappresenta un meccanismo di resistenza secondaria durante trattamento con antagonisti EGFR (85); nel carcinoma della prostata, invece, il recettore c-MET è sovra espresso durante la castrazione ormonale farmacologica, e livelli di espressione più elevati sono anche associati con l'insorgenza di metastasi a livello osseo e linfonodale (86, 87).

Sono state introdotte differenti strategie volte a utilizzare il recettore c-MET come bersaglio per la terapia antitumorale tra cui: il blocco del ligando tramite antagonisti HGF o anticorpi monoclonali contro c-MET e HGF. Diverse sostanze sono attualmente in fase di sviluppo presso varie aziende farmaceutiche e molte sono testate all'interno studi clinici.

Il recettore c-MET svolge un ruolo fondamentale anche nell'insorgenza e nella progressione tumorale dell'osteosarcoma.

L'importanza di c-MET nell'insorgenza dell'osteosarcoma è stata già dimostrata in diversi studi di tipo preclinico. Ad esempio, l'overespressione di c-MET in osteoblasti umani primari causa la loro conversione in cellule di osteosarcoma, mostrando un fenotipo trasformato (89, 89). L'inibizione di c-MET è una strategia terapeutica già testata contro l'osteosarcoma. Il crizotinib, un potente inibitore di c-MET e ALK, ha mostrato risultati incoraggianti nell'inibire le proprietà maligne di cellule di osteosarcoma *in vitro* e nel contrastare la crescita tumorale *in vivo* in modelli murini xenotrapiantati con osteosarcoma (90). Nonostante i promettenti risultati, a questo studio preclinico non sono seguiti degli studi clinici.

3 CABOZANTINIB

Il Cabozantinib (CBZ) (fig. 1) sviluppato da Exelexis, è un inibitore tirosin-chinasico ad ampio spettro che presenta attività contro il recettore c-MET, ma anche contro VEGFR2, FLT3, c-KIT e RET. È stato il primo inibitore per il recettore c-MET disponibile per via orale ad entrare studi clinici nel 2005.

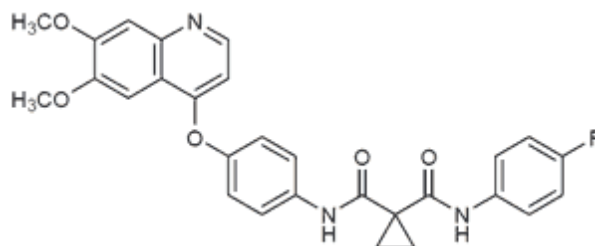


Figura 1: formula strutturale del CBZ

3.1 PROPRIETÀ PRECLINICHE E FARMACOCINETICA

Il CBZ, inizialmente codificato come XL 184, è stato sviluppato da Exelexis (South San Francisco, CA). Esso ha dimostrato di avere attività inibitoria a dosi farmacologiche nei confronti dei recettori c-MET, VEGFR2, RET, KIT, FLT-3, AXL, e TIE-2 (tunica interna delle cellule endoteliali chinasi 2), chinasi che giocano tutte un ruolo nello sviluppo e nella progressione di diverse patologie tumorali. A livello preclinico, è stato dimostrato che il CBZ a basse concentrazioni diminuisce la fosforilazione del recettore c-MET nelle cellule nervose presenti alla periferia del tumore.

Studi con xenotrapianti in topi hanno dimostrato una riduzione della proliferazione cellulare, una ridotta densità vascolare e un aumento dell'apoptosi. Le dimensioni del tumore diminuivano in maniera dose-dipendente a seguito di trattamento con CBZ (91).

È stato dimostrato che il 20% dei livelli plasmatici di farmaco penetra la barriera emato-encefalica. In uno studio di fase I, è stata stabilita la farmacocinetica del CBZ. In tale contesto è stata dimostrata la biodisponibilità orale, e la dose massima tollerata è stata di 175 mg una volta al giorno. Il picco plasmatico è stato raggiunto dopo 5 ore dalla somministrazione orale. L'emivita è stata di 91 ± 33 h (92).

3.2 STUDI CLINICI

3.2.1 Fase I

Lo studio di fase I di CBZ è stato effettuato per determinare la dose massima tollerata (MTD). Varie entità di tumori solidi sono stati inclusi in tale studio (92). La MTD è stata raggiunta dopo la

somministrazione di 175 mg al giorno. In seguito ai primi incoraggianti risultati sull'attività di questo farmaco nel carcinoma midollare della tiroide (MTC) la coorte di studio di questo trial fu ampliata. Un totale di 85 pazienti sono stati inclusi nel trial; 37 di questi avevano MTC. 35 dei 37 pazienti con MTC avevano malattia misurabile secondo i criteri RECIST. Tra questi, 10 hanno mostrato una risposta parziale e 25 avevano riduzione del tumore minore del 30% o stabilità di malattia per almeno 6 mesi. È interessante notare che, tre pazienti in risposta erano stati pretrattati con vandetanib o sorafenib (farmaci che come il CBZ hanno tra i target fondamentali RET e VEGFR). Questo supporta l'ipotesi che c-MET potrebbe essere un meccanismo di fuga per l'inibizione VEGFR.

È stata eseguita una genotipizzazione tumorale in 31 pazienti con MTC che ha mostrato la presenza di mutazioni RET in 25 dei 31 pazienti. Tuttavia, non vi era alcuna correlazione tra mutazioni e risposta clinica.

Il tumore di una paziente andata incontro a rapida progressione non mostrava alcuna mutazione attivante RET, bensì una mutazione di B-RAF, una proteina di trasduzione del segnale a valle di RET e c-MET. In un sottogruppo di pazienti con MTC (n = 15) analizzati per mutazioni di c-MET nel DNA tumorale, non sono state rilevate mutazioni.

La tossicità è risultata simile ad altri inibitori della tirosin chinasi VEGFR. Eventi avversi correlati al trattamento (AE) sono stati segnalati in 77 dei 85 pazienti (90%). Di questi, il 43% ha riferito eventi avversi di grado uno o due. Gli eventi avversi più frequenti sono stati: diarrea, rash, sindrome mano-piede, elevazione degli enzimi epatici, affaticamento, ipertensione, nausea, e mucosite. Un grado quattro AE era l'embolia polmonare attribuita all'azione del CBZ. Inoltre, tossicità dose-limitanti (DLT) sono state la sindrome mano-piede e innalzamento degli enzimi epatici.

3.2.2 Fase III EXAM Trial

Un ampio studio di fase III nel carcinoma midollare della tiroide è stato direttamente avviato in seguito alle entusiasmanti risposte viste in fase I. Il trial " Efficacy of XL184 in Advanced Medullary Thyroid Cancer (EXAM) " è stato uno studio randomizzato, in doppio cieco, controllato con placebo. Un totale di 330 pazienti con MTC sono stati randomizzati in un rapporto 2: 1 a CBZ rispetto al placebo (93, 94).

L'endpoint primario era la sopravvivenza libera da progressione (PFS). Gli endpoint secondari comprendevano la sopravvivenza globale (OS) ed il tasso di risposta. L'endpoint primario è stato raggiunto con una PFS mediana di 7,2 mesi nel braccio di trattamento rispetto a 4,0 mesi nel braccio placebo. La differenza ha raggiunto la significatività statistica con un hazard ratio di 0,28. Ad un anno, la PFS è stata del 47,3% nel braccio di trattamento contro 7,2% nel braccio placebo.

Tutti i sottogruppi hanno mostrato un aumento della PFS nel braccio di trattamento, compresi i pazienti che avevano ricevuto un precedente trattamento con inibitori di tirosin chinasi (TKI) o che riportavano mutazioni di RET.

Il tasso di risposta globale è stato del 28% nel gruppo CBZ contro lo 0% nel gruppo placebo ($p < 0,0001$); la durata della risposta era di 14,6 mesi, tale dato risultava simile sia nei pazienti con mutazioni di RET che wild type.

La ragione principale per la sospensione del trattamento è stata la progressione della malattia (20% nel braccio di trattamento contro il 60% nel braccio placebo). Gli eventi avversi sono stati motivo d'interruzione nel 16% e l'8% dei casi, rispettivamente. Gli eventi avversi sono stati più comuni nel braccio di trattamento con la diarrea e la sindrome mano-piede di tutti i gradi in più del 50% dei pazienti. Inoltre, la fatica, l'ipertensione, e mucosite stati riportati più spesso nel braccio di trattamento.

La valutazione della calcitonina dopo 12 settimane di trattamento ha dimostrato una forte correlazione con risposta. La calcitonina è scesa in media del 45% nel braccio di trattamento ed è aumentata in media del 57% nel braccio placebo.

3.2.3 Trials clinici

3.2.3.1 COMET-1: cabozantinib e tumore alla prostata refrattario alla castrazione

In base alle risposte osservate nel trial di fase I, è stato condotto uno studio di fase II in pazienti con tumore della prostata refrattario alla castrazione (CRPC) (95).

I pazienti hanno ricevuto CBZ a 100 mg al giorno per 12 settimane. Quindi, i pazienti con malattia stabile sono stati randomizzati a CBZ versus placebo in un rapporto 1: 1.

Gli endpoint primari erano la risposta obiettiva a 12 settimane dopo la randomizzazione e la PFS. La randomizzazione è stata interrotta precocemente a causa dei risultati osservati nel braccio ricevente il trattamento con CBZ.

Gli arruolati erano 171 uomini con CRPC. Un miglioramento alla scintigrafia ossea è stato osservato nel 68% dei pazienti, tra cui la risoluzione completa nel 12%. La PFS mediana era 23,9 settimane (95% CI, 10,7-62,4 settimane) con CBZ e 5,9 settimane (95% CI, 5,4-6,6 settimane) con il placebo (hazard ratio, 0.12; $P < 0.01$).

Il dolore osseo è migliorato nel 67% dei pazienti valutati, con una diminuzione dell'utilizzo di antidolorifici nel 56%.

Gli avventi avversi di grado III più comuni sono stati affaticamento (16%), l'ipertensione (12%), e sindrome mano-piede (8%). Modifiche del PSA non hanno dimostrato correlazione con i cambiamenti radiografici in questo studio.

Analisi sullo stato mutazionale e di espressione di c-MET non sono state eseguite. Sulla base dei risultati clinici positivi, due studi di fase III (COMET-1 e COMET-2) sono stati avviati arruolando pazienti con CRPC in progressione dopo chemioterapia a base di taxani. Il braccio di controllo era costituito da placebo nello studio COMET-1 e Mitoxantrone più prednisone nello studio COMET-2. Lo scorso settembre 2014 Exelixis ha reso noti i dati top line dello studio di fase III denominato COMET-1, che ha valutato l'impiego di CBZ in uomini con CRPC. Il farmaco non ha raggiunto l'end point primario che consisteva nell'aumento della sopravvivenza globale. Lo studio COMET-1 è stato condotto su pazienti con tumore della prostata la cui malattia era progredita dopo un trattamento con docetaxel, abiraterone e/o enzalutamide, cioè le migliori terapie oggi disponibili. La sopravvivenza globale del gruppo CBZ è stata di 11 mesi contro i 9,8 mesi del gruppo di controllo trattato con prednisone (hazard ratio 0.90; 95% confidence interval 0.76 – 1.06; p value 0.212). Leggermente migliori sono stati i dati riguardanti la sopravvivenza libera progressione: 5,5 mesi nel gruppo CBZ verso 2,8 mesi nel gruppo prednisone (hazard ratio 0.50; 95% confidence interval 0.42 – 0.60; p value <0.0001).

3.2.3.2 *METEOR trial: cabozantinib e carcinoma a cellule chiare renale*

METEOR è un trial open-label di CBZ nei pazienti con carcinoma renale metastatico, condotto da circa 200 centri in 26 paesi (96). Sono stati arruolati 650 pazienti con RCC a cellule chiare che hanno ricevuto almeno un trattamento VEGFR-TKI e che sono andati in progressione in seguito a questo. L'arruolamento dei pazienti è stato esteso all'Europa occidentale, Nord America e Australia, ed i pazienti sono stati stratificati in base al numero di precedenti terapie VEGFR-TKI ricevute ed i criteri di rischio comunemente applicati e sviluppati da Motzer et al. per il RCC (97).

I pazienti sono stati randomizzati 1: 1 a ricevere 60 mg di CBZ al giorno o 10 mg di everolimus al giorno. Il cross-over non è consentito tra i bracci dello studio. L'endpoint primario è stata la sopravvivenza libera da progressione (PFS), mentre l'endpoint secondario la sopravvivenza globale (OS). Come risultato, la PFS media è stata 7.4 mesi per CBZ e 3.8 mesi per everolimus, con un tasso di progressione o morte dei pazienti che hanno ricevuto CBZ del 42% più basso rispetto a everolimus. La risposta obiettiva è stata 21% per CBZ contro il 5% di everolimus (P<0.001).

3.2.4 Trials clinici ongoing

3.2.4.1 *CELESTIAL TRIAL: cabozantinib e HCC*

CELESTIAL (NCT01908426) è uno studio randomizzato, in doppio cieco, placebo controllato di CBZ nei pazienti con HCC avanzato attualmente in corso fino a raggiungimento di 200 centri a

livello globale in un massimo di 30 paesi. Il processo prevede l'arruolamento di 760 pazienti con HCC avanzato che hanno ricevuto una precedente sorafenib.

I pazienti saranno randomizzati 2: 1 a ricevere 60 mg di CBZ al giorno o placebo. L'endpoint primario è l'overall survival, e gli endpoint secondari includono tasso di risposta obiettiva (ORR) e la sopravvivenza libera da progressione (PFS). Endpoint esplorativi includono i risultati riferiti dai pazienti, biomarcatori, e la sicurezza.

Sulla base dei dati degli studi clinici disponibili, l'endpoint primario assume una OS mediana di 8,2 mesi per il braccio placebo. Un totale di 621 eventi forniscono lo studio con 90% di potenza per rilevare un aumento del 32% in OS (HR = 0,76). Analisi intermedi sono previste dopo che sono stati osservati 50% e il 75% degli eventi, rispettivamente.

3.2.4.2 CABONE TRIAL: cabozantinib e osteosarcoma

Allo stato attuale è in corso in Francia uno studio di fase II sponsorizzato dal National Cancer Institute dal titolo: A Phase 2 Study of XL184 (Cabozantinib) in Treating Patients With Relapsed Osteosarcomas and Ewing Sarcomas (NCT02243605). L'endpoint primario di questo studio, per quanto riguarda l'osteosarcoma, è la non progressione, definita come risposta completa o parziale o come malattia stabile (tempo a 6 mesi). Come endpoint secondario lo studio si promette di valutare la *best overall response* al tempo di due anni. Lo studio è iniziato nel dicembre 2014 e tra i diversi centri verranno arruolati circa 90 pazienti.

4 IL MICROAMBIENTE OSSEO

4.1 IL BALANCE RANKL/OPG

RANKL è un fattore osteoclastogenico potente che, in combinazione con il fattore stimolante le colonie macrofagiche (M-CSF), induce la formazione di osteoclasti *in vitro* (98).

RANKL è espresso come forma solubile o come proteina di membrana sulla superficie degli osteoblasti, osteociti e cellule stromali del midollo (99). Inoltre, la maggior parte dei fattori osteotropici come IL-1, IL-11, prostaglandina E2 e 1,25- (OH) 2D3 inducono la stimolazione osteoclastica legandosi alle cellule stromali midollari, che a loro volta esprimono un aumento dei livelli di forme solubili o di membrana di RANKL. RANKL si lega poi al suo recettore RANK, presente sulla superficie dei precursori degli osteoclasti e sugli osteoclasti maturi, inducendo la formazione e l'attivazione degli osteoclasti (100, 101). L'attività di RANKL può essere bloccata dal recettore solubile osteoprotegerina (OPG), con conseguente prevenzione del riassorbimento osseo (102).

L'OPG, membro della superfamiglia del recettore TNF, è prodotta da molti tipi di cellule, come le cellule stromali del midollo osseo e gli osteoblasti. Tale recettore, legandosi a RANKL, blocca la fase di fusione / differenziazione dei precursori degli osteoclasti, piuttosto che la fase di proliferazione. Così, il sistema RANKL / RANK / OPG rappresenta un importante meccanismo di equilibrio tra riassorbimento e riapposizione ossea (102).

Numerosi studi hanno dimostrato l'importanza proprio di tale balance RANKL/OPG nella regolazione del metabolismo osseo associata a neoplasie (103). In uno studio immunocistochimico prospettico, Good e collaboratori hanno dimostrato la positività per RANKL in tumori ossei benigni e maligni primari e secondari (13 casi su 16) (104).

Più recentemente, Grimaud e colleghi hanno dimostrato tramite Real Time PCR ed ELISA che il rapporto RANKL / OPG era significativamente aumentato nei pazienti che soffrono di grave osteolisi associata a tumore rispetto ai tessuti sani (105).

La costante co-localizzazione di OPG con RANKL ha suggerito l'ipotesi che l'espressione di OPG possa riflettere un meccanismo omeostatico dello scheletro per controbilanciare l'aumento del riassorbimento osseo (105).

4.2 IL CIRCOLO VIZIOSO

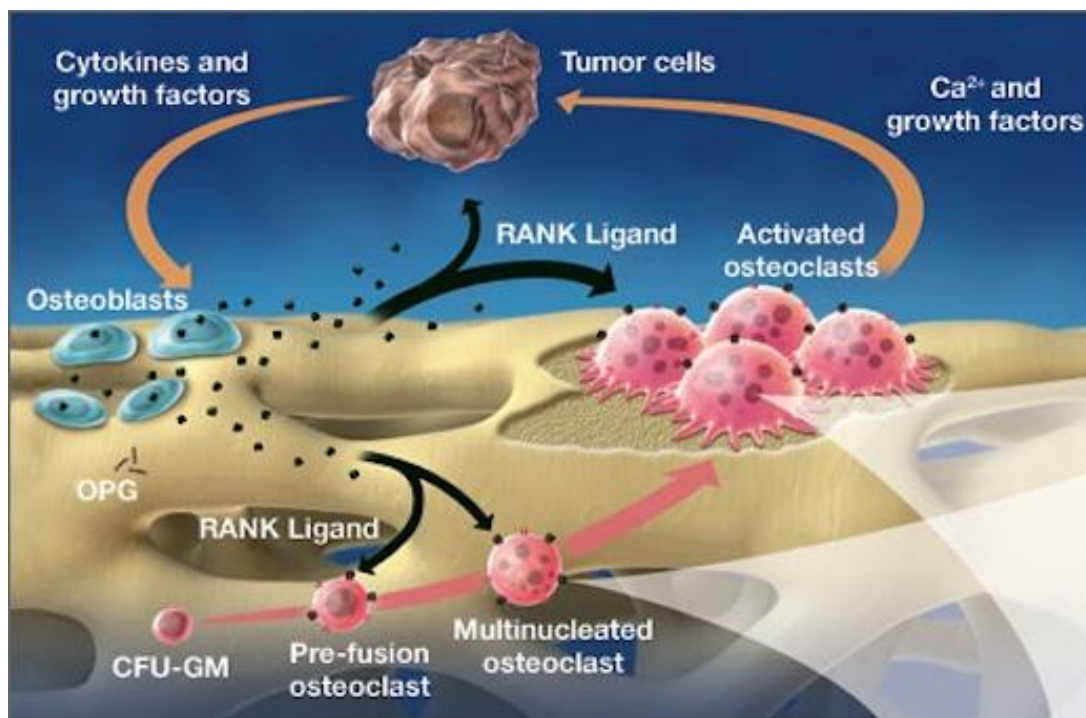


Figura 2: illustrazione grafica del circolo vizioso delle metastasi ossee; le cellule tumorali secernono fattori che stimolano l'attività degli osteoblasti, che, producendo RANKL, attivano a loro volta gli osteoclasti; questi, riassorbendo la matrice ossea causano il rilascio di diversi fattori che aumentano la proliferazione delle cellule tumorali, chiudendo quindi il circolo vizioso.

L'invasione del tessuto osseo da parte di una neoplasia benigna o maligna, primaria o secondaria, influisce immediatamente sull'equilibrio tra riassorbimento e riapposizione ossea. In alcuni rari casi lo sviluppo della neoplasia porta alla formazione di matrice ossea in assenza di osteolisi, come in caso di metastasi osteoblastiche da adenocarcinomi prostatici (21). Nella maggior parte dei casi, tuttavia, la manifestazione ossea di patologie neoplastiche è caratterizzata da manifestazioni prevalentemente di tipo osteolitico (106). Questo equilibrio in favore del riassorbimento osseo può risultare dall'acquisizione di nuove proprietà dalle cellule ossee: aumento dell'attività proteolitica, alterazioni nell'espressione di fattori locali o a livello sistemico.

Un'ipotesi è che questa instabilità genomica delle cellule tumorali (metastatiche o non) possa causare delle mutazioni che influenzino le proprietà cellulari peculiari del tessuto osseo. Un'altra ipotesi è quella che riguarda la formazione di un microambiente che sia più favorevole al riassorbimento osseo (107).

Qualsiasi sia il motivo scatenate, l'osteolisi neoplastica è gravata da un'altra morbilità. Un dolore osseo importante (soprattutto nelle neoformazioni ossee benigne ed in circa il 65% delle lesioni metastatiche), fratture patologiche, sindromi da compressioni nervose ed importanti ipercalcemie (solo nelle lesioni secondarie) sono frequentemente i primi sintomi che portano i pazienti ad indagare le eventuali lesioni ossee.

L'osteolisi è uno step fondamentale necessario prima che le cellule tumorali possano crescere ed invadere la matrice mineralizzata ossea. Tuttavia nonostante studi *in vitro* hanno dimostrato che cellule di neoplasia mammaria avevano la capacità di riassorbire direttamente l'osso, la maggior parte dei dati ha dimostrato che alla base di questo riassorbimento osseo indotto dalla neoplasia vi è una stimolazione diretta degli osteoclasti da parte della neoplasia stessa (108).

L'azione tumorale nel promuovere l'attività osteoclastica può essere sia a livello locale sia sistemica (attraverso la produzione di ormoni come il paratiroideo PTH-rP, responsabile dell'ipercalcemia maligna associata a neoplasie) (109). Altri fattori prodotti dalle cellule tumorali che possono stimolare il riassorbimento osseo osteoclastico includono: interleuchina-1 (IL-1), IL-6, fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF- α) e proteina-1-alpha dei macrofagi infiammatori (MIP-1 α) (109). Questi agenti, rilasciati nel microambiente osseo, agiscono sulle cellule stromali osteoblastiche per aumentare indirettamente la produzione di osteoclasti (109).

Degno di nota tra questi agenti è il Receptor Activator di NF-kB Ligand (RANKL), recentemente aggiunto alla famiglia del gene del TNF. Numerosi dati presenti in letteratura hanno provato il ruolo di RANKL nel mediare la distruzione ossea associata a neoplasie, sia primitive che secondarie (109).

L'analisi istologica di metastasi ossee osteolitiche indica che la distruzione ossea è mediata da osteoclasti anziché esclusivamente direttamente dalle cellule tumorali. L'interazione tra cellule tumorali, fattori umorali derivanti dal tumore e il microambiente del midollo osseo sono fondamentali per l'avvio e la promozione delle neoplasie scheletriche (108).

Queste osservazioni hanno condotto all'ipotesi di un circolo vizioso alla base delle lesioni neoplastiche osteolitiche (110, 111): le cellule neoplastiche secernono fattori solubili nel microambiente osseo (come ormoni, citochine e fattori di crescita), questi mediano il riassorbimento osseo in modo indiretto tramite la stimolazione osteoblastica.

Gli osteoblasti, stimolati dai fattori di crescita neoplastici, aumentano la produzione di RANKL, stimolando così la proliferazione e l'attivazione degli osteoclasti (112-116). Tuttavia, altri dati hanno mostrato che le cellule tumorali sono in grado di produrre autonomamente RANKL, agendo direttamente sulla differenziazione e attivazione degli osteoclasti, come riportato nel mieloma multiplo (117), nel cancro alla prostata (118, 119) o nel neuroblastoma umano (120).

RANKL, espresso da cellule stromali o direttamente dal cancro, può quindi legarsi al suo recettore RANK sulla superficie dei precursori degli osteoclasti e, in presenza di M-CSF, promuove la differenziazione e la fusione di queste cellule per produrre osteoclasti multinucleati funzionali. Il riassorbimento osteoclastico, a sua volta, rilascia fattori di crescita dalla matrice ossea, in grado di attivare le cellule tumorali. In particolare, il Trasforming Growth Factor-beta (TGF- β) è abbondante nella matrice ossea ed è rilasciato come conseguenza del riassorbimento osseo osteoclastico (121).

Oltre alle sue ricche riserve di TGF- β , l'osso contiene altri fattori di crescita che possono agire come fattori di crescita tumorale, tra cui BMP (Bone Morphogenetic proteine), fattori di crescita dei fibroblasti-eparina vincolanti, ed il fattore di crescita insulino-simile (122).

In questo modello, RANKL è stato descritto come l'effettore finale dell'osteoclastogenesi. Le conseguenze di questo circolo vizioso sono un aumento delle cellule tumorali proliferanti in parallelo con uno squilibrio del rapporto tra formazione e riassorbimento osseo, a favore della distruzione ossea (111, 112).

Nel microambiente osseo, la proliferazione delle cellule tumorali non è sostenuta solamente dai fattori rilasciati dalla matrice ossea durante il riassorbimento osteoclastico, ma anche dal RANKL rilasciato dagli osteoblasti o dalla cellule tumorali stesse. È stato dimostrato, infatti, sia a livello preclinico che clinico, che l'attivazione del recettore RANK aumenta la proliferazione e l'aggressività delle cellule tumorali in diversi tipi di cancro (123-125). In particolare, è stato dimostrato che le cellule di osteosarcoma umano esprimono in modo funzionale la proteina RANK (75, 76). In uno studio del 2014, Horvath e collaboratori hanno dimostrato che il 69.2% degli osteosarcomi esprimono la proteina RANK e questa espressione è associata ad una sopravvivenza libera da malattia più breve (76). L'espressione funzionale di RANK rappresenta, quindi, un fattore prognostico negativo ed è anche in grado di modulare la risposta dei pazienti con osteosarcoma alla chemioterapia (76).

5 SCOPO DEL LAVORO

L'osteosarcoma è la più frequente tra le neoplasie a primitività ossea. È una neoplasia ad insorgenza bimodale con un primo picco nell'età adolescenziale ed un secondo picco di insorgenza nell'età adulta. Il trattamento chirurgico radicale rappresenta il gold standard terapeutico per questa neoplasia, la sua sensibilità agli agenti antineoplastici standard, infatti, è modesta. Negli ultimi anni, quindi, gli studi in letteratura si sono concentrati nella ricerca e caratterizzazione di nuovi target molecolari eventualmente utilizzabili come obiettivi terapeutici al fine di aumentare la risposta ad un trattamento sistemico e allo stesso tempo ridurre le importanti tossicità tipicamente correlate agli agenti chemioterapici classici. Queste caratterizzazioni hanno mostrato la centralità dei pathways a valle di c-MET nello sviluppo, accrescimento e metastatizzazione dell'osteosarcoma.

Il CBZ, farmaco di ultima generazione, inibisce diversi recettori tirosin-chinasici tra cui proprio c-MET. Questo farmaco si è dimostrato efficace nel trattamento di diversi tumori, alcuni dei quali ad alta probabilità di metastatizzazione ossea.

Il nostro studio, quindi, si è posto un duplice obiettivo. Il primo fine è stato quello di valutare l'effetto di CBZ su modelli cellulari di osteosarcoma, con la possibilità di individuare una nuova efficace targeted therapy in questo setting tumorale. La seconda parte di questo lavoro è, invece, volta a determinare l'impatto di CBZ sul microambiente osseo, determinando l'effetto di tale farmaco sul differenziamento e sull'attività di osteoblasti e osteoclasti umani primari. Il risultato di questa seconda parte non solo darebbe un'idea delle modificazioni a livello osseo nel caso di un utilizzo di CBZ nella cura dell'osteosarcoma, ma porterebbe anche una nuova conoscenza e interpretazione dei dati dei numerosi studi clinici descritti in precedenza riguardo l'utilizzo di questo farmaco con la comprensione dei dati riguardanti gli end points ossei. Infine, questo studio si ripropone l'obiettivo di valutare l'effetto di CBZ su un modello *in vitro* di co-cultura tra osteosarcoma e microambiente osseo, riproducendo, in un ambito il più possibile simile allo scenario fisiologico, il complesso network di interazioni esistente tra il tumore e la propria nicchia neoplastica.

6 MATERIALI E METODI

6.1 COLTURE CELLULARI E TRATTAMENTI FARMACOLOGICI

Come modello di osteosarcoma umano sono state usate quattro diverse linee cellulari: HOS, MG-63, Saos-2 e U-2 OS (ATCC). Le prime due linee sono state coltivate in RPMI 1460, supplementato con il 10% di siero fetale bovino (FBS). Le U-2 OS e le Saos-2 sono state coltivate in terreno McCoy's 5a Medium Modified, supplementato, rispettivamente, con il 10 e 15 % di FBS. A tutti i terreni sono stati aggiunti 100 unità/mL di penicillina e 100 mg/mL di streptomicina. Le cellule sono state coltivate con il 5% di CO₂ a 37°C e sono state splittate due volte a settimana con divisioni 1:4/6. In tutti gli esperimenti effettuati per questo lavoro di tesi sono state utilizzate cellule con passaggio compreso tra il 5° ed il 15°. Il trattamento con CBZ è stato eseguito 6 ore dopo la semina cellulare per non interferire con l'adesione e lasciato fino ad ogni end point necessario. In ogni esperimento è stato trattato il campione di controllo con un uguale ammontare di dimetilsolfossido (DMSO).

Gli osteoblasti primari (OBLs) umani sono stati differenziati a partire da cellule staminali mesenchimali umane (hMSCs). Tali cellule sono state isolate da campione di tessuto osseo corticale precedentemente trattato due ore a 37°C con una soluzione 1,5 mg/mL di collagenasi II e tripsina 1X per consentire la digestione della matrice minerale al fine di isolare la componente cellulare. Al termine di tale trattamento il materiale risultante dalla digestione è stato conservato in flask con aggiunta di terreno di coltura (Alpha-MEM supplementato con 10% di FBS, 100 unità/mL di penicillina, 100 mg/mL di streptomicina e 2 mM di L-glutammina) al fine di permettere la migrazione della componente cellulare dalla matrice residua alla superficie della flask (out growth). Il differenziamento osteoblastico è stato effettuato seminando 25.000 hMSCs / cm² in terreno Alpha-MEM supplementato con 10% di FBS, 100 unità/mL di penicillina, 100 mg/mL di streptomicina, 2 mM di L-glutammina, 10 mM di β-glicerofosfato, 50 μM di acido ascorbico e 100 nM di desametasone. Il protocollo differenziativo è stato eseguito per 28 giorni ed il terreno è stato sostituito ogni 3-4 giorni. Ogni esperimento è stato eseguito con hMSCs provenienti da quattro differenti donatori sani. Il trattamento con CBZ è stato eseguito l'ultima settimana di differenziamento. In ogni esperimento è stato trattato il campione di controllo con un uguale ammontare di dimetilsolfossido (DMSO).

Osteoclasti umani primari (OCLs) sono stati differenziati a partire da monociti isolati da cellule mononucleate di sangue periferico (PBMCs) di donatori sani di sangue. In breve, il sangue da buffy coat è stato diluito 1:1 con PBS e centrifugato mediante gradiente di densità (FICOLL). Le cellule

mononucleate sono state isolate, lavate tre volte con PBS e marcate con microbeads CD14-conjugated, in modo da isolare la componente monocitaria. Le cellule CD14⁺ sono state seminate alla densità di 10⁶/cm² in terreno RPMI 1460 supplementato con 10% di FBS, 100 unità/mL di penicillina, 100 mg/mL di streptomina, 2 mM di L-glutamina, 25 ng/mL macrophage colony stimulating factor (MCSF) e 50 ng/mL RANKL. Il protocollo differenziativo è stato eseguito per 14 giorni ed il terreno è stato sostituito ogni 3-4 giorni. Ogni esperimento è stato eseguito con monociti provenienti da quattro differenti donatori sani. Il trattamento con CBZ è stato eseguito durante tutto il protocollo differenziativo e in ogni esperimento è stato trattato il campione di controllo con un uguale ammontare di dimetilsolfossido (DMSO).

6.1 TRASFEZIONE

Le cellule di osteosarcoma sono state trasfettate con particelle lentivirali (MISSION® pLKO.1-puro-CMV-TurboGFP™ Positive Control Transduction Particles) contenenti il gene per la green fluorescent protein (GFP) al fine di generare una linea cellulare con espressione costitutiva del gene GFP. In tale lentivirus è presente inoltre, un gene codificante per la resistenza alla puromicina (*puroR*), permettendo così la selezione delle cellule che hanno integrato il genoma lentivirale tramite la somministrazione della puromicina stessa. Le cellule sono state seminate in piastre da 96Well al 70-80% di confluenza; dopo 12 ore il mezzo di coltura è stato rimosso e sono stati aggiunti 90 µL di terreno fresco, 0,8 µL di polibrene (per indurre la permeabilizzazione delle membrane cellulari) e 10 µL della soluzione contenente le particelle lentivirali (0,5 MOI *multiplicity of infection*). Dopo 48 ore è stata aggiunto 2µg/mL di puromicina per selezionare le cellule trasfettate.

6.2 ANALISI DEL DIFFERENZIAMENTO OSTEOLASTICO

6.2.1 Colorazione citochimica per la fosfatasi alcalina leucocitaria (ALP)

Questa metodica consente di valutare il differenziamento delle hMSCs in osteoblasti cresciute in mezzo osteogenico attraverso la rilevazione dell'attività della fosfatasi alcalina, marcatore specifico osteoblastico.

Le cellule sono state fissate con soluzione fissante contenente formaldeide al 3,7%, soluzione citrato e acetone (Sigma Aldrich). Successivamente le cellule sono state incubate con soluzione colorante alcalina costituita da soluzione alcalina FBB, soluzione di nitrito di sodio e soluzione alcalina di naftolo AS-BI per 15 minuti (tutti i reagenti sono contenuti nel kit Fosfatasi Alcalina, Sigma Aldrich). Dopo la colorazione sono state acquisite immagini tramite microscopio ottico

(Nikon Eclipse Ti). La valutazione quantitativa dell'intensità di colorazione e, quindi, della positività per il marcatore ALP, è stata calcolata utilizzando il software di elaborazione digitale di immagini ImageJ.

6.2.2 Colorazione citochimica per depositi di calcio (ALIZARIN RED)

Per la valutazione della capacità di mineralizzazione della matrice, le cellule mesenchimali, differenziate in osteoblasti, sono state fissate con 10% di formaldeide e successivamente incubate con una soluzione di Alizarin red S 2% a pH 4.2 (Sigma Aldrich). Dopo 45 minuti le cellule sono state osservate al microscopio ottico per individuare i nuclei di mineralizzazione costituiti da precipitati di calcio-fosfato, riconoscibili come noduli rossi. La colorazione Alizarin Red è stata letta e quantificata a 550 nm allo spettrofluorimetro (Tecan). Inoltre, dopo la colorazione sono state acquisite immagini tramite microscopio a contrasto di fase (Nikon Eclipse Ti).

6.3 ANALISI DEL DIFFERENZIAMENTO OSTEOCLASTICO

6.3.1 Colorazione citochimica per la fosfatasi acida tartrato resistente (TRAP)

Questa metodica consente di verificare l'avvenuto differenziamento osteoclastico dopo 12-14 giorni di coltura attraverso la rilevazione dell'attività fosfatasi acida dell'enzima TRAP, marcatore specifico degli osteoclasti. Le cellule sono state fissate con soluzione fissante contenente formaldeide al 3,7%, soluzione citrata e acetone (Sigma Aldrich). Per rilevare i livelli di TRAP è stata preparata una soluzione costituita da sodio acetato 2.5 M, naftol AS-BI acido fosforico, nitrito di sodio, acido tartarico, e sali fast garnet GBC (reagenti contenuti nel kit Fosfatasi Acida Sigma Aldrich). Le cellule sono state incubate con questa soluzione a 37°C per 1 h. Il naftolo AS-BI rilasciato mediante idrolisi enzimatica, si accoppia al fast garnet GBC formando depositi insolubili nei siti di attività. Quindi solo le cellule contenenti una fosfatasi acida che non risente della presenza dell'acido tartarico mostreranno la corretta colorazione, costituita da granuli citoplasmatici tra il violaceo e il rosso scuro. Al termine della colorazione i campioni sono stati lavati con acqua bi-distillata (ddH₂O) e lasciati asciugare all'aria. Sono state acquisite delle immagini tramite microscopio ottico (Nikon Eclipse Ti). Per avere una stima quantitativa del differenziamento osteoclastico le cellule multinucleate TRAP positive con 3 o più nuclei che, per definizione vengono considerati osteoclasti maturi, sono state contate.

6.3.2 Saggio di riassorbimento osseo

Per analizzare l'attività osteoclastica i monociti sono stati seminati in pozzetti rivestiti da una superficie di fosfato di calcio inorganico (Corning Osteo Assay Surface) che mima la matrice ossea

e differenziati in senso osteoclastico con l'aggiunta delle citochine M-CSF (25 ng/mL) e RANKL (50 ng/mL). Al termine del protocollo di differenziamento il medium è stato aspirato e gli osteoclasti sono stati rimossi mediante l'aggiunta di una soluzione di ipoclorito di sodio al 10% per 5 min e successivi lavaggi in ddH₂O. Sono state acquisite delle immagini tramite microscopio ottico (Nikon Eclipse Ti) e l'area delle lacune presenti (ossia la superficie totale riassorbita) è stata quantificata usando il software di elaborazione digitale di immagini ImageJ.

6.3.3 Saggio di proliferazione (curve di crescita)

Come saggio di proliferazione cellulare sono state effettuate delle curve di crescita. Cellule alla confluenza dell'80% sono state staccate con tripsinizzazione standard e seminate alla concentrazione di 6.000 cellule / cm² in piastre da 6 Well. Le cellule sono state staccate e contate tramite camera di Burker ogni 24 ore fino al raggiungimento delle 168 ore dal tempo di semina. I diversi trattamenti con CBZ sono stati somministrati sei ore dopo la semina cellulare in modo da non influenzarne l'adesione. Questo esperimento è stato eseguito quattro volte. Il saggio è stato effettuato anche su campione di controllo trattato con DMSO.

6.4 SAGGI DI VITALITÀ

6.4.1 MTT assay

Per valutare la vitalità cellulare in seguito a trattamento con CBZ è stato eseguito il saggio MTT (Sigma Aldrich) sia sulle linee cellulari di osteosarcoma che su OBLs e osteoclasti. Il saggio MTT (3,(4,5-dimethylthiazol-2)2,5 difeniltetrazolium bromide) è un test colorimetrico per misurare l'attività di enzimi mitocondriali che riducono l'MTT a formazano, facendo virare il composto da un colore giallo ad un colore blu-violetto intenso, processo che si verifica solo nelle cellule metabolicamente attive.

Le cellule sono state seminate in piastra da 96 well e opportunamente trattate. A ogni time point è stato tolto da ciascun pozzetto il mezzo di coltura e sono stati aggiunti 90 µL di terreno di crescita completo più 10 µL di substrato MTT; la piastra è stata incubata in atmosfera umidificata a 37°C per 4 h. Dopo il tempo di incubazione, il sovrantante è stato rimosso e sono stati aggiunti 100 µL di solvente MTT. L'assorbanza o densità ottica è stata letta a 570 nm allo spettrofluorimetro (Tecan). L'esperimento è stato ripetuto tre volte. Il saggio è stato effettuato anche su campione di controllo trattato con DMSO.

6.4.2 Live/Dead® assay

Come ulteriore verifica della vitalità degli OBLs in seguito a trattamento con CBZ, è stata eseguita la colorazione Live/Dead®, che consiste di due diverse sonde. La prima, chiamata calceina AM 2

μM , entra nelle cellule vitali dove è trattenuta grazie all'attività esterasica delle cellule e fluoresce intensamente alla lunghezza d'onda di 515 nm (verde). La seconda sonda, l'etidio bromuro 4 μM , entra nelle cellule solo se le membrane sono danneggiate (solo in caso di morte cellulare) e, intercalandosi al DNA, colora il nucleo delle cellule morte fluorescendo alla lunghezza d'onda di 635 nm (rosso).

6.5 ANALISI DEL CICLO CELLULARE

Per analizzare le diverse fasi del ciclo cellulare, le cellule di osteosarcoma sono state seminate in piastre petri da 50 cm^2 e, una volta adese, trattate con CBZ. Dopo 96 ore di trattamento, le cellule (10^6 cellule ogni campione) sono state staccate con tripsinizzazione standard, lavate con PBS 1X e fissate con EtOH 70% aggiunto goccia a goccia sul campione in agitazione. Una volta fissati, i campioni sono stati conservati a -20°C . Per l'analisi al citofluorimetro, i campioni in EtOH sono stati lavati con PBS 1X e incubati ON a 4°C con una mix di bromuro di etidio (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e RNasi (0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Finito il tempo di incubazione, le cellule sono state lavate con PBS 1X e analizzate al citofluorimetro FACSCanto™ II. Per ogni campione, sono stati acquisiti 10.000 eventi. L'esperimento è stato ripetuto tre volte per ogni linea cellulare.

6.6 WOUND HEALING ASSAY

Per valutare se il trattamento con CBZ avesse un effetto anche sulla migrazione delle cellule di osteosarcoma è stato utilizzato il wound healing assay. Le cellule di osteosarcoma precedentemente in adesione a confluenza dell'80% sono state staccate con tripsinizzazione standard e seminate in pozzetti da 6 Well al 90% di confluenza. Dopo 6 ore dalla semina cellulare, una volta avvenuta l'adesione, è stata creata, tramite puntale di una pipetta da 200 μL , una discontinuità nel monostrato cellulare. A questo punto è iniziato il trattamento con CBZ o DMSO come controllo. Sono state catturate immagini tramite microscopio a contrasto di fase (Nikon Eclipse Ti) al T0, a 20 e 40 ore per valutare l'avanzamento dei margini di migrazione cellulare. Tramite software NIS-Elements imaging è stata calcolata l'area residua libera da componente cellulare e tramite questa è stato quantificato il tasso di migrazione cellulare. Tale saggio è stato ripetuto tre volte.

6.7 ESTRAZIONE DELL'RNA E RETROTRASCRIZIONE

L'RNA totale è stato isolato da cellule di osteosarcoma, da OBLs e da OCLs, tutti coltivati in pozzetti da 6 Well, aggiungendo 1 ml di TRIZOL® Reagent (Invitrogen) ad ogni pozzetto. La soluzione è stata vigorosamente mescolata con pipetta in modo da indurre la lisi delle cellule, e infine il campione omogeneizzato è stato trasferito in provette RNasi-free e incubato per 5 minuti a

4°C per consentire la completa dissociazione dei complessi di nucleoproteine. Per la fase di separazione, 0,2 ml di cloroformio sono stati aggiunti alle provette. I campioni sono stati agitati vigorosamente per 10 secondi e centrifugati a 13.000 x g per 15 minuti. Dopo la centrifugazione, la miscela risultava separata in una fase rossa, una del fenolo-cloroformio, contenente proteine e lipidi, un'interfase di DNA ed una fase incolore acquosa. L'RNA rimane esclusivamente nella fase acquosa. La fase acquosa è stata accuratamente trasferita in una nuova provetta senza disturbare l'interfase. Per far precipitare l'RNA dalla fase acquosa, sono stati aggiunti 0,5 ml di alcool isopropilico. I campioni sono stati incubati a -4°C per 10 minuti e centrifugati a 13.000 g per 15 minuti. Il precipitato di RNA, invisibile prima della centrifugazione, forma un pellet gelatinoso sui lati e sul fondo della provetta. Al fine di eliminare completamente il surnatante, il pellet di RNA è stato lavato due volte con 1 ml di etanolo al 75%. I campioni sono stati mescolati centrifugati a 7500 x g per 5 minuti. Infine, l'RNA è stato diluito in acqua trattata con DEPC al fine di rimuovere DNAsi e RNAsi (15- 20 microlitri) e la quantificazione dell'RNA è stata effettuata utilizzando NanoDrop, considerando la densità ottica a 260 nm e 280 nm per determinare la concentrazione e la purezza del campione.

La reversione dell'RNA estratto in cDNA è stata effettuata tramite il kit "High Capacity cDNA Reverse Transcription" (Applied Biosystem). Per ogni campione da revertire è stata preparata una soluzione con la quantità di RNA da retro trascrivere in acqua RNase-free, per un volume totale di 10 µl. I volumi per campione sono: 2 µl di RT-buffer 10X, 0,8 µl di dNTP Mix 25X (100mM), 2 µl di RT-Random Primers 10X, 1 µl di Multiscribe Reverse Transcriptase 50 U/ µl, 4.2 µl di acqua RNase-free (volume totale pari a 10 µl). Ad ogni provette con l'RNA sono stati quindi aggiunti 10 µl di mix di reazione per un volume finale di 20 µl; infine le provette sono state poste in un termociclatore e programmati i seguenti step:

- 10 minuti a 25°C (per equilibrare la reazione)
- 120 minuti a 37°C (azione enzimatica)
- 5 minuti a 85°C (inattivazione dell'enzima)
- Hold a 4°C (conservazione).

6.8 REAL TIME PCR

Negli esperimenti descritti in questa tesi è stata utilizzata la tecnologia TaqMan: essa prevede l'impiego di oligonucleotidi sonda, complementari a geni bersaglio e coniugati in 5' a un colorante "reporter" fluorescente e in estremità 3' ad un "quencher". Il quencher assorbe e maschera la fluorescenza emessa dal reporter (eccitato dallo strumento) fino a quando l'attività esonucleasica 5'-

---3' della Taq DNA-polimerasi in fase di amplificazione non li separa. La fluorescenza rimane quindi per i primi 20 cicli circa ad un livello basale; quando invece la quantità di amplificato comincia a crescere in maniera esponenziale, si ha un corrispondente aumento della fluorescenza stessa. L'indicatore della quantità di cDNA di partenza è il cosiddetto ciclo soglia (Ct), ossia la frazione di ciclo in cui comincia l'aumento esponenziale. Il valore del Ct è inversamente proporzionale alla quantità di cDNA di partenza ed è da esso che parte l'elaborazione dei dati.

L'uso di geni di riferimento (housekeeping), che sono espressi costitutivamente nei vari tipi cellulari, permette di normalizzare i valori.

Per preparare la miscela dei componenti della reazione PCR, sono stati mescolati i seguenti reagenti in provette RNase-free: 10 µl di TaqMan Gene Expression Master Mix, 1 µl di sonda TaqMan, 5 µl di acqua RNase -free e 4 µl di cDNA, per un volume finale di 20 µl per reazione.

Le condizioni dei cicli termici sono stati impostati come segue: 10 minuti a 95°C, necessari per attivare l'enzima AmpliTaq Gold e 4° cicli di PCR composti da 15 secondi a 95°C per il processo di denaturazione e 1 minuto a 60°C per i passaggi di annealing/extension.

La qPCR è stata effettuata con la macchina 7900 HT Real Time PCR System (Applied Biosystem).

In questa tesi, i geni che sono stati analizzati utilizzando le sonde specifiche TaqMan (Applied Biosystem) sono *ALP*, *OCN*, *CATEPSINA K*, *c-MET*, *MMP-9*, *OPG*, *RANK*, *RANKL*, *OSX*, *RUNX2* e *TRAP*.

Le PCR sono state eseguite in triplicato per ogni campione ed i valori di Ct sono presi come valori medi dei triplicati. Si è proceduto, quindi, con il calcolo del deltaCt espresso come la differenza tra il Ct del gene target e quello dell'housekeeping (in questo caso *GUSb*). Successivamente i livelli di espressione sono stati poi espressi come 2-deltadeltaCt, valore definito "fold change", che quantifica l'incremento o decremento di espressione rispetto ad un campione scelto come "controllo". Tale metodica di studio è stata ripetuta tre volte. Il saggio è stato effettuato anche su campione di controllo non trattato.

6.9 ESTRAZIONE DELLE PROTEINE, QUANTIFICAZIONE E ELETTROFORESI

Cellule di osteosarcoma precedentemente seminate in piastre Petri da 50 cm² sono state trattate con CBZ alla concentrazione di 5 µM. Successivamente, a diversi time points, le cellule sono state staccate mediante uno screper e gli estratti proteici totali sono stati ottenuti lisando le cellule con 30 µL di RIPA Buffer (Sigma Aldrich) con l'aggiunta di un cocktail di inibitori di proteasi e di fosfatasi 2/3 (Sigma Aldrich). I campioni sono stati omogenati a 4°C, incubati per 15 minuti in

ghiaccio e centrifugati a 14.000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il sovrantante contenente le proteine totali è stato recuperato e si è proseguito con la determinazione della concentrazione proteica. La quantificazione delle proteine presenti nei vari campioni è stata realizzata con l'impiego del Kit DC Protein Assay (Bio-Rad). In particolare la quantificazione avviene mixando 5 µL di campione + 25 µL soluzione S^I (una miscela di reagente A (soluzione alcalina) + reagente S (in un rapporto di 20 µl di reagente S per ml di reagente A)) + 200 µL del reagente B (diluizione del Reagente di Folin). Il tutto è stato incubato al buio e in agitazione per 15 min. La lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro usa come lunghezze d'onda $\lambda = 750 \text{ nm}$. Per ogni lisato proteico sono stati caricati su gel 30/50 µg di proteine. I campioni sono stati preparati per il caricamento diluendoli 1:1 con Laemmli buffer e sono poi stati portati all'ebollizione per 5 min, brevemente centrifugati e quindi sottoposti ad elettroforesi. Tale metodica è stata ripetuta tre volte. Il saggio è stato effettuato anche su campione di controllo non trattato.

6.10 WESTERN BLOTTING

I lisati proteici sono stati sottoposti a corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide in sodio dodecilsolfato (SDS-PAGE) per ottenere la separazione delle proteine in base alle loro dimensioni.

Dopo l'elettroforesi SDS-PAGE, le proteine separate sul gel sono state trasferite su filtro di nitrocellulosa usando una cameretta di trasferimento "Trans-Blot" (Bio-Rad). L'avvenuto trasferimento delle bande proteiche è stato visualizzato mediante colorazione per 10 minuti del filtro di nitrocellulosa con colorante Rosso Ponceau. Il filtro è stato saturato mediante incubazione per 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione al 5% di latte (non-fat dry milk) in 1X PBS contenente 0.1% Tween-20 (PBS/T). I blots sono poi stati incubati overnight (ON) con i seguenti anticorpi primari diluiti in 2.5% di latte in PBS/T: anti- β -Actina (mouse, Sigma Aldrich), anti-c-Met (rabbit, Cell Signaling), anti-phospho c-Met Tyr1234/1235 (rabbit, Cell Signaling), anti-p44/42 ERK1/2 (rabbit, Cell Signaling), anti-phospho p44/42 ERK1/2 Thr202/Tyr204 (rabbit, Cell Signaling), anti-AKT pan (rabbit, Cell Signaling), anti-phospho AKT Thr308 (rabbit, Cell Signaling), anti-ULK1 (rabbit, SantaCruz), anti-Beclin 1 (rabbit, SantaCruz), anti-LC3 (rabbit, Sigma Aldrich) e anti RANK (rabbit, Abcam) Le membrane sono state successivamente incubate per 1h con anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (HRP) diluito in 2,5% latte scremato in PBS/T. Per ciascun anticorpo primario si è utilizzato uno dei due secondari rabbit-HRP (Cell Signaling) o mouse-HRP (Sigma Aldrich). I blots sono poi stati visualizzati mediante il metodo della chemiluminescenza (ECL). La rilevazione del segnale e l'analisi dei risultati sono stati eseguiti mediante il sistema Chemidoc (Bio-Rad) e il software di analisi Image Lab (Bio-Rad). L'esperimento è stato ripetuto tre volte.

6.11 IMMUNOFLUORESCENZA

Le cellule di osteosarcoma sono state seminate su chamber slide alla confluenza del 50 % e trattate con CBZ 6 ore dopo la semina. Al termine dell'esperimento le cellule sono state fissate con formaldeide 3.7% per 20 min a 37°C e permeabilizzate con 0.1% TRITON-X in PBS 1X per 10 min. Il blocking è stato effettuato per 45 min con BSA 3% a RT. I campioni sono stati quindi incubati con la mix fatta di anticorpo primario anti α -tubulina (mouse, Santa Cruz) e Falloidina TRITC-coniugata (Sigma Aldrich) per 1 ora 30 a 37°C, a cui è seguita l'incubazione con un anticorpo secondario anti-mouse Alexa fuor-488 per 1 ora a RT. Successivamente, i campioni sono stati controcolorati con DAPI 0.2 μ g/mL e le immagini sono state acquisite con un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse Ti.

6.12 ELISA

La quantificazione di RANKL e OPG secreti dagli OBLs è stata effettuata tramite saggio ELISA, utilizzando, rispettivamente, Total sRANKL ELISA kit (Immun Diagnostik) e Human Osteoprotegerin ELISA Kit (RayBio®). OBLs umani primari sono stati differenziati a partire da hMSCs e trattati con CBZ e DMSO come controllo nell'ultima settimana di differenziamento come precedentemente descritto. Al termine del protocollo differenziativo, i diversi sovranatanti sono stati raccolti, centrifugati (per eliminare residui cellulari), congelati rapidamente in azoto liquido e conservati a -80°C. Le cellule di ogni campione sono state contate ed è stato ricavato un fattore di normalizzazione per i risultati ottenuti.

6.13 CO-COLTURE

6.13.1 Co-culture osteoblasti/osteoclasti

OBLs umani primari sono stati differenziati a partire da hMSCs come precedentemente descritto. Il trattamento con CBZ (o DMSO come controllo) è stato effettuato durante l'ultima settimana di differenziamento. Al termine del differenziamento il layer di OBLs è stato lavato tre volte con PBS 1X con il fine di allontanare eventuali presenze di farmaco. Dopo i lavaggi, 10^6 CD14+ PBMCs / cm^2 sono state seminate direttamente sul layer di OBLs. La co-cultura è stata effettuata utilizzando come terreno RPMI 1460 supplementato con 10% di FBS, 100 unità/mL di penicillina, 100 mg/mL di streptomina, 2 mM di L-glutammina, e 1,25-diidrosivitamina D (aumenta la produzione di RANKL da parte degli OBLs (126, 127)) senza l'aggiunta di citochine esogene M-CSF e RANKL. Il terreno è stato cambiato ogni 3/4 giorni per un totale di 14. Al termine dell'esperimento è stata eseguita una colorazione TRAP per riconoscere gli osteoclasti.

6.13.2 Co-culture osteoblasti/cellule tumorali

OBLs umani primari sono stati differenziati a partire da hMSCs come precedentemente descritto. Il trattamento con CBZ (o DMSO come controllo) è stato effettuato durante l'ultima settimana di differenziamento. Al termine del differenziamento il layer di OBLs è stato lavato tre volte con PBS 1X con il fine di allontanare eventuali presenze di farmaco. Dopo i lavaggi, 2500 cellule di osteosarcoma GFP+ / cm² sono state seminate direttamente sul layer di OBLs. La co-cultura è stata effettuata utilizzando come terreno Alpha-MEM supplementato con 10% di FBS, 100 unità/mL di penicillina, 100 mg/mL di streptomicina e 2 mM di L-glutammina. Ogni 24 ore (a partire dal tempo 0 fino a 168 ore), sono state effettuate sia delle foto tramite microscopio a fluorescenza (Nikon Eclipse Ti) sia delle letture allo spettrofluorimetro (TECAN) con eccitazione 485 nm e emissione 535 nm.

6.14 ANALISI STATISTICA

I dati sono stati analizzati usando il test t di Student o il test ANOVA a una via seguito da post-hoc Tukey. Sia i grafici che l'analisi statistica sono stati effettuati con il programma GraphPad Prism (San Diego, CA).

7 RISULTATI

7.1 LE LINEE DI OSTEOSARCOMA ESPRIMONO IN MODO FUNZIONALE IL RECETTORE C-MET

Le quattro diverse linee di osteosarcoma HOS, MG-63, Saos-2 e U-2 OS sono state testate per l'espressione del recettore c-MET. Tutte le linee esprimono in modo funzionale il target del CBZ a livelli paragonabili tra loro (fig. 3). Nella linea MG-63 si nota la presenza di maggiori quantità della forma non modificata post-traduzionalmente pro-MET, mentre nella linea U-2 OS questa forma non è detectabile.

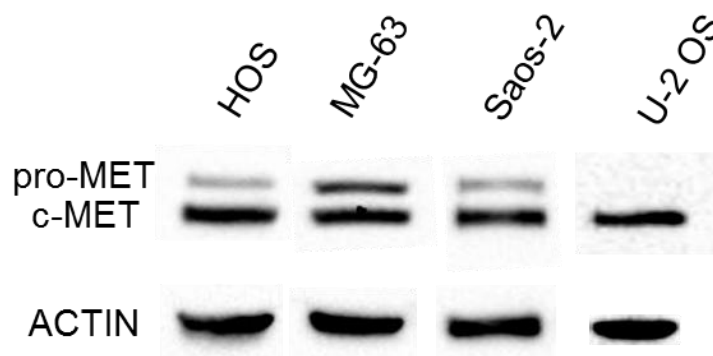


Figura 3: caratterizzazione delle linee di osteosarcoma in western blot per l'espressione del target molecolare di CBZ, il recettore c-MET. Tutte e quattro le linee cellulari esprimono buoni livelli della proteina. Nelle linee HOS, MG-63 e Saos-2 si nota la presenza della forma non matura del recettore chiamata pro-MET, che risulta assente nella linea U-2 OS.

7.2 CBZ INIBISCE LA PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE DI OSTEOSARCOMA IN UN MODO DOSE-DIPENDENTE

Per verificare l'effetto di CBZ sulla proliferazione cellulare, sono state effettuate delle curve di crescita sulle linee di osteosarcoma sotto trattamento con il farmaco. In base a diversi studi presenti in letteratura, sono state scelte tre diverse dosi di farmaco: 0.1, 1 e 5 μM . Il CBZ mostra un effetto inibitorio sulla proliferazione di tutte e quattro le linee che aumenta in modo proporzionale alla dose di farmaco (fig. 4). In particolare, la dose 5 μM inibisce in modo significativo la proliferazione HOS e MG-63 già a partire da 96 ore dall'inizio del trattamento (rispettivamente $P = 0.0003$ e 0.004). Tale inibizione rimane significativa anche nei successivi tempi sperimentali, causando di fatto un arresto quasi totale della proliferazione cellulare (rispettivamente $P = 0.0001$ e 0.0006). Nelle linee Saos-2 e U-2 OS sia la concentrazione 5 μM che 1 μM di CBZ è capace di inibire in modo significativo la proliferazione, ma solamente a 168 h dall'inizio del trattamento con $P = 0.005$

e 0.02 per le Saos-2 e $P = 0.0009$ e 0.004 per le U-2 OS. La concentrazione $0.1 \mu\text{M}$, invece, non mostra in nessun caso un'inibizione significativa della proliferazione cellulare.

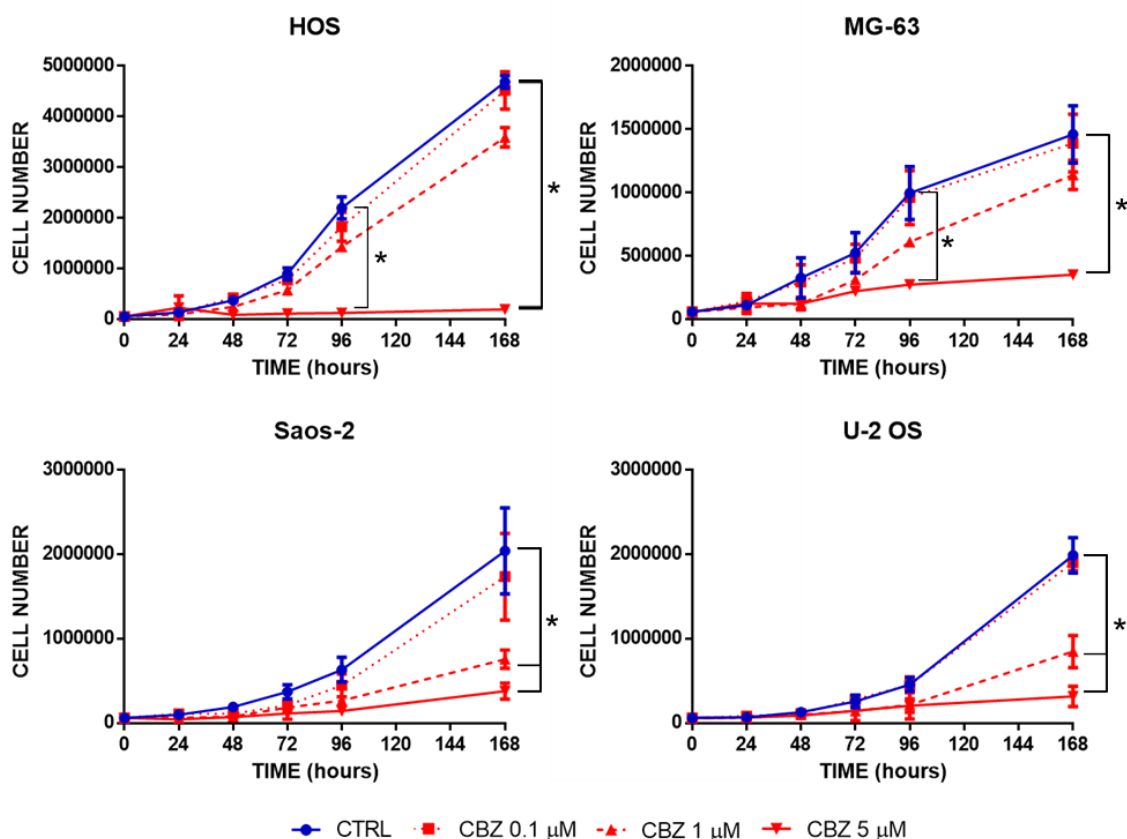


Figura 4: curve di crescita delle linee di osteosarcoma trattate con varie concentrazioni di CBZ; nelle linee HOS e MG-63, il trattamento con $\text{CBZ } 5 \mu\text{M}$ causa una diminuzione statisticamente significativa della proliferazione a 96 e 168 h; nelle linee Saos-2 e U-2 OS, invece, a 96 h non si osservano differenze significative tra i diversi campioni, ma a 168 h dall'inizio del trattamento sia $\text{CBZ } 1 \mu\text{M}$ che $5 \mu\text{M}$ inibiscono significativamente la proliferazione. * = $P < 0.05$

7.3 CBZ CAUSA UN ACCUMULO DI CELLULE NELLA FASE G_0/G_1 DEL CICLO

CELLULARE NELLE LINEE MG 63, SAOS-2 E U-2 OS; NELLA LINEA HOS, CBZ

PROVOCA UN AUMENTO DELLA FRAZIONE SUB- G_1

Data la forte inibizione della proliferazione cellulare da parte di $\text{CBZ } 5 \mu\text{M}$, è stato analizzato il ciclo cellulare delle linee di osteosarcoma sotto trattamento con questa concentrazione del farmaco (fig. 5). È stato osservato che nelle tre linee di osteosarcoma, MG 63, Saos-2 e U-2 OS, dopo 96 ore, il trattamento causa un significativo blocco del ciclo cellulare nella fase G_0/G_1 rispetto al controllo, con una P rispettivamente di 0.04, 0.03 e 0.03, e il conseguente accumulo delle cellule in questa fase del ciclo. Nella linea HOS, invece, si osserva un significativo aumento della frazione sub- G_1 , che identifica i corpi cellulari che possiedono una quantità di DNA minore rispetto alla normale diploidia ($P = 0.001$).

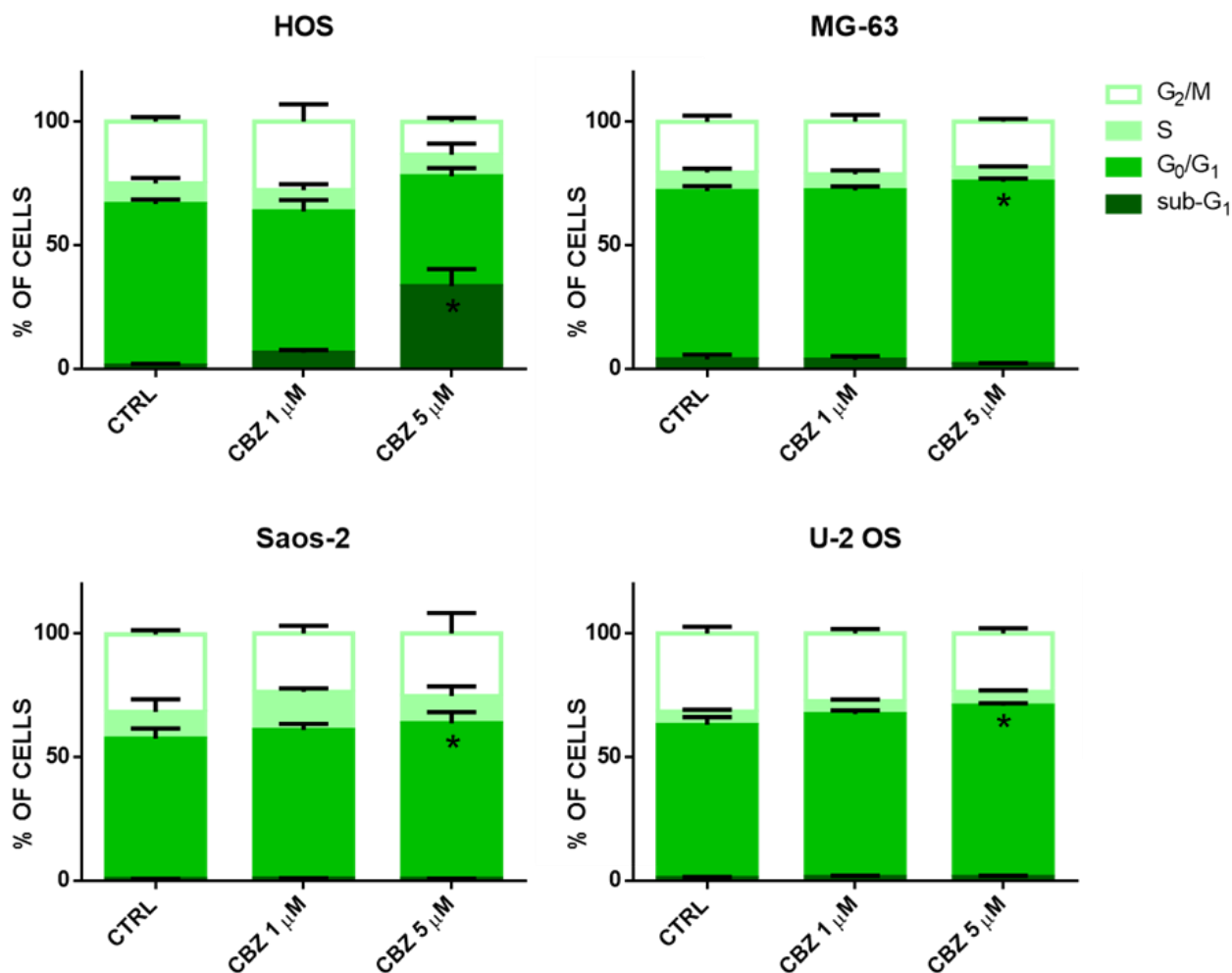


Figura 5: analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare delle linee di osteosarcoma trattate con CBZ 1 e 5 μM; nelle linee MG-63, Saos-2 e U-2 OS il trattamento con CBZ 5 μM provoca un accumulo significativo delle cellule nella fase G₀/G₁ del ciclo cellulare; nella linea HOS, invece, la concentrazione 5 μM provoca un consistente aumento (+ 30 %) della fase sub-G₁. * = P < 0.05

7.4 CBZ CAUSA MITOSI ABERRANTI NELLA LINEA HOS

Per capire più nel dettaglio l'effetto del CBZ sulla proliferazione cellulare, sono stati eseguiti degli esperimenti di time lapse sulle quattro linee di osteosarcoma durante il trattamento con il farmaco. Già dopo 48 ore dall'inizio del trattamento, solo nella linea HOS, si osservano delle metafasi e delle anafasi triple (fig. 6 e 7). A queste, seguono delle citodieresi aberranti in cui le cellule, nella maggior parte dei casi, non completano la divisione e si vanno a rifondere. La formazione di metafasi e anafasi triple è stata confermata anche in immunofluorescenza, colorando il fuso mitotico grazie all'utilizzo di un anticorpo primario anti α-tubulina (fig 8). Si osserva la presenza di metafasi governate da fusi mitotici tripolari e conseguenti anafasi triple.

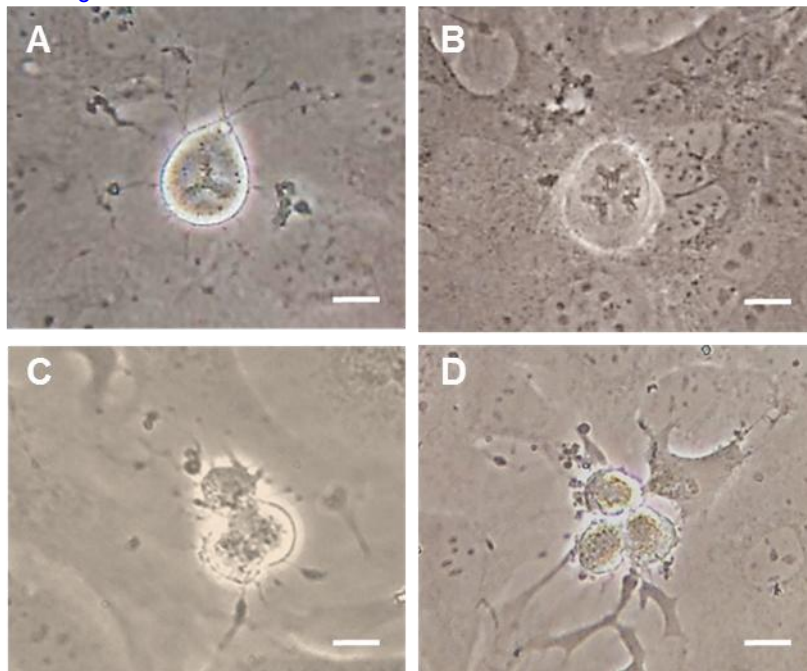


Figura 6: immagini rappresentative delle diverse fasi delle metafasi anomale riscontrate nella linea HOS in seguito a trattamento con CBZ 5 μ M. A) metafase tripla; B) anafase tripla; C) telofase tripla; D) citodieresi tripla

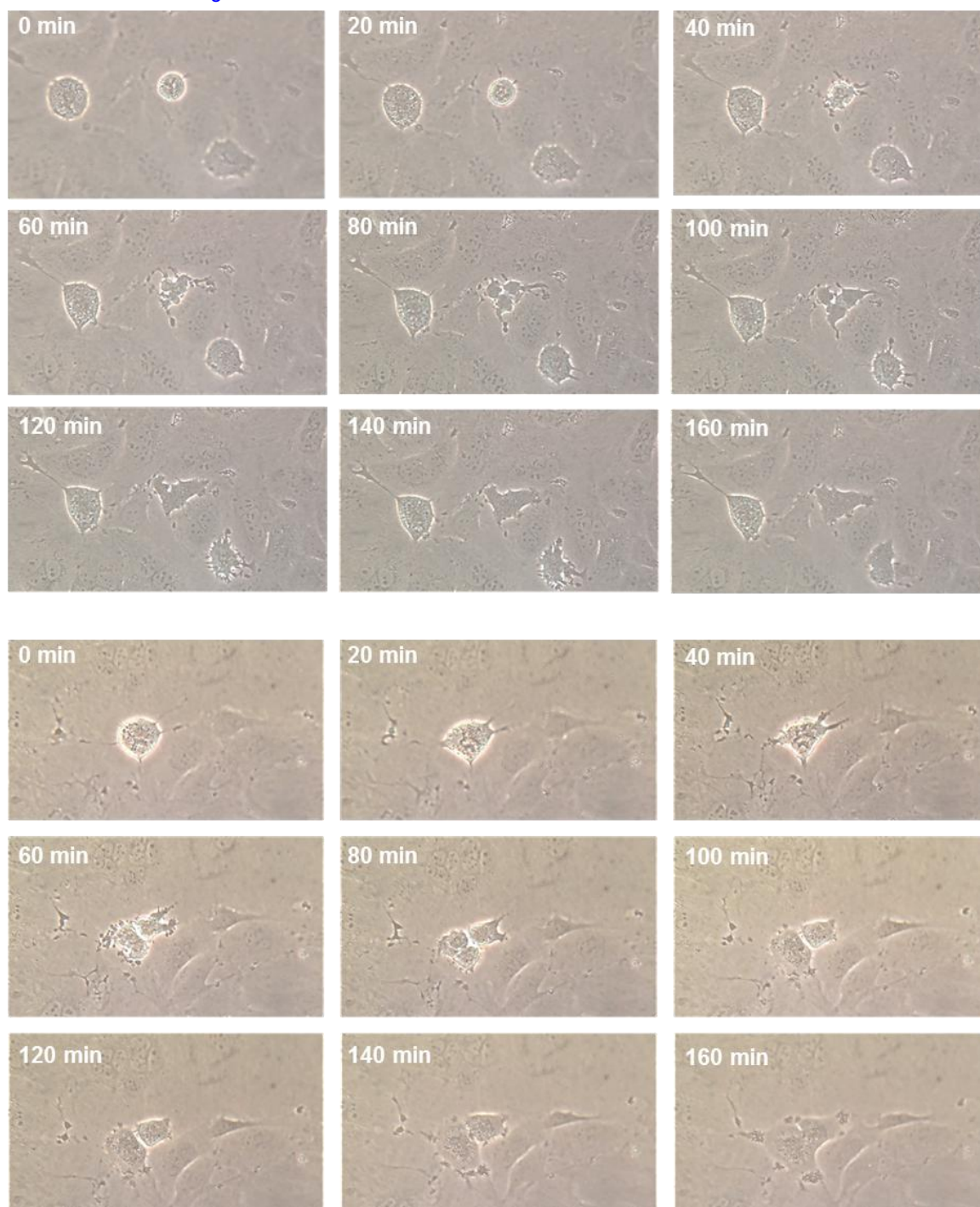
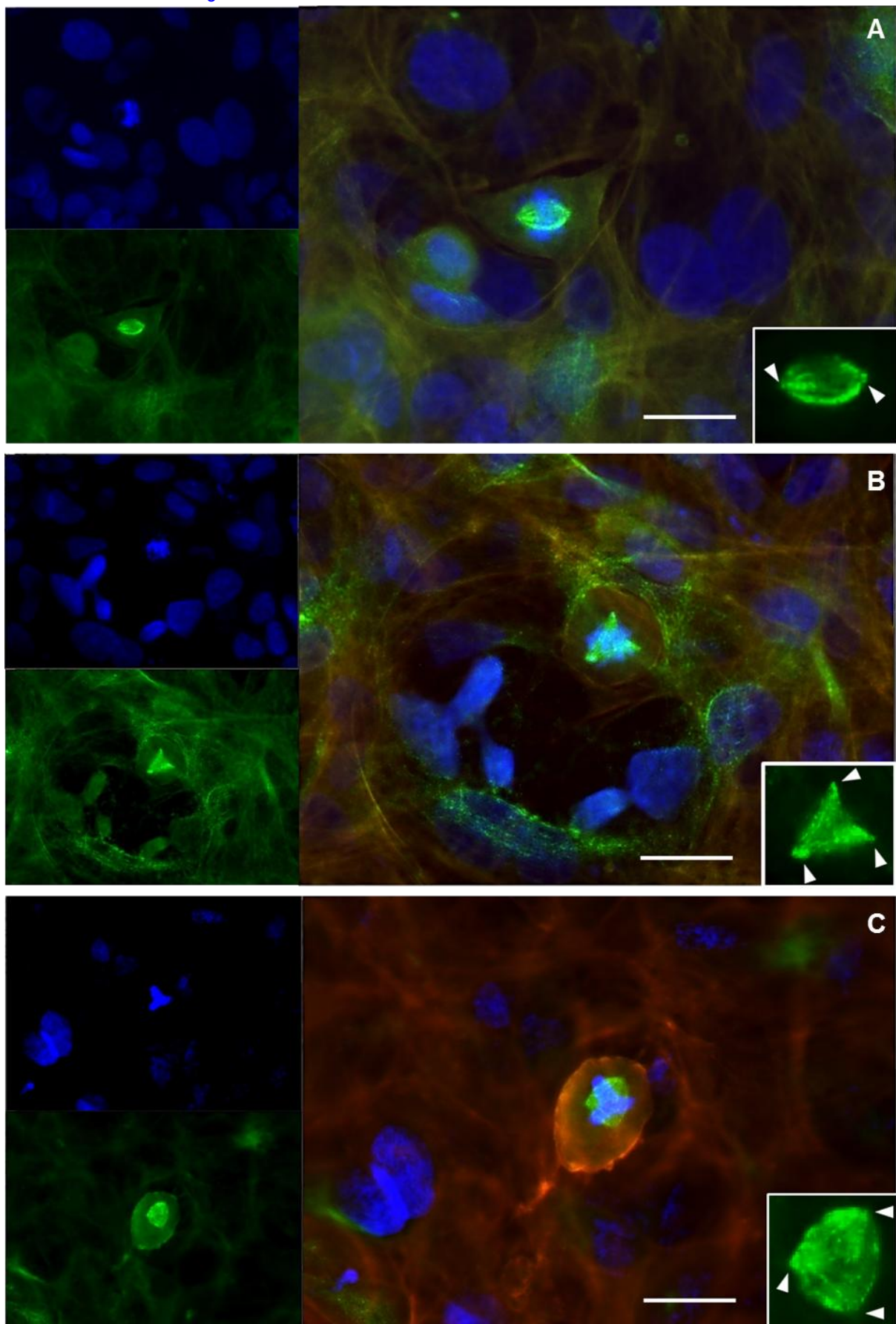
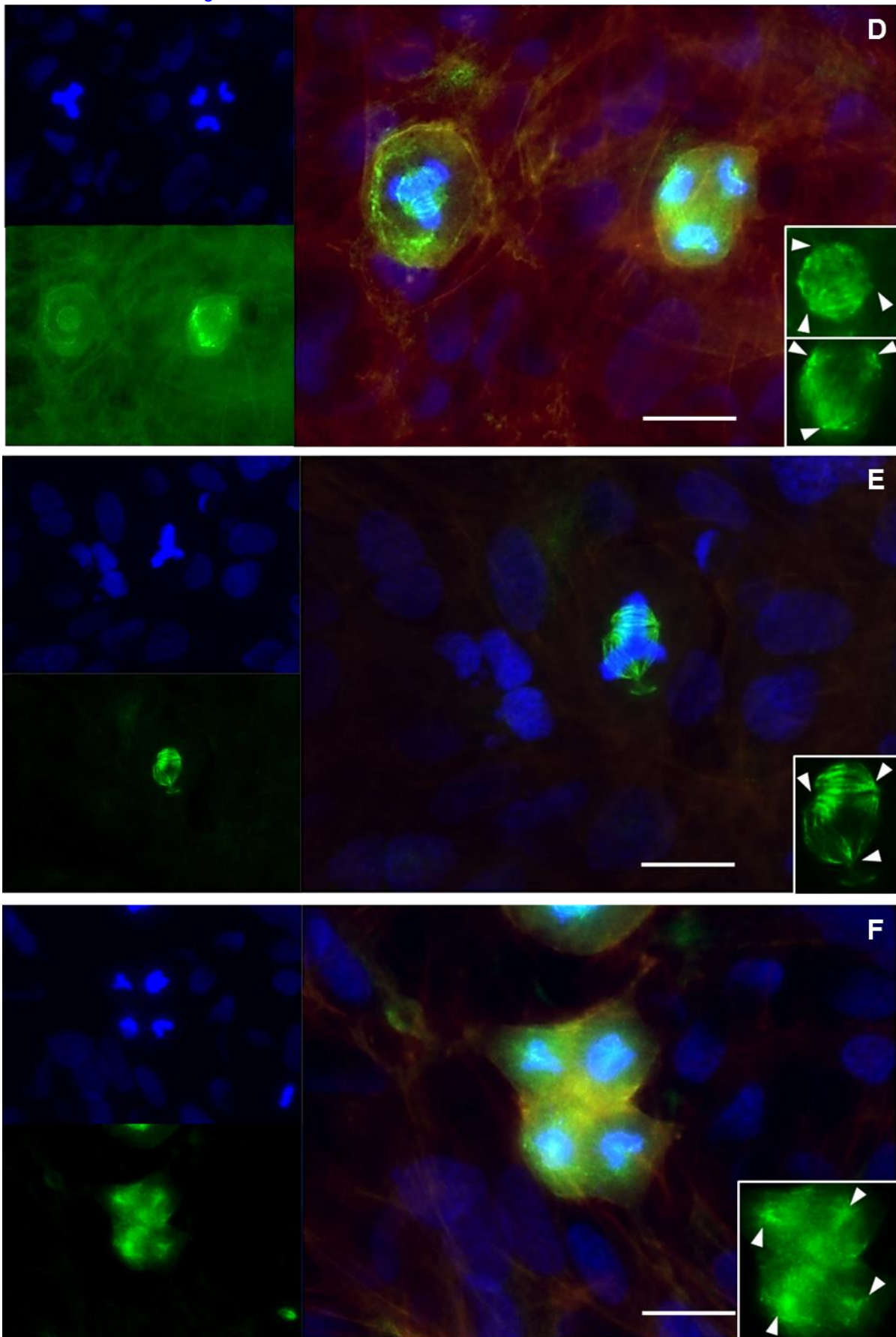


Figura 7: frames presi ogni 20 minuti di due diversi time lapse su HOS trattate con CBZ 5 μ M. si può notare come le cellule a 1 ora dalla metafase entrino nella fase di citodieresi con la formazione di tre corpi cellulari, i quali, però, non riescono mai completamente a dividersi, portando alla fine della mitosi alla formazione di una sola cellula

Figura 8: immagini di immunofluorescenza di HOS controllo e trattate con CBZ 5 μ M; BLU: DAPI; VERDE: α -tubulina; ROSSO: actina. A) normale metafase in HOS non trattate; si nota la formazione di una normale piastra metafasica e la formazione di un normale fuso mitotico bipolare con i due centrioli disposti ai poli opposti (frecche bianche). B) Pre-metafase in HOS trattate con CBZ 5 μ M; si notano i cromosomi condensati ma non ancora disposti in piastra metafasica e la formazione di un fuso tripolare con la presenza di tre centrioli (frecche bianche). C), D) e E) metafase tripla in HOS trattate con CBZ 5 μ M; i cromosomi, disposti in piastra metafasica, formano una tipica struttura tripla; D) anafase tripla in HOS trattate con CBZ 5 μ M; i cromosomi sono tirati ai tre poli del fuso tripolare; F) anafase tetrapolare in HOS trattate con CBZ 5 μ M; i cromosomi sono tirati ai quattro poli del fuso tetrapolare.





7.5 CBZ INIBISCE LA CAPACITÀ MIGRATORIA DELLE CELLULE DI OSTEOSARCOMA

Per valutare l'effetto di CBZ sulla migrazione, è stato eseguito il wound healing assay trattando le cellule con tre concentrazioni del farmaco: 0.1, 1 e 5 μM . Il farmaco inibisce in modo significativo la migrazione di tutte e quattro le linee di osteosarcoma se somministrato alla dose maggiore (fig 9 e 10). Nello specifico, le HOS non trattate sono in grado di chiudere il solco già dopo 20 ore, quando invece il campione trattato con CBZ 5 μM riesce a coprire solamente il 75 % della superficie ($P = 0.006$). I campioni controllo delle altre tre linee chiudono il solco solamente a 40 ore dall'inizio dell'esperimento, ma l'effetto di CBZ è più forte, in quanto, a questo time point, i campioni trattati ricoprono solo il 38.5 % nelle MG-63 ($P = 0.0004$), il 62.2 % nelle Saos-2 ($P = 0.007$) e il 49.4 % nelle U-2 OS ($P = 0.002$). Con le concentrazioni 0.1 e 1 μM non si osservano variazioni significative del tasso di migrazione in nessuna delle linee cellulari testate.

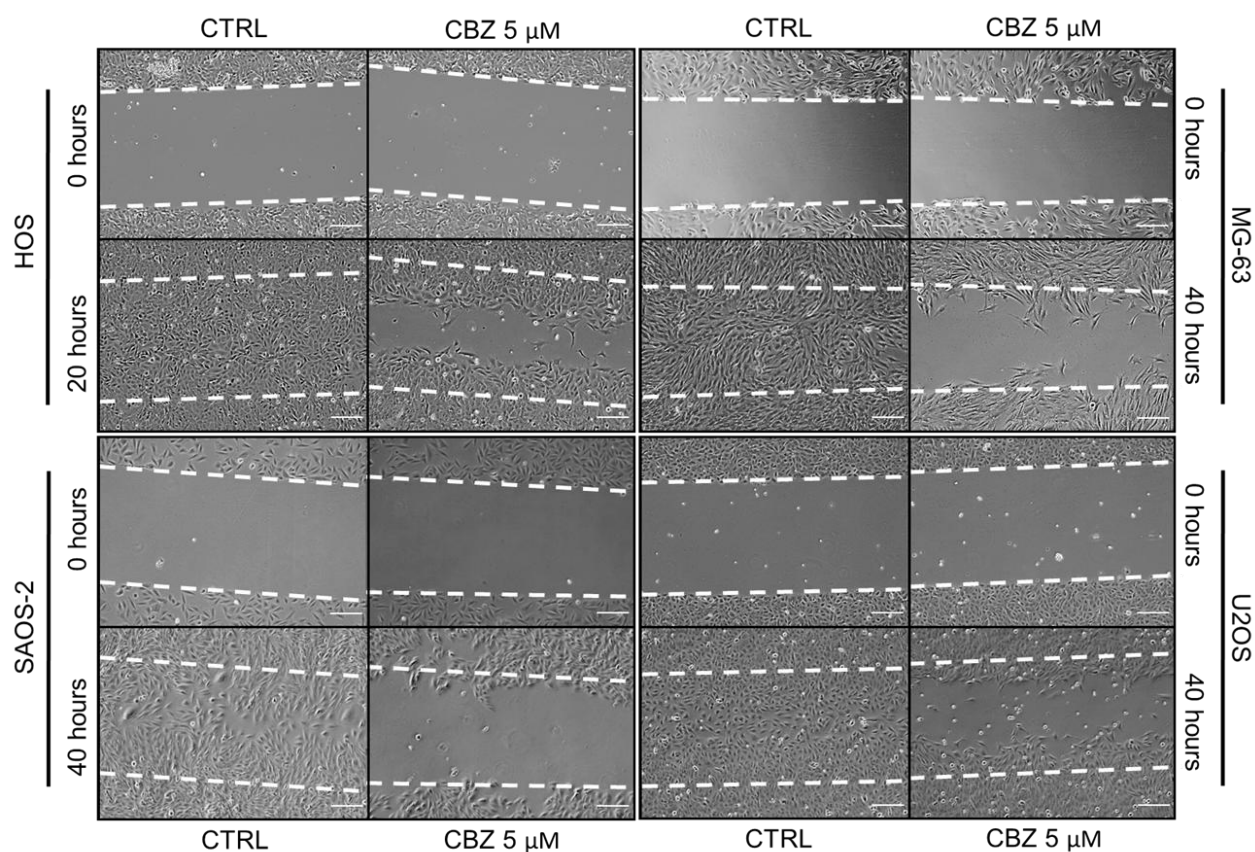


Figura 9: immagini rappresentative dell'esperimento wound healing con le cellule di osteosarcoma trattate a varie concentrazioni di CBZ.

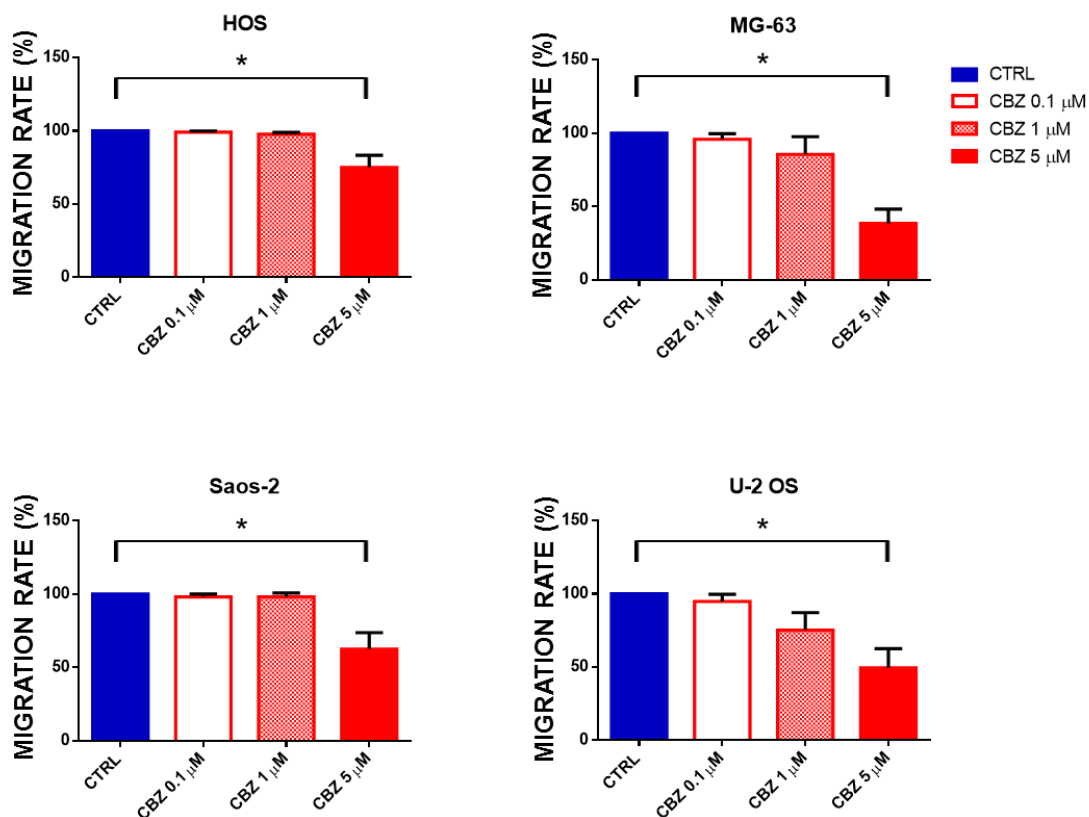


Figura 10: quantificazione dei tassi di migrazione delle cellule di osteosarcoma controllo e trattate a varie concentrazioni di CBZ. In tutte le linee di osteosarcoma testate, il CBZ 5 μM causa un significativo decremento della capacità migratoria rispetto alle cellule non trattate. * = P < 0.05

7.6 CBZ INIBISCE L'ATTIVITÀ DI C-MET E I PATHWAYS A VALLE ERK E AKT

Una volta dimostrati gli effetti di CBZ sulle diverse linee di osteosarcoma, sono stati effettuati una serie di western blot, per testare l'effetto di CBZ nell'alterazione di diversi pathways intracellulari a diversi tempi dal trattamento (fig. 11). In particolare, le cellule di osteosarcoma sono state trattate con CBZ 5 μM e DMSO come controllo e sono state estratte le proteine ai seguenti tempi dall'inizio del trattamento: 0, 1, 3, 6, 12, 24 e 48 ore. In tutte le linee testate, la fosforilazione attivatoria di c-MET diminuisce drasticamente dopo 1 ora di trattamento con CBZ. L'attività del recettore resta inibita fino a 48 ore dall'inizio del trattamento, tranne nelle Saos-2, dove la forma fosforilata di c-MET torna a livelli paragonabili al controllo già dopo 24 ore. Tra i pathways a valle di c-MET, sono stati analizzati ERK e AKT. Per quanto riguarda ERK, la sua cinetica di attivazione dopo l'inizio del trattamento con CBZ adotta un andamento sigmoidale, con ondate di attivazione e inibizione, in tutte e quattro le linee di osteosarcoma testate. La fosforilazione attivatoria di AKT, invece è fortemente inibita in tutti i tempi testati in tutte le linee cellulari, fatta eccezione per le

MG-63 dove tale pathway non subisce significative alterazioni. Nella linea HOS, anche la quantità totale di AKT subisce delle importanti variazioni

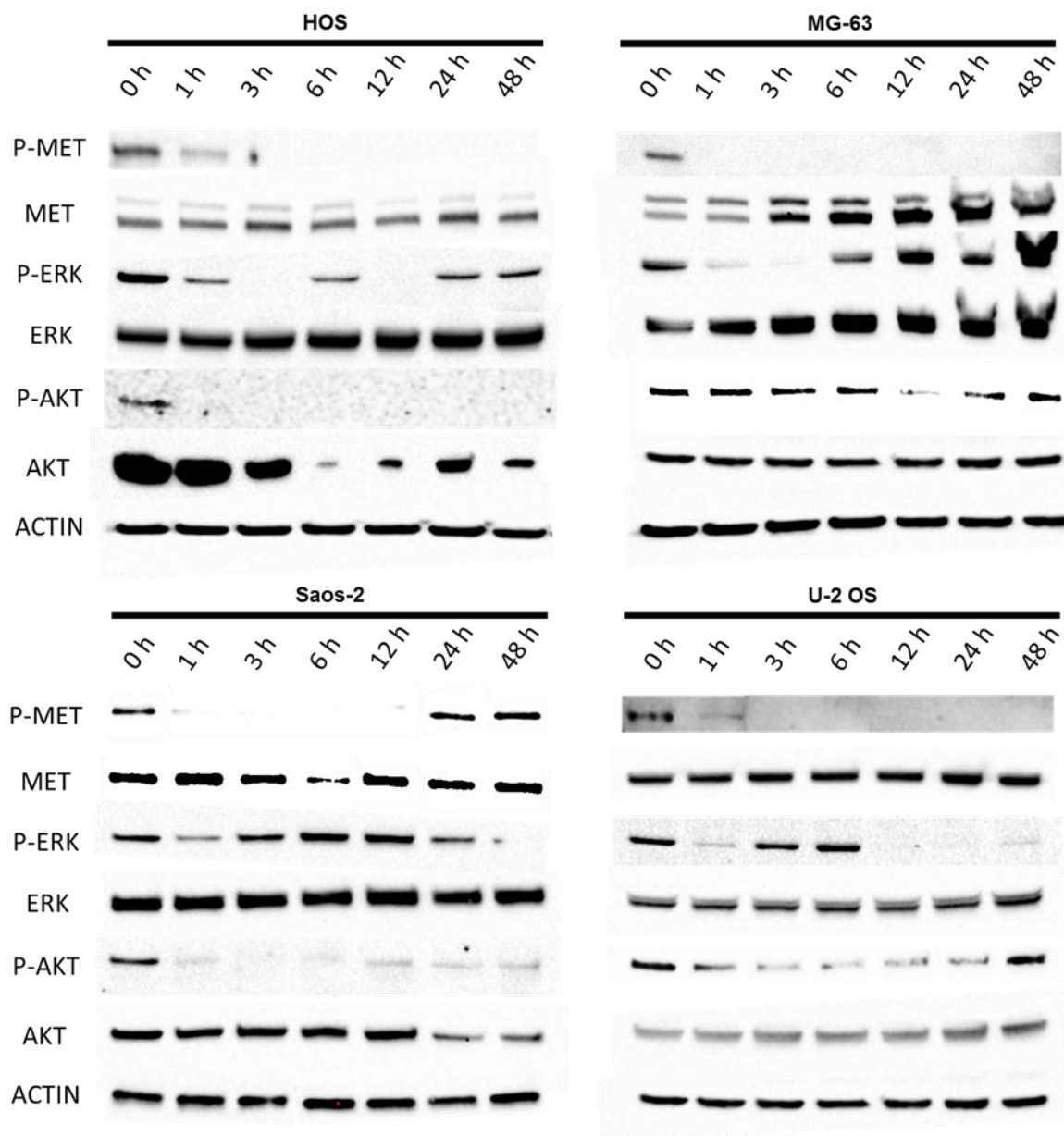


Figura 11: inibizione di c-MET e attività dei principali pathways intracellulari a valle di c-MET analizzati tramite western blot su cellule di osteosarcoma trattate con CBZ 5 μ M a diversi tempi sperimentali.

7.7 CBZ INDUCE IL PROCESSO AUTOFAGICO NELLE LINEE DI OSTEOSARCOMA

Le linee di osteosarcoma trattate con CBZ sono state analizzate tramite western blot per l'attivazione del pathway autofagico (fig. 12). In particolare sono stati scelti due tempi sperimentali, 6 e 24 ore, per testare i livelli proteici dei markers autofagici ULK1, Beclin 1 e LC3-I/II. Per quanto riguarda quest'ultimo marker si è deciso di testarlo sulle cellule controllo e trattate con CBZ in due

diverse condizioni: con e senza cloroquina (CLQ) (pre-trattamento rispetto a CBZ di 1 ora), un inibitore della fusione tra lisosomi e autofagosomi, in modo da accumulare la proteina LC3 e poterne rilevare maggiormente le differenze tra trattato e controllo. In tutte e quattro le linee, a 24 ore, CBZ 5 μ M provoca un aumento della forma attiva di LC3, ovvero LC3-II in rapporto alla forma inattiva LC3-I rispetto al controllo; questo effetto è maggiormente visibile nei campioni pre-trattati con CLQ. Anche a 6 ore, nelle MG-63 e nelle U-2 OS LC3-II è maggiore nel trattato rispetto al controllo. L'aumento della forma attiva di LC3 in tutte e quattro le linee di osteosarcoma, non è però accompagnato da un concomitante aumento dei livelli degli altri due markers autofagici ULK1 e Beclin 1. Questi due markers rimangono invariati in tutti i tempi sperimentali tra trattato e controllo, fatta eccezione per ULK1 che a 24 ore, sia nelle Saos-2 che nelle U-2 OS, sembra diminuire nei trattati rispetto ai controlli.

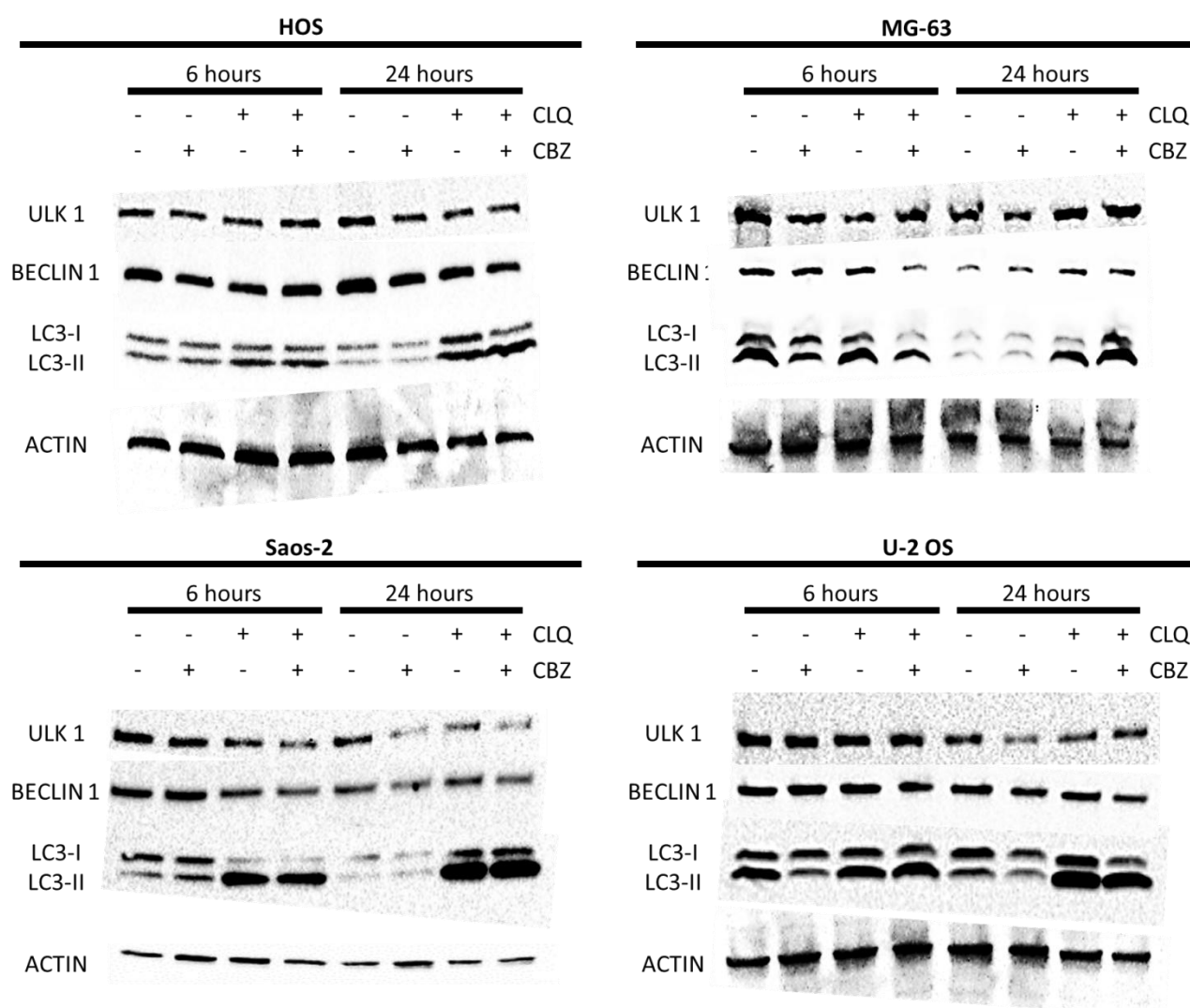
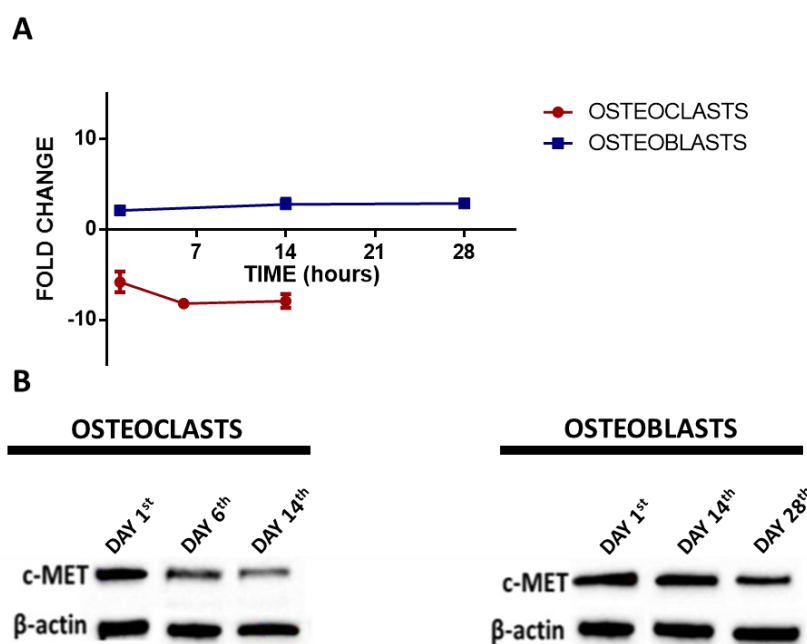


Figura 12: pannello di markers autofagici nelle quattro linee di osteosarcoma trattati con CBZ 5 μ M in combinazione o non con CLQ a 6 e 24 ore

7.1 IL RECETTORE C-MET È ESPRESSO DURANTE TUTTO IL DIFFERENZIAMENTO OSTEOCLASTICO E OSTEOBLASTICO

L'espressione di c-MET, il principale target di CBZ, è stato valutato a diversi time points del differenziamento osteoclastico e osteoblastico, sia in real time PCR che tramite western blot (fig. 13). In particolare, gli OCLs sono stati valutati allo stadio di monociti (0 giorni di differenziamento), pre-OCLs (6 gg) e OCLs maturi (14 gg), mentre gli OBLs allo stadio di mesenchimali (0 giorni di differenziamento), pre-OBLs (14 gg) e OBLs maturi (28 gg). L'analisi dei livelli di mRNA tramite real time PCR ha evidenziato come i monociti esprimano livelli significativamente più alti di c-MET sia in confronto ai pre-OCLs che in confronto agli OCLs maturi ($P = 0.0009$, $P = 0.0003$ rispettivamente). Non ci sono differenze significative tra lo stadio di pre-OCL e OCL maturo. Questo dato è stato confermato anche a livello proteico tramite western blot. Per quanto riguarda gli OBLs, sia l'analisi di PCR sia il western blot hanno dimostrato che l'espressione di c-MET rimane costante durante tutto il differenziamento.



*Figura 13: caratterizzazione degli osteoclasti umani e degli osteoblasti umani per l'espressione del principale target di CBZ. A) analisi in real time PCR dell'espressione del gene c-MET a diversi tempi del differenziamento osteoclastico e osteoblastico; mentre negli osteoblasti l'espressione di c-MET resta pressoché costante durante il periodo differenziativo, negli osteoclasti l'espressione del recettore diminuisce significativamente da monocita a pre-osteoclasta. B) analisi in western blot dell'espressione del gene c-MET a diversi tempi del differenziamento osteoclastico e osteoblastico; tale dato conferma il precedente dato di espressione genica. * = $P < 0.05$*

7.2 IL TRATTAMENTO CON CBZ INIBISCE SIA L'ATTIVITÀ CHE IL

DIFFERENZIAMENTO OSTEOCLASTICO

Il trattamento con CBZ è stato effettuato su osteoclasti umani primari alla concentrazione di 0.3 μM in riferimento ad altri studi presenti in letteratura (128, 129) a partire dal primo giorno di differenziamento e rinnovando il trattamento ad ogni cambio terreno (ogni 3 giorni). Tale concentrazione, con un esperimento di MTT, non è risultata tossica per gli osteoclasti (dato non mostrato). Gli esperimenti effettuati con la colorazione TRAP hanno mostrato come CBZ sia capace di inibire in modo significativo il differenziamento osteoclastico con la diminuzione di cellule TRAP + con più di tre nuclei rispetto alle cellule controllo trattate con DMSO ($P = 0.0145$) (fig. 14 A e B). Per verificare che il farmaco avesse la capacità di inibire non soltanto il differenziamento, ma anche l'attività degli osteoclasti, le cellule sono state seminate in pozzetti rivestiti di calcio fosfato per mimare la matrice ossea. Anche in questo caso si è mantenuto lo stesso tipo di trattamento effettuato nell'esperimento precedente. Una volta terminato l'esperimento e staccate le cellule, quantificando le aree prive della matrice e quindi riassorbite dagli osteoclasti, si è constatato che il CBZ ha la capacità di inibire in modo significativo rispetto al controllo l'attività di riassorbimento osseo tipica di queste cellule ($P = 0.0252$) (fig. 14 A e C).

7.3 CBZ MODIFICA L'ESPRESSIONE DEI PRINCIPALI GENI MARKER DEGLI OSTEOCLASTI

Con il fine di capire quali modifiche il CBZ provochi a livello genico, gli osteoclasti umani primari sono stati trattati con il farmaco alla concentrazione 0.3 μM o con DMSO per tutto il protocollo differenziativo. Al termine dell'esperimento è stata eseguita una real time PCR su un pannello di geni marker di questo tipo cellulare (fig. 14 D). In particolare sono stati analizzati i seguenti geni: *TRAP*, *RANK*, *CATK* e *MMP-9*. Nello specifico, l'espressione dei geni *TRAP*, *CATK* e *RANK* viene modificata in modo significativo in seguito a trattamento con CBZ rispetto al DMSO con delle P , rispettivamente di 0.006, 0.004 e 0.001. Non sono state riscontrate alterazioni significative del gene *MMP-9*.

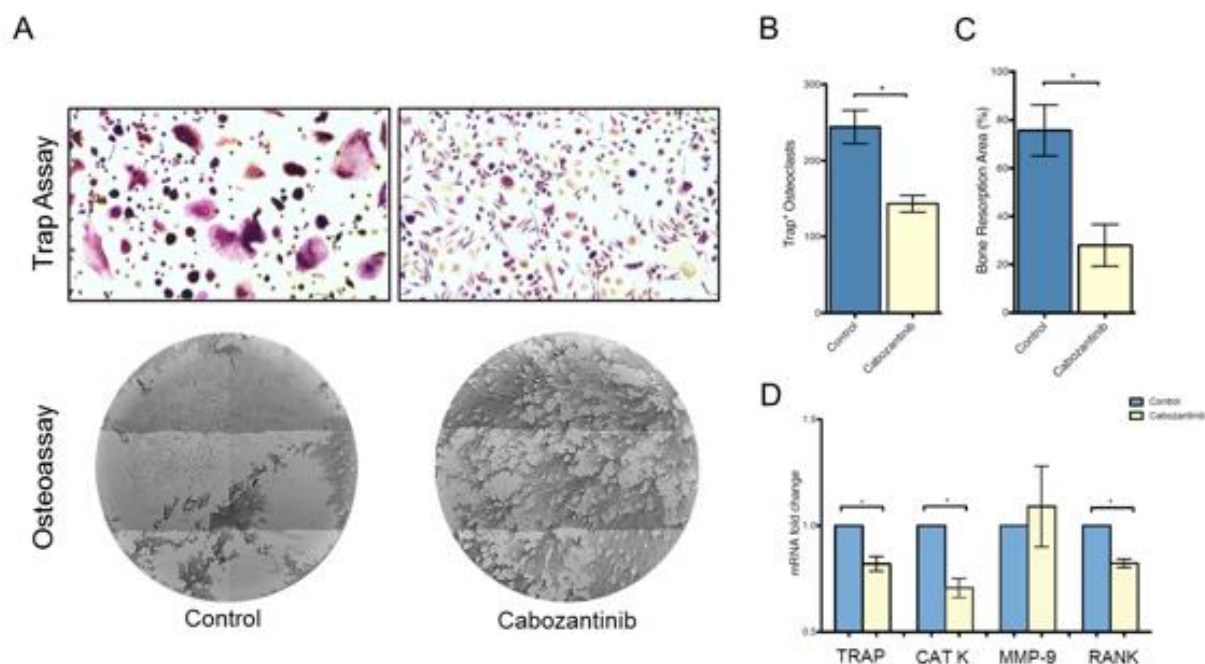


Figura 14: effetto del CBZ sugli osteoclasti umani primari. A) immagini rappresentative della colorazione TRAP e del riassorbimento osseo in seguito a trattamento con CBZ su osteoclasti umani primari; in particolare, nell'esperimento di riassorbimento, le aree riassorbite sono identificate dal colore chiaro, mentre le aree più scure sono i residui di matrice ossea B) quantificazione del numero di osteoclasti TRAP+ con più di 3 nuclei; tale analisi evidenzia come il CBZ inibisca di circa il 50% la formazione di osteoclasti maturi. C) quantificazione delle aree riassorbite mediante Osteo Assay; il trattamento con CBZ inibisce l'attività osteoclastica di circa il 70 %. D) pannello di espressione di geni marker osteoclastici in seguito a trattamento con CBZ. * = $P < 0.05$.

7.4 IL CBZ NON INFLUENZA NÉ IL DIFFERENZIAMENTO NÉ L'ATTIVITÀ OSTEOLASTICA

Gli osteoblasti umani primari sono stati trattati con CBZ alla concentrazione di 1, 3 e 5 μM . Il trattamento è stato iniziato l'ultima settimana di differenziamento con un cambio terreno e aggiunta del farmaco dopo tre giorni. Questo tipo di trattamenti a queste concentrazioni non risultano tossiche per gli osteoblasti come è stato dimostrato con un esperimento di MTT (dato non mostrato). Utilizzando come marcatore di differenziamento osteoblastico l'ALP, non si è evidenziata alcuna differenza tra i campioni trattati con CBZ e i campioni di controllo (fig. 15 A e B). Allo stesso modo, il CBZ non influenza la capacità degli osteoblasti di produrre matrice ossea, come è dimostrato dalla colorazione Alizarin Red (fig. 15 A e C).

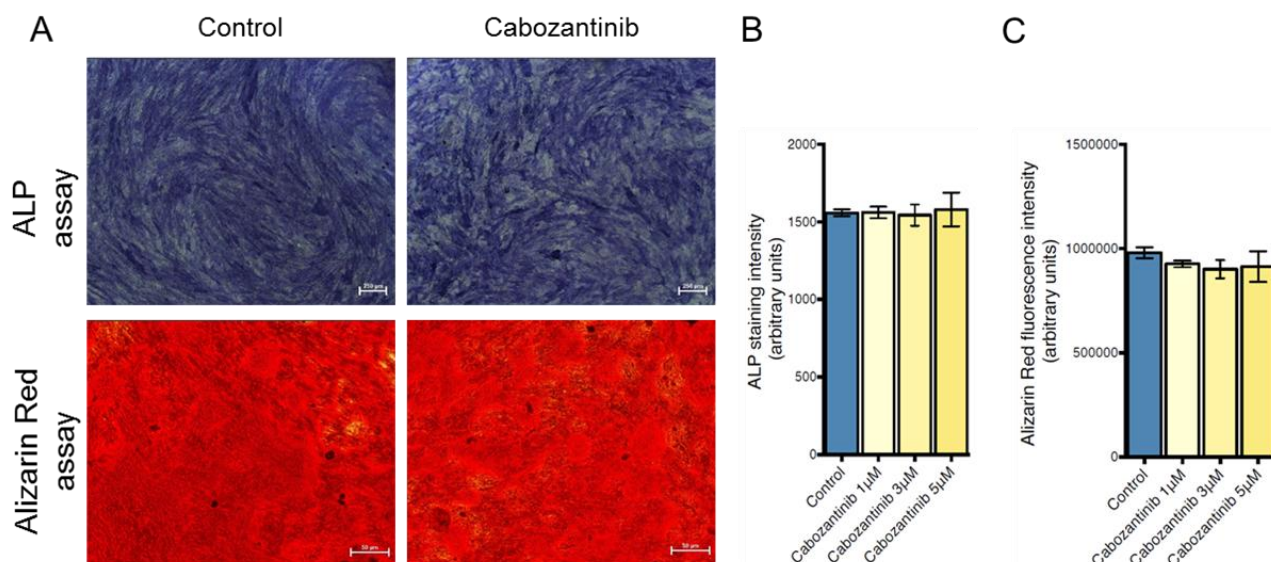


Figura 15: effetto del CBZ su osteoblasti umani rimari. A) immagini rappresentative di colorazioni ALP e Alizarin Red su osteoblasti controllo e trattati con CBZ 5 μ M. B) quantificazione del segnale ALP in osteoblasti trattati con CBZ a diverse concentrazioni; in nessun caso si denotano differenze significative del differenziamento osteoblastico C) quantificazione del segnale Alizarin Red in osteoblasti trattati con CBZ a diverse concentrazioni; in nessun caso si denotano differenze significative dell'attività osteoblastica.

7.5 CBZ MODIFICA L'ESPRESSIONE DI ALCUNI GENI MARKER DEGLI OSTEOLASTI

Anche per gli osteoblasti è stato selezionato un pannello di geni marker che è stato analizzato in real time PCR negli osteoblasti trattati con CBZ 5 μ M (ultima settimana di differenziamento) e DMSO come controllo. Il pannello comprendeva i seguenti geni: *OPG*, *RANKL*, *BGLAP*, *OSX*, *ALP* e *RUNX2*. Anche se il CBZ non influenza la capacità differenziativa e di produzione di matrice ossea da parte degli osteoblasti, tale farmaco provoca comunque una modificazione a livello di espressione genica (fig. 16). In particolare vengono up-regolati i geni *RUNX2* ($P = 0.003$), *OSTERIX* ($P = 0.015$) e *OPG* ($P = 0.016$), mentre vengono down-modulati i geni *OCN* ($P = 0.032$) e *RANKL* ($P = 0.0006$).

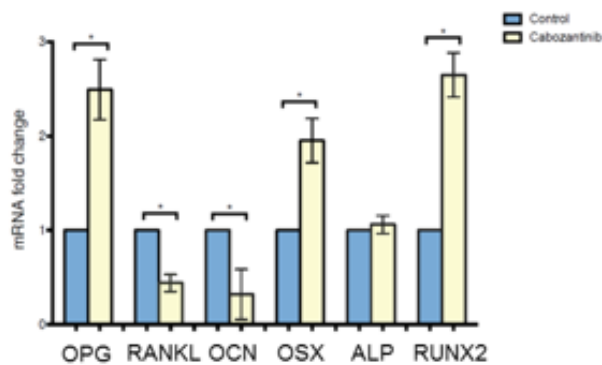


Figura 16: pannello di espressione di alcuni geni marker osteoblastici; in seguito a trattamento con CBZ 5 μ M vengono up-regolati i geni OPG, OSX e RUNX2, mentre vengono down modulati i geni RANKL e OCN. * = $P < 0.05$

7.6 CBZ INFLUENZA I LIVELLI DI OPG E RANKL SECRETI DAGLI OSTEOLASTI

Partendo dal risultato della real time PCR, sono stati analizzati tramite saggio ELISA i livelli di RANKL e OPG solubili prodotti dagli osteoblasti in seguito a trattamento con CBZ 1, 3 e 5 μ M (fig. 17). Per quanto riguarda il RANKL, il trattamento con CBZ provoca, all'aumentare della concentrazione del farmaco, un trend negativo nella produzione della proteina che raggiunge la significatività statistica alla concentrazione di 5 μ M ($P = 0.043$). Viceversa, la produzione di OPG solubile aumenta proporzionalmente alla concentrazione del farmaco, raggiungendo però anche in questo caso la significatività solamente alla concentrazione più alta ($P = 0.015$).

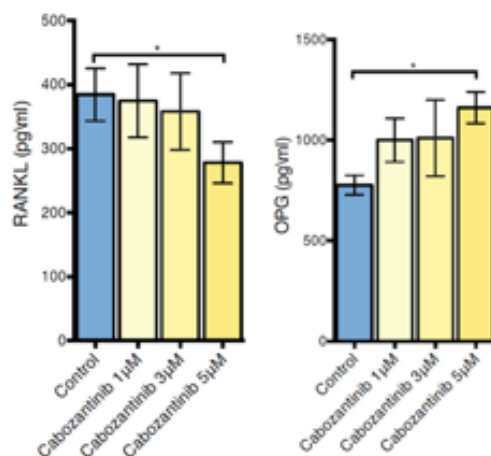


Figura 17: analisi dei livelli di RANKL e OPG secreti dagli osteoblasti controllo e trattati con diverse concentrazioni di CBZ; solamente alla concentrazione 5 μ M si raggiunge la significatività statistica della diminuzione della produzione di RANKL (-30%) e dell'aumento di quella di OPG (+40%). * = $P < 0.05$

7.7 CBZ MODIFICA L'ATTIVAZIONE DI ALCUNI PATHWAYS INTRACELLULARI DEGLI OSTEOLASTI

Al fine di analizzare possibili modifiche dei pathways a valle di c-MET per spiegare l'alterata produzione di RANKL e OPG, gli osteoblasti umani sono stati trattati con CBZ durante l'ultima

settimana di differenziamento e sono state estratte le proteine dopo 3 ore e dopo 3 giorni dalla prima somministrazione (fig. 18). L'analisi western blot ha rilevato una diminuzione dell'attivazione dei pathways di ERK (p44/42 ERK1/2 fosforilate su Thr202/Tyr204) e AKT (fosforilata su Thr308) già dopo 3 ore dalla prima somministrazione del farmaco. Allo stesso tempo si nota una leggera attivazione delle chinasi dello stress SAPK/JNK (fosforilata su Thr183/Tyr185) e p38 (fosforilata su Thr180/Tyr182).

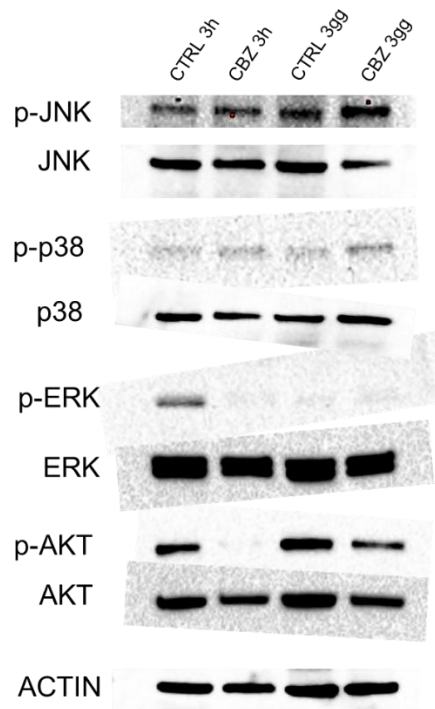


Figura 18: analisi western blot dei pathways AKT, ERK, p38 e JNK a 3 ore e 3 giorni dall'inizio del trattamento con CBZ 5 Mm su osteoblasti umani primari; la fosforilazione attivatoria di AKT è completamente assente dopo 3 ore dall'inizio del trattamento e resta significativamente minore anche a 3 giorni; p-ERK viene completamente inibito dal trattamento; ad entrambi i punti sperimentali si rileva un aumento di fosfo-p38 e fosfo-JNK

7.8 OSTEOLASTI PRE-TRATTATI CON CBZ PERDONO LA CAPACITÀ DI DIFFERENZIARE MONOCITI CD14+ IN OSTEOLASTI MATURI

Per verificare se il CBZ potesse esercitare un effetto inibitorio indiretto sugli osteoclasti attraverso la deregolazione della produzione RANKL/OPG da parte degli osteoblasti, sono state disposte delle co-culture dirette tra i due diversi tipi cellulari ossei. In particolare, gli osteoblasti sono stati pretrattati con CBZ 5 μ M nell'ultima settimana di trattamento e successivamente i monociti CD14+ sono stati seminati sul layer di osteoblasti, senza continuare il trattamento e senza l'aggiunta di citochine esogene. La co-cultura è stata portata avanti fino al quattordicesimo giorno, quando è stata effettuata una colorazione TRAP per individuare gli osteoclasti. Allo stesso tempo è stato portato avanti un campione di osteoblasti su cui non sono stati seminati monociti. La colorazione TRAP su

questo campione è risultata completamente negativa (fig. 19 A). Gli osteoblasti controllo (pretrattati con DMSO) hanno portato alla formazione di diverse cellule colorate di un rosso intenso positive alla colorazione TRAP (fig. 19 B). Al contrario, i monociti coltivati su un layer di osteoblasti pretrattati con CBZ tendono a differenziarsi di meno, fino a raggiungere un decremento statisticamente significativo alla concentrazione di 5 μM ($P = 0.038$) (fig. 19 D). Inoltre, gli osteoclasti differenziatisi sugli osteoblasti pretrattati con CBZ 5 μM mostrano una colorazione TRAP meno intensa rispetto a quelli coltivati su osteoblasti controllo e pretrattati con CBZ 3 μM (fig. 19 C).

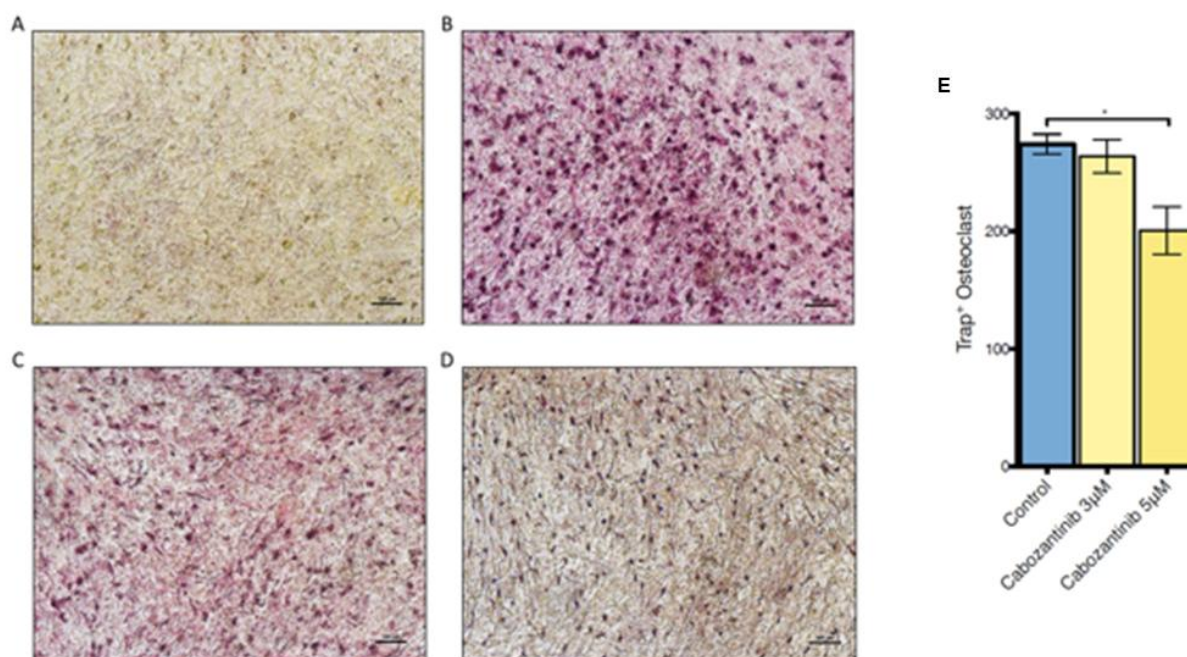


Figura 19: colorazione TRAP al giorno 14 della co-cultura tra osteoblasti controllo o pretrattati con CBZ a varie concentrazioni e monociti CD 14+. A) gli osteoblasti in mono coltura risultano completamente negativi alla colorazione TRAP. B), C) e D) immagini rappresentative dell'esperimento di co-cultura tra monociti CD 14+ e, rispettivamente, osteoblasti controllo, pre-trattati con CBZ 3 μM e 5 μM . E) quantificazione delle cellule TRAP+ su layer di osteoblasti controllo e pre-trattati con CBZ a varie concentrazioni; la concentrazione 5 μM del farmaco provoca una diminuzione statisticamente significativa del numero di cellule TRAP+. * = $P < 0.05$

7.9 GLI OSTEOLASTI TRATTATI CON CBZ RIMANGONO VITALI ANCHE DOPO 15 GIORNI DALLA FINE DEL TRATTAMENTO

Con il fine di scongiurare l'ipotesi che il diverso tasso di differenziamento degli osteoclasti co-cultivati con osteoblasti pretrattati con CBZ rispetto a quelli di controllo fosse causato da una minore vitalità dei primi rispetto ai secondi, è stato effettuato il saggio di vitalità Live/Dead. In particolare gli osteoblasti sono stati differenziati e trattati con CBZ 5 μM o DMSO nell'ultima settimana. Successivamente le cellule sono state lavate e lasciate in coltura senza fattori differenziativi e senza farmaco per 14 giorni. A questo punto è stata eseguita la colorazione

Live/Dead, che non ha rilevato alcuna differenza di vitalità tra gli osteoblasti controllo e quelli pretrattati. Nello specifico, si nota in figura 20 come la maggior parte delle cellule in entrambi i campioni sia caratterizzata da un'intensa colorazione verde data dalla calceina, mentre solo poche cellule hanno un nucleo colorato di rosso a causa del bromuro di etidio che entra solamente nelle cellule morte.

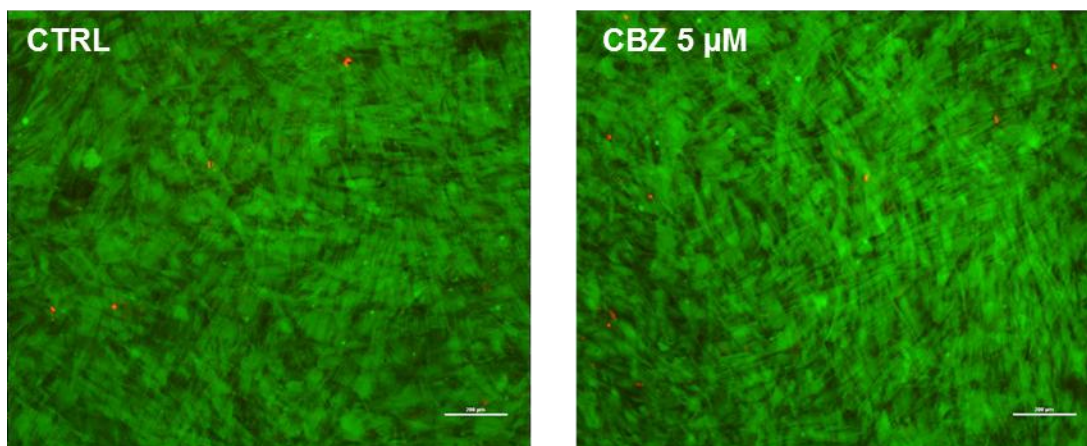


Figura 20: immagine rappresentativa della colorazione Live/Dead su osteoblasti controllo e pre-trattati con CBZ 5 μ M dopo 14 giorni dall'interruzione del trattamento e delle citochine differenziative; le cellule vitali sono colorate da un verde intenso dato dalla calceina AM, mentre quelle morte hanno il nucleo colorato in rosso per la presenza di bromuro d'etidio; non si rilevano differenze nella vitalità dei due diversi campioni.

7.10 LE LINEE HOS, MG-63 E SAOS-2, MA NON U-2 OS, ESPRIMONO IL RECETTORE RANK

Le quattro linee di osteosarcoma sono state testate per l'espressione di RANK sia a livello genico mediante real time PCR che a livello proteico mediante western blot. L'analisi di PCR dimostra che in tutte le linee cellulari, eccezion fatta per le U2-OS, vi è un'attiva trascrizione del gene *RANK* (dato non mostrato). Tale dato è confermato anche in western blot, dove si evidenzia la presenza della proteina RANK solamente nelle linee HOS, MG-63 e Saos-2 (fig. 21).

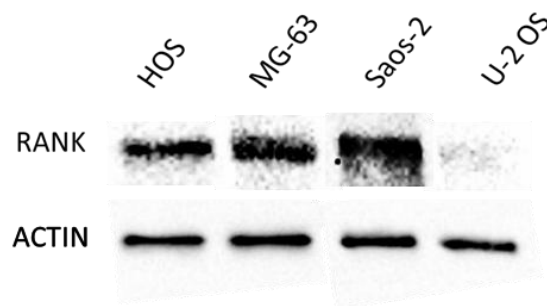


Figura 21: immagine rappresentativa dell'analisi western blot per la rilevazione dei livelli di RANK eseguita sulle quattro linee di osteosarcoma; il recettore è presente in tutte le linee tranne nelle U-2 OS

7.11 OSTEOBLASTI PRE-TRATTATI CON CBZ INIBISCONO LA PROLIFERAZIONE DELLE LINEE DI OSTEOSARCOMA CHE ESPRIMONO RANK

Per verificare se l'azione che il CBZ 5 μ M esercita sul microambiente osseo, in particolare sugli osteoblasti, potesse avere effetto sulla proliferazione delle cellule di osteosarcoma, sono state allestite delle co-culture tra osteoblasti pre-trattati con il farmaco e cellule tumorali GFP+, come precedentemente descritto. Il pre-trattamento con CBZ 5 μ M sugli osteoblasti ha un potente effetto inibitorio sulla proliferazione delle linee HOS, MG-63 e Saos-2, ma non delle U2-OS (fig. 22). In particolare, nelle Saos-2, dove l'inibizione è più pronunciata, si raggiunge la significatività statistica già a partire dalle 72 ore dall'inizio della co-cultura ($P = 0,029$) per poi essere mantenuta a 96 e 168 ore (rispettivamente $P = 0,048$ e $P = 0,036$). Anche per quanto riguarda le HOS e le MG-63, gli osteoblasti pre-trattati con CBZ ne inibiscono la proliferazione rispetto agli osteoblasti controllo, ma la significatività statistica viene raggiunta solamente a 96 e 168 ore (rispettivamente $P = 0,042$ e $0,037$ nelle HOS e $P = 0,029$ e $0,041$ nelle MG-63). La linea U2-OS, invece, non sembra risentire della presenza di osteoblasti pre-trattati con CBZ 5 μ M, proliferando ad un tasso che sembra essere addirittura maggiore rispetto al controllo, pur non raggiungendo mai la significatività statistica. Osservando le cellule al microscopio, si notano delle alterazioni morfologiche e di disposizione spaziale sia nelle Saos-2, sia nelle U2-OS seminate su osteoblasti pre-trattati rispetto alle rispettive cellule seminate su osteoblasti controllo (fig. 23 e 24). In particolare, le Saos-2 in co-cultura con osteoblasti controllo mostrano una morfologia allungata e fibroblastoide, che segue l'andamento del sottostante layer osteoblastico, mentre le stesse cellule in co-cultura con osteoblasti pre-trattati, esibiscono una morfologia più tondeggiante che non sembra percepire il layer osteoblastico (fig. 25).

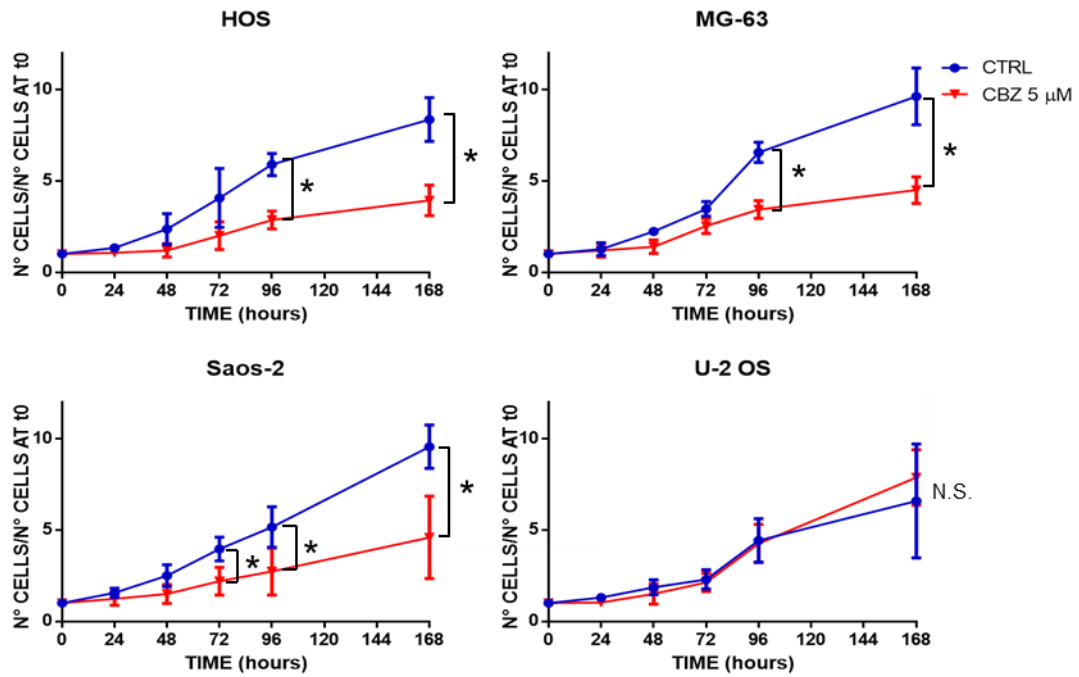


Figura 22: curve di crescita in co-cultura tra linee di osteosarcoma GFP+ e osteoblasti controllo o pre-trattati con CBZ 5 μ M. Le linee RANK + HOS, MG-63 e Saos-2 subiscono un'inibizione della proliferazione da parte degli osteoblasti pre-trattati rispetto a quelli controllo. Tale inibizione è assente con la linea U2-OS.

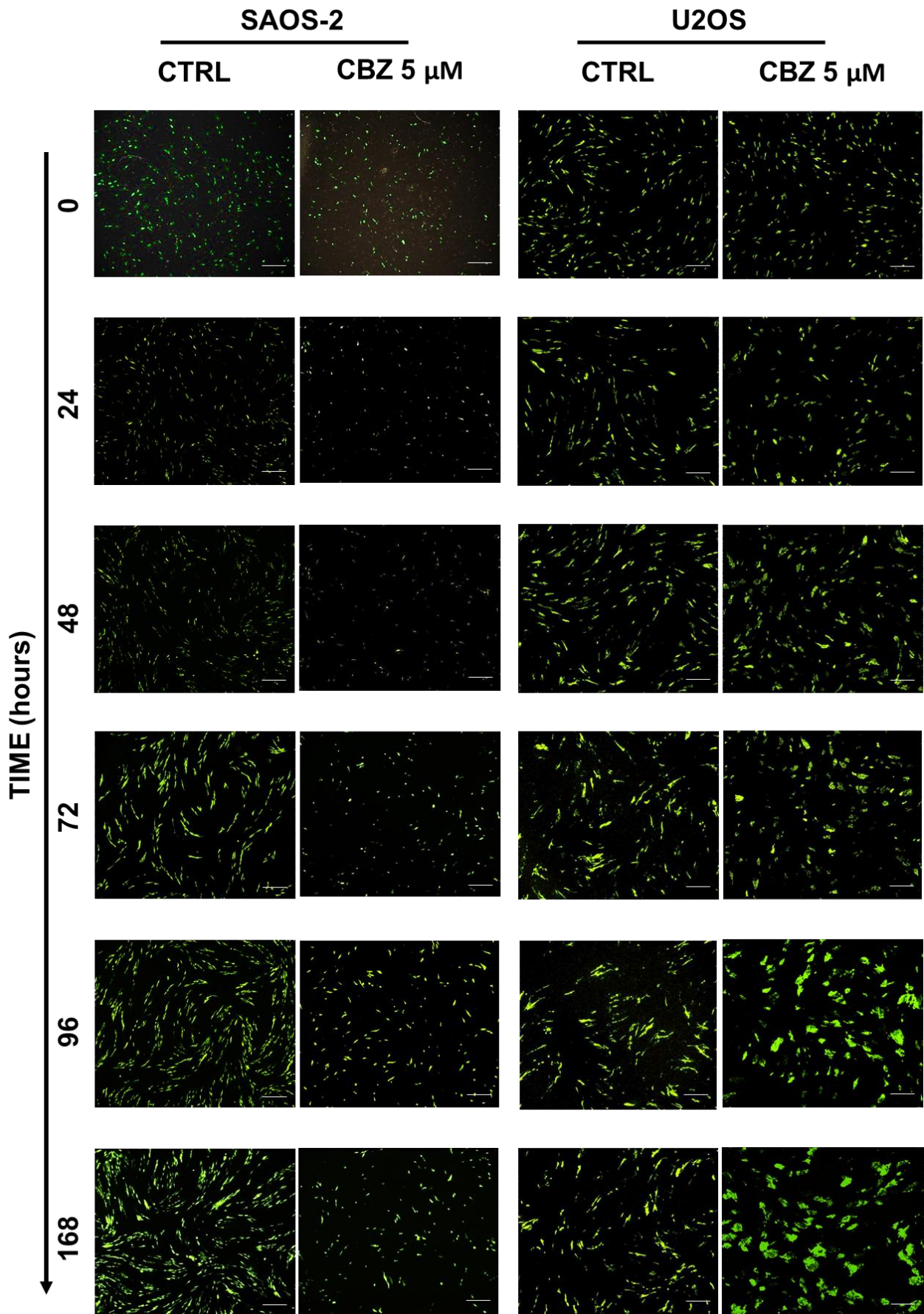


Figura 23: immagini rappresentative delle curve di crescita delle linee Saos-2 e U-2 OS in co-coltura con osteoblasti controllo o pre-trattati con CBZ 5 μ M. La linea Saos-2 (RANK +) viene inibita dagli osteoblasti pre-trattati, mentre la linea U-2 OS (RANK -) non mostra differenze tra la co-coltura con osteoblasti controllo e pre-trattati

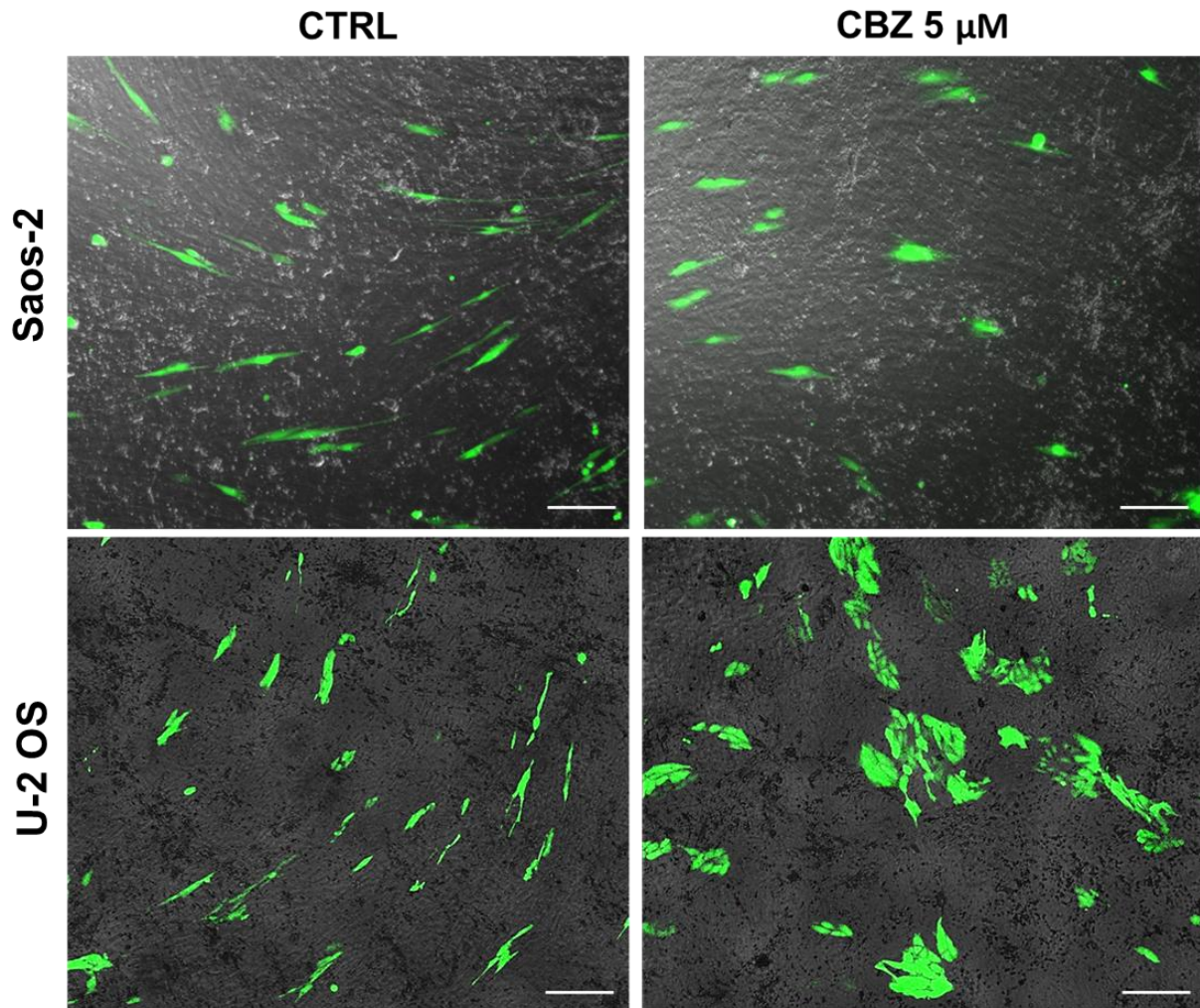
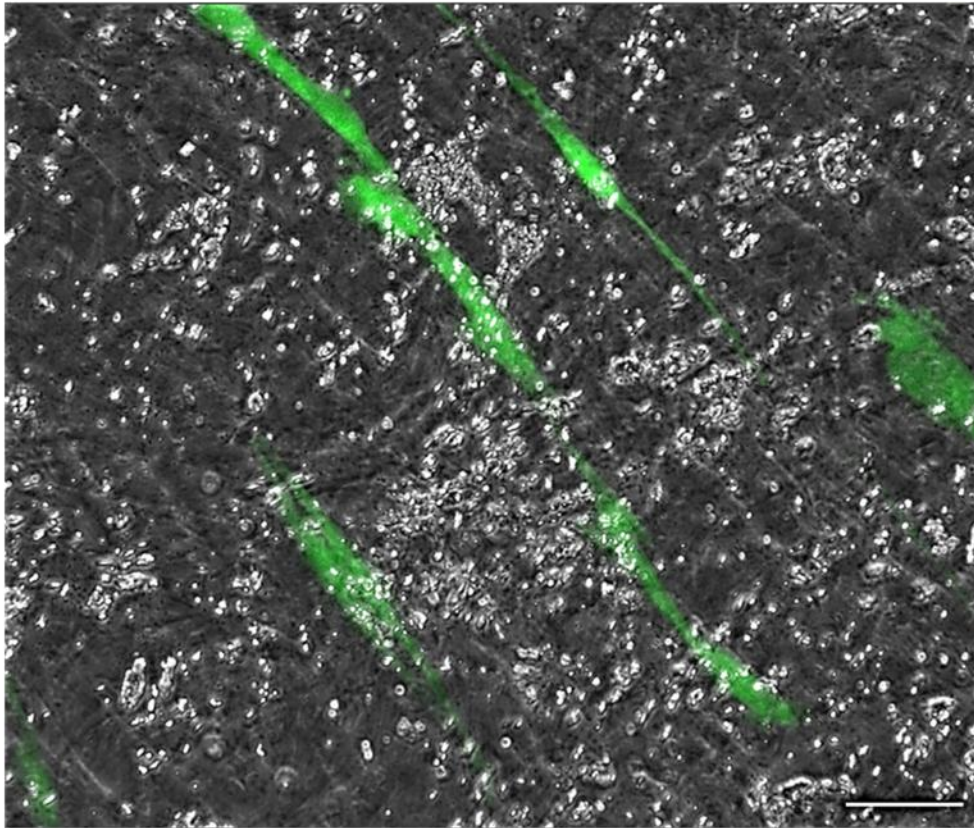


Figura 24: diversa disposizione spaziale tra Saos-2 o U-2 OS a 72 ore dall'inizio della co-coltura con osteoblasti controllo rispetto alle stesse cellule co-coltivate con osteoblasti pretrattati con CBZ 5 μ M.

Saos-2 CTRL



Saos-2 CBZ 5 μ M

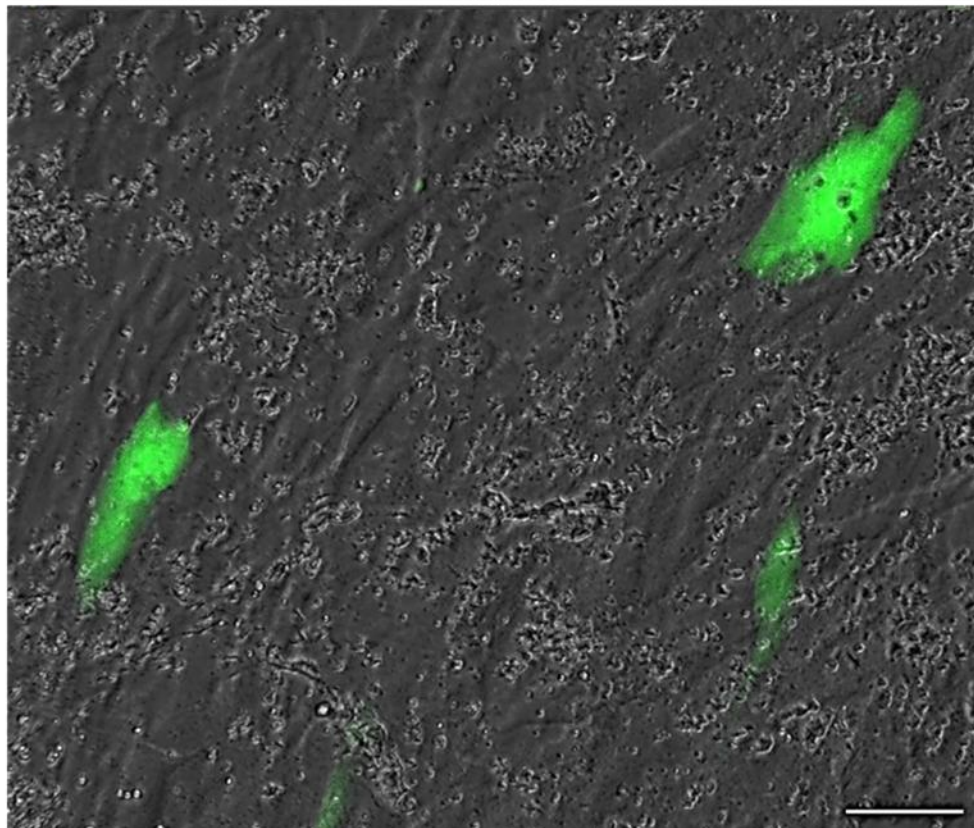


Figura 25: immagini rappresentative della diversa disposizione spaziale e della diversa morfologia delle Saos-2 co-coltivate con osteoblasti controllo rispetto a quelle con osteoblasti pre-trattati con CBZ 5 μ M; le prime mostrano una forma allungata con lunghi filopodia, mentre le seconde risultano piú tondeggianti

8 DISCUSSIONE

Lo scopo di questo lavoro può essere schematizzato in tre principali obiettivi. Il primo, data la centralità del pathway di c-MET nell'osteosarcoma, è stato quello di valutare l'azione antitumorale di CBZ in questo setting tumorale. Il secondo obiettivo è stato quello di determinare se il CBZ, farmaco già noto per il suo effetto antitumorale e per la sua capacità di migliorare la salute ossea di pazienti affetti da tumori metastatici, fosse in grado di esercitare un effetto diretto sul microambiente osseo. L'ultimo obiettivo, ma non il meno importante, è stato quello di verificare se l'effetto che il farmaco esercita sul microambiente osseo potesse avere delle conseguenze anche sull'osteosarcoma stesso, in un setting sperimentale di co-coltura "cell-to cell contact-based" molto più vicino alla realtà fisio-patologica del tumore rispetto ai normali esperimenti *in vitro*.

Numerosi studi in letteratura hanno dimostrato l'importanza di c-MET nell'osteosarcoma. Nello specifico, il pathway di cMET è up-regolato in diversi istotipi di osteosarcoma e la sua iperattivazione è in grado di promuovere la trasformazione e la proliferazione delle cellule di osteosarcoma (88, 89). Inoltre, studi preclinici su modello murino, ad esempio, hanno dimostrato che il crizotinib, piccola molecola ad azione inibente c-MET, è in grado di inibire la crescita di osteosarcomi xenotrapiantati in modelli murini (2).

L'effetto del CBZ è stato ampiamente valutato, mediante esperimenti *in vitro*, su diverse linee cellulari tra cui cellule di: neoplasie mammarie, prostatiche, tiroidee e gliomatose (91) ma non su linee di osteosarcoma. In letteratura i trattamenti *in vitro* con CBZ prevedono concentrazioni che vanno da 0 a 10 μM (130). Abbiamo quindi scelto per i nostri esperimenti le concentrazioni 0.1 e 5 μM . Tali concentrazioni si sono dimostrate efficaci in trattamenti *in vitro* su linee cellulari di tumore alla prostata (131) e cancro renale (132)

Nel presente lavoro abbiamo osservato che il trattamento con CBZ alla concentrazione 5 μM inibisce in modo significativo la proliferazione delle linee di osteosarcoma HOS e MG-63 già a 96 ore, mentre invece su Saos-2 e U-2 OS l'effetto, seppur di entità simile, diventa significativo solo a 168 ore. Questo tipo di inibizione è paragonabile a quella riscontrata in altri studi *in vitro* sull'osteosarcoma che prevedevano l'utilizzo di altri farmaci. Ad esempio Neradel e collaboratori utilizzando il metotrexate, hanno osservato un decremento della proliferazione cellulare (analizzata tramite saggio MTT) statisticamente significativo dopo 144 ore (133). L'effetto osservato è simile a quello di altre targeted therapies, quali sorafenib e sunitinib, testate su linee cellulari di osteosarcoma (61, 64). L'inibizione della proliferazione osservata alla concentrazione 5 μM di CBZ mantiene la significatività statistica fino all'ultimo time point di analisi. Nelle linee Saos-2 e U-2

OS a 168 ore di trattamento, inoltre, anche l'inibizione esercitata da CBZ 1 μ M risulta statisticamente significativa. Il ciclo cellulare delle cellule di osteosarcoma in seguito a trattamento con CBZ 5 μ M viene modificato. L'inibizione di c-MET, infatti, sembra causare nelle linee MG-63, Saos-2 e U-2 OS un blocco in fase G₀/G₁, dovuto o al cosiddetto restriction point, che dipende strettamente dalla disponibilità dei fattori di crescita affinché la cellula passi dalla fase di quiescenza alla fase G₁, oppure al checkpoint cellulare, quello che controlla l'ingresso delle cellule in fase S e che, invece, dipende dall'integrità del genoma (134). La linea HOS analizzata al citofluorimetro in seguito al trattamento con CBZ non mostra l'accumulo in fase G₀/G₁, tipico delle altre linee testate, ma esibisce uno spiccato aumento della fase sub-G₁, solitamente associato ad un aumento della frammentazione del DNA provocato da apoptosi (135). Per capire meglio il particolare effetto di CBZ sulle HOS, sono state eseguite delle immunofluorescenze marcando il fuso mitotico con un anticorpo anti- α -tubulina e delle analisi al microscopio ottico che hanno portato all'osservazione di mitosi aberranti solamente in questa linea quando trattata con CBZ. In particolare, si vanno a formare moltissime mitosi triple, con fusi mitotici con tre centrioli capaci tutti di tirare a sé i cromosomi durante l'anafase. Le cellule che si dividono in questo modo, però, non riescono mai a effettuare una citodieresi completa; ne consegue che dopo la mitosi si forma una cellula gigante con quantità aberranti di DNA, che potrebbe spiegare il diverso pattern riscontrato all'analisi citofluorimetrica. Non si ritrovano in letteratura farmaci che sulle linee di osteosarcoma, né nello specifico sulla linea HOS, causano questo effetto a livello della mitosi; potrebbe essere un effetto che il farmaco provoca solo in alcuni sottotipi istologici e ulteriori analisi andranno condotte per comprendere meglio questo meccanismo. Il CBZ, oltre a causare una forte inibizione della proliferazione, provoca anche un significativo decremento del tasso di migrazione in tutte le linee cellulari testate alla concentrazione 5 μ M. Anche un altro inibitore di c-MET, chiamato SU11274, ha dimostrato di inibire la migrazione di modelli cellulari di osteosarcoma (136) e questa inibizione era paragonabile a quella provocata da altri inibitori di tirosin chinasi testati, tra cui anti EGFR, anti HER-2 e anti IGF-1R. In un lavoro pubblicato nel 2007 da Shor e collaboratori, è stato dimostrato che il dasatinib, inibitore di Src, provoca una forte inibizione del tasso di migrazione in diverse linee cellulari tra cui molte di osteosarcoma (137). Poiché il recettore c-MET tra i pathway di trasduzione del segnale che attiva a valle prevede anche l'attivazione di Src/FAK (138), potrebbe essere questa la via attraverso la quale CBZ inibisce la migrazione delle cellule di osteosarcoma. I dati estrapolati dall'analisi del wound healing assay e dalle curve di crescita cellulare, sono risultati concordi nell'evidenziare l'efficacia del trattamento con CBZ 5 μ M, nell'inibire due caratteristiche fondamentali della cellula tumorale, quali il tasso di proliferazione e la migrazione cellulare. Questi due parametri sono ampiamente studiati in letteratura nei modelli *in vitro* perché è stato dimostrato

che una loro inibizione è correlata ad una diminuzione del tumor size in modelli di topo xenotrapiantati (130). Per tale motivo questa concentrazione è stata scelta per l'esecuzione dei successivi esperimenti. L'inibizione della fosforilazione di cMET (e quindi della sua attivazione) da parte del CBZ alla concentrazione 5 μ M risulta significativa già dopo 1 ora dall'inizio del trattamento, e rimane costante fino a 48 ore in tutte le linee cellulari testate, fatta eccezione per la linea Saos-2, dove fosfo-c-MET ritorna a livelli normali dopo 24 ore. Con un'inibizione di c-MET così rapida, si può ipotizzare che, come conseguenza, si inneschi una cascata di modificazioni molecolari in alcuni pathways a valle del recettore, il cui effetto si ripercuote a 48 ore su proliferazione e migrazione. I pathways analizzati a valle di c-MET sono stati ERK e AKT, due tra le più importanti vie di segnalazione cellulari (138). Dal pathway di ERK dipende la proliferazione delle cellule, mentre da quello di AKT dipende la survival delle stesse (139, 140). L'effetto di CBZ sui due pathways è leggermente diverso. Il trattamento con CBZ 5 μ M causa, infatti, una quasi totale inibizione del pathway di AKT e una serie di ondate inibitorie sigmoidali sul pathway di ERK, come se ci fosse un qualche meccanismo a feedback che prova a reinstaurare i normali valori di fosfo-ERK ma che mai ci riesce completamente. Queste vie di segnalazione aberranti sono in grado di spiegare il rallentamento della proliferazione e il blocco nella fase G₁ nelle linee MG-63, Saos-2 e U-2 OS che a questo punto sembra più essere dovuto al restriction point dei nutrienti (l'attività di ERK e AKT dipende da mitogeni e fattori di crescita) piuttosto che da danni al DNA. Le cellule di osteosarcoma trattate con CBZ sembrano attivare il meccanismo autofagico, data la presenza di maggiori quantità della forma attiva della proteina LC3. Questo meccanismo era ipotizzabile dal momento che AKT, mediante l'attivazione di mTOR, è un regolatore negativo dell'autofagia (141). Per il futuro è ipotizzabile anche una combinazione tra CBZ e farmaci quali la cloroquina o inibitori di AMPK che sono capaci di inibire l'autofagia e vedere se esiste un possibile effetto sinergico (142, 143).

E' evidente che il limite maggiore di uno studio *in vitro* è la sua selettività, che trascura le importanti interazioni tra la linea cellulare studiata ed il suo microambiente circostante. Tali interazioni, negli ultimi anni, sono state riconosciute come fondamentali nello sviluppo e nella progressione delle patologie neoplastiche in generale e in particolare dell'osteosarcoma (144). Come già sottolineato, il secondo obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare il possibile effetto di CBZ nel microambiente osseo. Nei recenti anni, sono stati fatti diversi studi per comprendere l'efficacia del CBZ in diversi tipi di tumore e ci si è presto focalizzati sugli end point ossei. Studi preclinici su modelli murini di tumore alla prostata metastatico all'osso hanno dimostrato che il farmaco provoca una soppressione della crescita tumorale e un alterato rimodellamento osseo (129, 145). In uno studio di fase II su uomini affetti da cancro alla prostata in

fase di resistenza alla castrazione, è stata trovata un'associazione tra trattamento con CBZ e migliore risposta alla scintigrafia ossea, sollievo dal dolore osseo e PFS rispetto al placebo (95, 146, 147). Il conseguente studio di fase III COMET-1, pur non avendo raggiunto l'end-point primario di una maggiore Overall Survival (OS) dei pazienti trattati con CBZ rispetto a prednisone, ha comunque dimostrato che il CBZ è in grado a 12 settimane di migliorare la scintigrafia ossea di questi pazienti (42 % CBZ vs 3 % prednisone), di diminuire gli eventi scheletrici (14 % CBZ vs 21 % prednisone), migliorare la PFS (5.5 mesi CBZ vs 2.8 mesi prednisone) e migliorare i biomarkers ossei (148). Più di recente, è stato condotto un altro studio di fase III (METEOR) con l'obiettivo di comparare il trattamento con CBZ a quello con everolimus in pazienti con tumore renale metastatico. In generale lo studio ha dimostrato che CBZ è capace di diminuire il rischio di progressione o di morte rispetto a everolimus (96). Ancor più importante per i nostri scopi, è stata l'analisi del sottogruppo di pazienti con metastasi ossee (23 %), da cui è risultato che il CBZ aumenta la PFS rispetto a everolimus (7.4 vs 2.7 mesi). Inoltre, gli eventi scheletrici in pazienti che già avevano avuto interessamento osseo della malattia sono stati riportati solamente in 15 di 91 pazienti (16 %) trattati con CBZ, mentre in 31 di 90 (34 %) pazienti trattati con everolimus (149, 150). Questi risultati descritti fino ad ora mostrano chiaramente che il CBZ riesce a migliorare la malattia ossea di pazienti con tumore metastatico. Quello che, però, fino ad ora non è stato dimostrato è se il CBZ eserciti questo effetto agendo solo sulla cellula tumorale, impedendole di influire in modo negativo sul microambiente osseo, oppure se le stesse cellule del tessuto osseo possano rappresentare un target del farmaco e venire quindi influenzate in modo da migliorare la malattia ossea dei pazienti. In letteratura, infatti, è stato dimostrato che alcuni farmaci ideati specificatamente per colpire le cellule tumorali, come ad esempio abiraterone per il tumore alla prostata, possono, invece, esercitare un profondo effetto sulle cellule dell'osso (151). Per questo motivo in questo lavoro, sono state testate diverse concentrazioni di CBZ sulle cellule del tessuto osseo, in particolare osteoclasti e osteoblasti. Si è scelto di testare cellule umane primarie per entrambi i tipi cellulari per avere un modello il più vicino possibile alla reale situazione fisiopatologica dei pazienti. Come primo step è stato verificato se le cellule del tessuto osseo esprimessero il principale target molecolare del CBZ, il recettore c-MET. Sia a livello di mRNA che di proteina, gli osteoclasti e gli osteoblasti esprimono buoni livelli di c-MET. Gli osteoclasti, durante il differenziamento, riducono l'espressione di c-MET e per questo motivo si è scelto di impostare i trattamenti a partire dal giorno 1 del protocollo differenziativo, quando l'effetto del farmaco potrebbe essere maggiore. Gli osteoblasti, invece, mantengono invariata l'espressione di c-MET durante tutto il periodo differenziativo e quindi il trattamento è stato impostato solamente nell'ultima settimana di differenziamento. Sia il differenziamento che l'attività osteoclastica sono

fortemente inibiti dal trattamento con CBZ, anche se le dosi di farmaco utilizzate, prese da studi presenti in letteratura (129), non ne influenzano la vitalità. Questo dato è molto simile a quello trovato da Dai e collaboratori su osteoclasti murini (129). Questo significa che il pathway a valle di c-MET influenza fortemente l'osteoclasta. L'inibizione di c-MET porta a modificazioni profonde a livello genico negli osteoclasti. In particolare, vengono down-modulati i geni *TRAP*, *RANK* e *CATK*. Il recettore RANK è il principale regolatore del differenziamento osteoclastico. Dal legame RANKL-RANK parte una via di segnalazione che coinvolge principalmente NFATc1 e NFκβ e che porta al differenziamento osteoclastico (152, 153). Questo dato, quindi, è concorde con la diminuzione del differenziamento osteoclastico analizzato tramite la colorazione TRAP. La diminuzione dell'espressione di *CATK*, invece, conferma la diminuzione dell'attività osteoclastica analizzata tramite osteo-assay. La catepsina-K, infatti, è la proteina utilizzata dagli osteoclasti per riassorbire la matrice ossea, ed è stato dimostrato che una sua diminuzione è associata ad una minore attività di queste cellule (154). L'unico gene marker che non varia negli osteoclasti in seguito a trattamento con CBZ è *MMP9*. La metallo proteinasi 9 è una proteina necessaria per il reclutamento dei precursori osteoclastici all'osso e per la migrazione degli osteoclasti all'interno della matrice ossea (155); questo aspetto, pur non essendo modificato dal trattamento, non influenza l'attività osteoclastica, che viene comunque inibita, come si riscontra dall'analisi mediante osteo-assay. Dati di letteratura dimostrano come nella linea monocito-macrofagica da cui derivano gli osteoclasti esista una cascata di eventi che va dalla stimolazione del recettore c-fms (Colony Stimulating Factor 1 Receptor) da parte di M-CSF, alla produzione di RANK, che se stimolato, porta al differenziamento osteoclastico, alla produzione di catepsina-K e al riassorbimento osseo (156). Dal momento che i trattamenti con CBZ sugli osteoclasti sono stati eseguiti in presenza sia di M-CSF che di RANKL, i nostri dati fanno ipotizzare che l'inibizione del recettore c-MET provochi come primo step una down-modulazione del recettore RANK; poiché la regolazione dell'espressione di questo gene è strettamente correlata all'attività del recettore c-fms, si potrebbe ipotizzare che l'inibizione di c-MET provochi un blocco dell'attività del recettore c-fms con il conseguente blocco a valle del differenziamento osteoclastico. Ulteriori analisi sono necessarie per confermare questa ipotesi.

L'effetto che il CBZ provoca a livello degli osteoblasti è ben diverso da quello che provoca sugli osteoclasti. In letteratura sono presenti due studi sull'effetto del CBZ su modelli immortalizzati di osteoblasti murini quali MC3T3-E1 e ST-2. Dai e collaboratori hanno dimostrato che il trattamento con CBZ 5 μM su tali cellule non altera la loro positività al marcatore osteoblastico ALP e fa diminuire di poco la capacità di queste cellule di apporre matrice ossea (129). Tale dato è confermato anche da Stern e collaboratori (157). I nostri dati confermano, per la prima volta in un

modello umano, che il trattamento con CBZ non influenza né il differenziamento, né l'attività, né la vitalità degli osteoblasti. Abbiamo, inoltre, analizzato l'effetto del CBZ 5 μ M sull'espressione di alcuni geni marker osteoblastici: *ALP*, *OCN*, *RUNX2*, *OSX*, *RANKL* e *OPG*. Anche Stern e collaboratori hanno analizzato l'espressione di alcuni di questi geni nel loro modello di osteoblasti murini, trovando una diminuzione significativa dell'espressione di *ALP* e *RANKL*, ma non di *OPG* (157). I nostri risultati su osteoblasti umani primari dimostrano che le variazioni nei livelli dell'mRNA del gene *ALP* non sono statisticamente significative. Statisticamente significativa, invece, è risultata la variazione dei livelli di mRNA per i geni *OCN*, *OSX*, *RUNX2*, *OPG* e *RANKL* tra osteoblasti trattati e non; in particolare, tale analisi ha mostrato un aumento del rapporto *OPG/RANKL* nel campione trattato, dovuto sia ad un aumento dell'espressione dell'*OPG*, sia ad una diminuzione dell'espressione di *RANKL*. La parziale discordanza tra i nostri dati e quelli riscontrati in letteratura è da ascrivere alla diversità dei due modelli usati, uno murino, l'altro, il nostro, umano (157). Nel nostro caso, la dimostrazione dell'influenza del CBZ sulla produzione di *OPG* da parte degli osteoblasti, oltre a quella già nota di *RANKL* nel modello murino, fa ipotizzare una maggiore influenza sul microambiente osseo tumorale, con conseguenti effetti indiretti sulla cellula tumorale stessa. Questi geni, infatti, rappresentano dei fattori di fondamentale importanza nel microambiente tumorale osseo nella maggior parte delle neoplasie a tropismo osseo (158). Essendo *OPG* e *RANKL* due citochine secrete, abbiamo deciso di confermare il precedente dato in ELISA, andando, quindi, a quantificare la quantità di citochina presente nel mezzo di coltura. Sono state testate varie concentrazioni di CBZ su osteoblasti umani primari e si è riscontrato un aumento significativo della quantità di *OPG* e una diminuzione significativa di quella di *RANKL*, solamente alla concentrazione 5 μ M di CBZ. Questo dato fa ipotizzare che il CBZ potrebbe esercitare un effetto inibitorio sull'osteoclasta non solo direttamente, come precedentemente discusso, ma anche indirettamente attraverso la diminuzione della produzione di *RANKL* (citochina pro-osteoclastogena) e l'aumento di *OPG* (citochina anti-osteoclastogena) da parte degli osteoblasti. L'effetto sulla produzione di queste due citochine provocato dall'inibizione di c-MET, potrebbe essere mediato dalla perturbazione di alcuni pathways intracellulari a valle del recettore inibito da CBZ. In particolare, in letteratura è stato ipotizzato che una possibile regolazione del balance di produzione tra *RANKL* e *OPG* dipenda dall'equilibrio dei segnali attivatori che regolano la famiglia delle MAPK (126). In particolare, un equilibrio spostato verso una maggiore attività di ERK, una delle più importanti chinasi attivata dai fattori di crescita, piuttosto che verso l'attività delle chinasi p38 e JNK, attivate dai fattori di stress, porterebbe ad una maggiore produzione di *RANKL* rispetto a *OPG*. Nel caso in cui invece la bilancia sia più spostata verso le chinasi dello stress invece che su ERK, l'osteoblasta produrrebbe più *OPG* che *RANKL*. Saggiando questi

pathways su osteoblasti controllo e trattati con CBZ 5 μ M, abbiamo trovato che l'inibizione di c-MET porta ad una diminuzione del pathway di ERK e ad una leggera attivazione di p38 e JNK. Inoltre, è stata trovata anche una forte inibizione dell'attività di AKT, altra fondamentale chinasi responsabile della trasduzione del segnale a valle di c-MET (138). L'alterazione di questi importanti pathways potrebbe spiegare l'alterato balance nella produzione di RANKL/OPG negli osteoblasti trattati rispetto a quelli controllo. Per verificare se il cambiamento nella produzione di queste citochine fondamentali nella regolazione dell'osteoclastogenesi potesse effettivamente avere una ripercussione sulla capacità degli osteoclasti di differenziare, è stato allestito un esperimento di co-coltura tra osteoblasti controllo o pretrattati con il farmaco e monociti CD 14+ isolati da PBMCs. I fattori importati in questo tipo di esperimento sono stati due. Innanzitutto, il trattamento degli osteoblasti con CBZ è stato interrotto e le cellule sono state lavate più volte al fine di eliminare ogni possibile residuo di farmaco. Inoltre, la co-coltura è stata effettuata senza l'aggiunta di RANKL esogeno, lasciando quindi il "compito" di differenziare i monociti in osteoclasti completamente agli osteoblasti. Questo tipo di co-coltura è già stata eseguita in alcuni lavori in letteratura (126, 127). Come marker per riconoscere gli osteoclasti è stato scelto il TRAP, dal momento che gli osteoblasti coltivati da soli sono risultati assolutamente negativi per questa colorazione. Testando il pre-trattamento sugli osteoblasti con varie concentrazioni di CBZ, è risultato che solo quella 5 μ M provoca una significativa inibizione dell'osteoclastogenesi. Questa concentrazione, che come dimostrato dal saggio Live/Dead non provoca la morte degli osteoblasti neanche a 14 giorni dalla fine del trattamento, è proprio la stessa in grado di perturbare l'equilibrio tra produzione di RANKL e OPG, in favore di quest'ultima, negli osteoblasti. Questo dato di co-coltura, quindi, conferma la nostra ipotesi riguardo il doppio effetto anti-osteoclastogenico di CBZ, uno diretto sull'osteoclasta, e uno indiretto attraverso l'osteoblasta. Con la prima parte di questa tesi, quindi, si è appurato che il miglioramento dei parametri ossei riscontrato nei pazienti con tumori di vario tipo, come prostata (95) e reni (96), è ascrivibile non soltanto all'effetto diretto di CBZ sulle cellule tumorali, diminuendo la loro proliferazione, ma anche all'effetto che il farmaco esercita sulle cellule del microambiente osseo. Il risultato finale di questo effetto, secondo i nostri dati, è una forte inibizione del differenziamento e dell'attività osteoclastica, con la conseguente diminuzione del riassorbimento osseo. Come noto in letteratura, i fattori rilasciati dalla matrice ossea (tra cui TGF- β) a causa dell'attività osteoclastica vengono sfruttati dalle cellule tumorali della metastasi per aumentare la proliferazione, in quel fenomeno noto come circolo vizioso (110, 111). Inibendo il differenziamento e l'attività osteoclastica, quindi, il CBZ potrebbe essere in grado di rompere questo circolo vizioso e diminuire, anche indirettamente la proliferazione delle cellule tumorali nella metastasi ossea. La questione importante nel contesto di questa tesi è che anche

l'osteosarcoma, con le citochine che è in grado di produrre, provoca delle lesioni osteolitiche (159). Anche nel setting tumorale di nostro interesse, quindi, il CBZ potrebbe essere in grado di migliorare la malattia ossea dei pazienti attraverso l'interruzione del circolo vizioso. Il modello da noi proposto riguardo l'azione del CBZ nel microambiente osseo è schematizzato in figura 26.

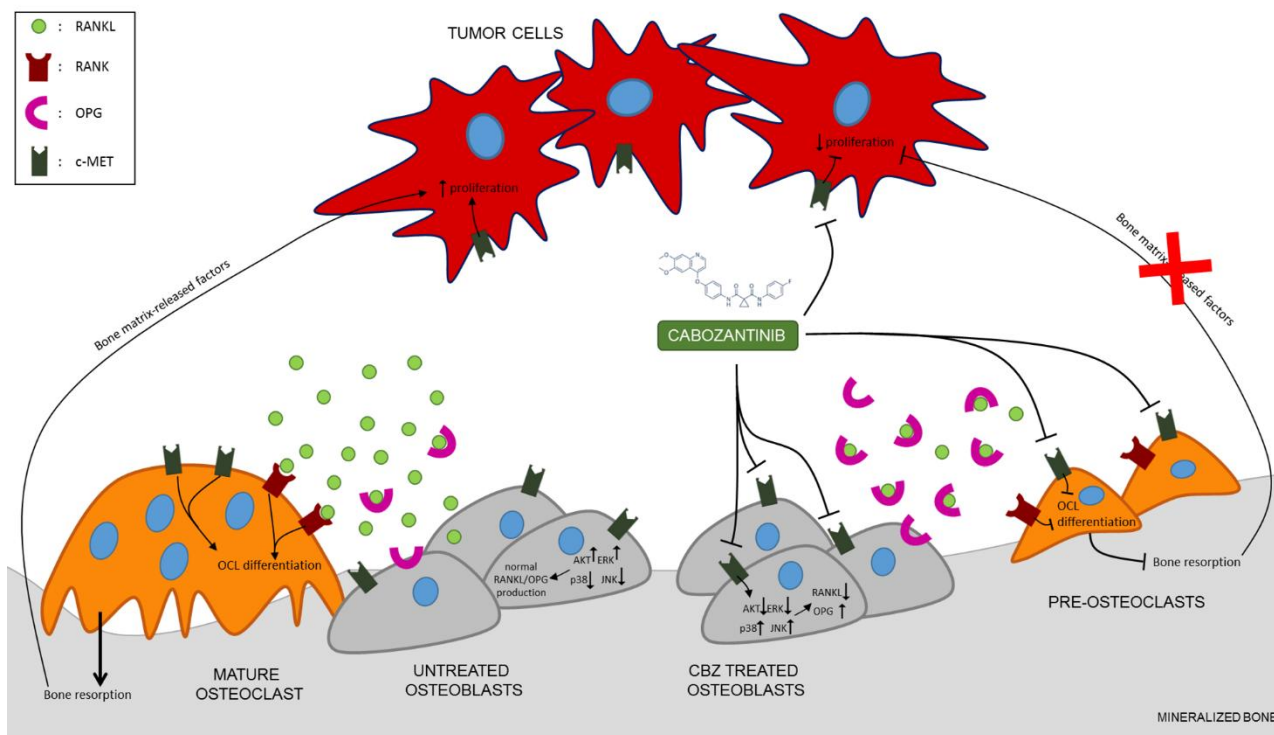


Figura 26: modello rappresentativo del meccanismo di azione di CBZ nel microambiente osseo

La terza e ultima parte di questo progetto ha avuto come obiettivo quello di valutare come il microambiente osseo trattato con CBZ è capace di influenzare le cellule di osteosarcoma. Questa rappresenta una porzione fondamentale di questo studio. Come sottolineato in precedenza, infatti, anche se sono stati condotti numerosissimi studi volti ad individuare nuove targeted therapies nell'osteosarcoma, l'alta eterogeneità di questo tipo tumorale ha fatto spesso fallire gli studi clinici o comunque ha ridotto di molto l'efficacia di questi farmaci (72, 73). Il tumore, infatti, seppur colpito da un determinato farmaco, può sfruttare la riserva di citochine e fattori di crescita prodotti nel microambiente osseo, utilizzandoli come fonte di supporto per la proliferazione e la progressione della malattia (72, 73). In ogni tumore, ma forse maggiormente nell'osteosarcoma, il microambiente osseo tumorale gioca questo importantissimo ruolo; trovare, quindi, una terapia in grado in primis di colpire le cellule tumorali e poi di "arruolare" il microambiente tumorale contro il tumore stesso, dovrebbe essere l'obiettivo finale di ogni ricerca oncologica traslazionale. Avendo osservato l'interessante effetto di CBZ sul microambiente osseo, abbiamo indagato se questo

fenomeno potesse influenzare negativamente le cellule tumorali. L'effetto più marcato di CBZ sul microambiente osseo, come detto in precedenza, riguarda lo switch nella produzione di RANKL e OPG da parte degli osteoblasti. Per capire se questo potesse avere un effetto sulle cellule di osteosarcoma, abbiamo innanzitutto indagato se le nostre linee cellulari esprimessero il recettore RANK. Nel 2007 Mori e collaboratori hanno pubblicato un lavoro dove analizzavano l'espressione di alcuni geni marker tipici delle cellule dell'osso in diverse linee cellulari di osteosarcoma (75). L'espressione di *RANK* è stata riscontrata, per quanto riguarda le nostre linee cellulari, nelle HOS, nelle MG-63 e nelle Saos-2, ma non nelle U-2 OS (75). In questo lavoro è stato replicato questo dato in PCR e ed è stato confermato anche a livello proteico mediante western blot. Per effettuare la co-cultura "cell-to cell contact based" si è scelto di trasfettare nelle cellule di osteosarcoma il gene per la GFP. Dall'esperimento di co-cultura si vede chiaramente che le cellule RANK+ subiscono un'inibizione della proliferazione quando co-coltivate con osteoblasti pre-trattati con CBZ 5 μ M rispetto agli osteoblasti controllo. Questa forte inibizione della proliferazione sparisce quando è la linea RANK- ad essere impiegata nella co-cultura con gli osteoblasti. Questo dato può rappresentare la prova che, oltre a esercitare un effetto diretto sulle cellule di osteosarcoma, il CBZ è capace, attraverso il microambiente osseo, di inibire il tumore, se questo è positivo al RANK. In questo senso la positività al recettore RANK nell'osteosarcoma potrebbe rappresentare un fattore predittivo di risposta al farmaco. Sono già state condotte analisi su campioni primari di osteosarcoma per verificare la positività a questo marcatore. Nel lavoro di Mori citato precedentemente, sono stati analizzati 19 campioni primari di osteosarcoma e il 57% è risultato positivo; in questo studio, i tumori positivi al RANK, sono risultati anche quelli più aggressivi e che rispondono peggio alla chemioterapia (75). In un altro studio, la positività al RANK è stata trovata nel 69.2 % dei campioni analizzati (in totale 91) e sebbene non sia stata trovata una correlazione tra espressione del RANK e risposta alla chemioterapia come nel precedente studio, si è osservata una sopravvivenza libera da malattia più breve nei pazienti con tumore RANK+ (76). Questi dati, insieme, confermano la nostra ipotesi secondo la quale il CBZ, provocando l'aumento di OPG e la diminuzione di RANKL nel microambiente osseo, può inibire la proliferazione delle cellule di osteosarcoma che esprimono RANK e rendere il tumore meno aggressivo. Attendendo la conclusione del trial CABONE (NCT02243605), sarebbe in futuro importante interpretare i dati derivanti da questo studio considerando anche il sottogruppo di pazienti positivi al marker RANK. Alla luce dei dati ottenuti in questa tesi, quindi, si può concludere che il CBZ è in grado di inibire sia la proliferazione che la capacità migratoria delle cellule di osteosarcoma, dove il recettore c-MET, target del farmaco, gioca un ruolo fondamentale nella progressione tumorale. Inoltre, attraverso lo switch nella produzione di RANKL e OPG da parte degli osteoblasti, il CBZ è in grado di inibire la proliferazione delle cellule

di osteosarcoma RANK+. Il modello di azione del CBZ nell'osteosarcoma da noi proposto è schematizzato in figura 27.

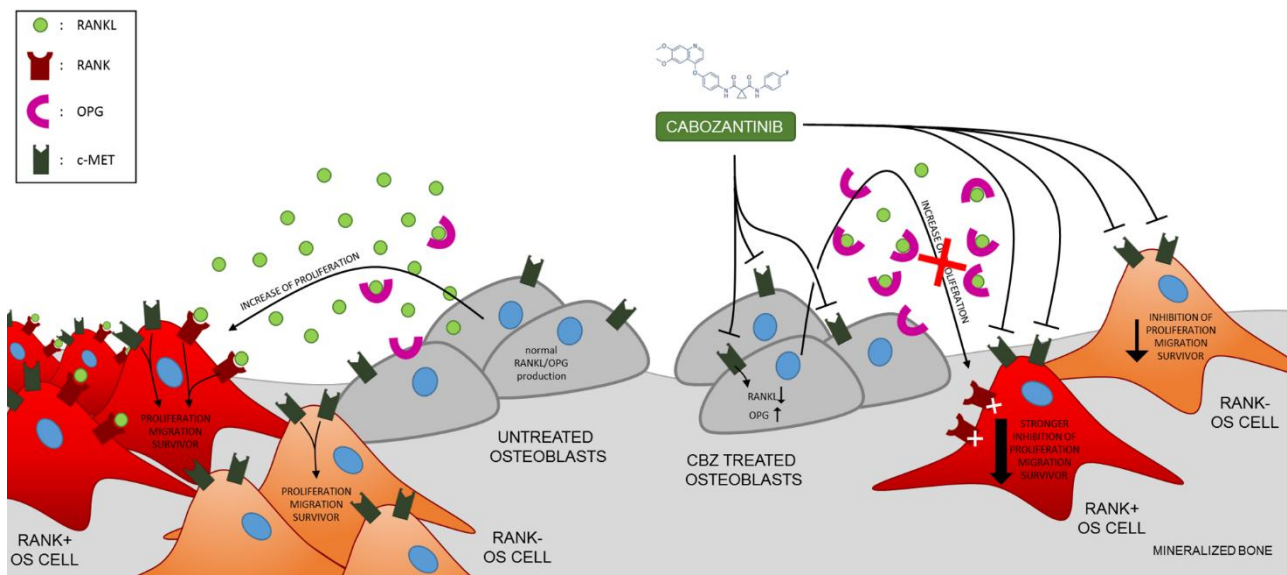


Figura 27: modello rappresentativo del meccanismo di azione di CBZ sull'osteosarcoma (OS) nel contesto del microambiente osseo

9 CONCLUSIONI

L'osteosarcoma e le metastasi ossee da tumore solido rappresentano, per diversi motivi, due problemi di fondamentale importanza dell'oncologia. In particolare, l'osteosarcoma è uno dei tumori a più alta incidenza e maggiormente aggressivo nei bambini e negli adolescenti; le metastasi ossee, invece, rappresentano una delle maggiori complicazioni a seguito di diversi tipi di tumore, tra cui anche tumore al seno e alla prostata. In entrambi i casi, il microambiente osseo rappresenta il "terreno" e la fonte di nutrienti che le cellule tumorali usano per proliferare. In questo contesto, il fisiologico equilibrio che finemente regola le stesse cellule del tessuto osseo, a causa dell'influenza delle cellule tumorali, viene disturbato, recando danni all'osso stesso. L'obiettivo della ricerca oncologica traslazionale nel presente e nell'immediato futuro è quello di trovare nuove soluzioni terapeutiche che riescano da una parte a combattere efficacemente il tumore, dall'altra a non colpire i tessuti sani del paziente. Nella ricerca di un target terapeutico sta prendendo sempre più importanza il ruolo del microambiente tumorale, un fattore che il tumore è in grado di plasmare a proprio vantaggio per accrescere le proprie capacità di proliferazione e accrescimento. Convertire il microambiente tumorale a vantaggio non del tumore ma del paziente rappresenterebbe, quindi, un'ottima soluzione terapeutica. È in tale contesto che si inserisce questa tesi di dottorato. Secondo i nostri dati, il CBZ è in grado di contrastare l'accrescimento dell'osteosarcoma, sia inibendo direttamente le cellule tumorali, sia influenzando il microambiente osseo. In particolare, il farmaco è capace di bloccare il rilascio di fattori pro-tumorali da parte delle cellule dell'osso, senza però modificarne la vitalità, il differenziamento e l'attività. In altre parole, il CBZ potrebbe colpire l'osteosarcoma, con l'aiuto di un importantissimo alleato, il microambiente osseo. Aspettando i risultati degli studi clinici on-going riguardanti questo farmaco, i nostri dati rappresentano comunque una buona base di partenza nell'interpretazione dei futuri dati. Inoltre, il modello "cell-to-cell contact-based" da noi utilizzato, avvicinandosi di più alla complessità fisio-patologica delle interazioni tra tumore e microambiente, potrebbe rappresentare un modello *in vitro* facile e rapido da utilizzare per lo studio dell'efficacia di nuovi farmaci in diversi tipi di tumore.

10 BIBLIOGRAFIA

- 1) Moore D.D. and Luu H.H., *Osteosarcoma, in Orthopaedic Oncology*. Springer, 2014
- 2) Kansara M. et al., *Translational biology of osteosarcoma*. Nat Rev Cancer, 2014
- 3) Mirabello L. et al., *Osteosarcoma incidence and survival rates from 1973 to 2004: data from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Program*. Cancer, 2009
- 4) Dahlin D.C. and Unni K.K., *Osteosarcoma of bone and its important recognizable varieties*. Am J Surg Pathol, 1977
- 5) Iannaci G. et al., *Extraskelatal osteosarcoma: a very rare case report of primary tumor of the colon-rectum and review of the literature*. Pathol Res Pract, 2013
- 6) Kansara M. and Thomas D.M., *Molecular pathogenesis of osteosarcoma*. DNA Cell Biol, 2007
- 7) Ottaviani G. and Jaffe N., *Clinical and pathologic study of two siblings with osteosarcoma*. Med Pediatr Oncol, 2002
- 8) Wang, L.L., *Biology of osteogenic sarcoma*. Cancer J, 2005
- 9) Hansen M.F. et al., *Osteosarcoma and retinoblastoma: a shared chromosomal mechanism revealing recessive predisposition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985
- 10) Wadayama B. et al., *Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas*. Cancer Res, 1994
- 11) Li F.P. et al., *A cancer family syndrome in twenty-four kindreds*. Cancer Res, 1988
- 12) Laurin N. et al., *Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone*. Am J Hum Genet, 2002.
- 13) Ottaviani G. and Jaffe N., *The etiology of osteosarcoma*. Cancer Treat Res, 2009.
- 14) Rockwell M.A. and Enneking W.F., *Osteosarcoma developing in solitary enchondroma of the tibia*. J Bone Joint Surg Am, 1971.
- 15) Huvos A.G. et al., *Bone sarcomas arising in fibrous dysplasia*. J Bone Joint Surg Am, 1972.
- 16) Johnston R.M. and Miles J.S., *Sarcomas arising from chronic osteomyelitic sinuses. A report of two cases*. J Bone Joint Surg Am, 1973.
- 17) Le Vu B. et al., *Radiation dose, chemotherapy and risk of osteosarcoma after solid tumours during childhood*. Int J Cancer, 1998.
- 18) Shigematsu I., *Health effects of atomic bomb radiation*. Rinsho Byori, 1994.
- 19) Klein M.J. and Siegal G.P., *Osteosarcoma: anatomic and histologic variants*. Am J Clin Pathol, 2006.
- 20) Messerschmitt P.J. et al., *Osteosarcoma*. J Am Acad Orthop Surg, 2009.
- 21) Ganguly, S.S. et al., *The host microenvironment influences prostate cancer invasion, systemic spread, bone colonization, and osteoblastic metastasis*. Front Oncol, 2014.
- 22) Yarmish G. et al., *Imaging characteristics of primary osteosarcoma: nonconventional subtypes*. Radiographics, 2010.

- 23) Sangle N.A. and Layfield L.J., *Telangiectatic osteosarcoma*. Arch Pathol Lab Med, 2012.
- 24) Nakajima H. et al., *Small cell osteosarcoma of bone. Review of 72 cases*. Cancer, 1997.
- 25) Jacobson S.A., *Early juxtacortical osteosarcoma (parosteal osteoma)*. J Bone Joint Surg Am, 1958
- 26) Okada, K. et al., *Parosteal osteosarcoma. A clinicopathological study*. J Bone Joint Surg Am, 1994.
- 27) Raymond A.K., *Surface osteosarcoma*. Clin Orthop Relat Res, 1991
- 28) Wold L.E. et al., *Dedifferentiated parosteal osteosarcoma*. J Bone Joint Surg Am, 1984.
- 29) Allan C.J. and Soule E.H., *Osteogenic sarcoma of the somatic soft tissues. Clinicopathologic study of 26 cases and review of literature*. Cancer, 1971.
- 30) Kallianpur A.A. et al., *Osteosarcoma of breast: a rare case of extraskelatal osteosarcoma*. J Cancer Res Ther, 2013
- 31) Karagoz Ozen D.S. et al., *Primary osteosarcoma of the heart: experience of an unusual case*. Case Rep Oncol, 2013
- 32) Adamkova Krakorova D. et al., *Analysis of prognostic factors in osteosarcoma adult patients, a single institution experience*. Klin Onkol, 2012.
- 33) Durnali A. et al., *Prognostic factors for teenage and adult patients with high-grade osteosarcoma: an analysis of 240 patients*. Med Oncol, 2013
- 34) Enneking, W.F. et al., *A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma*. Clin Orthop Relat Res, 1980
- 35) Hogendoorn P.C. et al., *Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2010
- 36) Ferrari S. et al., *Neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, cisplatin, and doxorubicin with or without ifosfamide in nonmetastatic osteosarcoma of the extremity: an Italian sarcoma group trial ISG/OS-1*. J Clin Oncol, 2012
- 37) Bacci G. et al., *Grade of chemotherapy-induced necrosis as a predictor of local and systemic control in 881 patients with non-metastatic osteosarcoma of the extremities treated with neoadjuvant chemotherapy in a single institution*. Eur J Cancer, 2005
- 38) O'Reilly R. et al., *NCCN pediatric osteosarcoma practice guidelines. The National Comprehensive Cancer Network*. Oncology (Williston Park), 1996
- 39) Bielack S. et al., *Osteosarcoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2009
- 40) Bacci G. et al., *Treatment and prognosis for synchronous multifocal osteosarcoma in 42 patients*. J Bone Joint Surg Br, 2006.
- 41) Brandal P. et al., *Synchronous and metachronous skeletal osteosarcomas: the Norwegian Radium Hospital experience*. Acta Oncol, 2009
- 42) Arkader A. et al., *Multifocal synchronous low-grade intramedullary and juxtacortical osteogenic sarcoma*. Clin Orthop Relat Res, 2007

- 43) Bacci G. et al., *Local recurrence and local control of non-metastatic osteosarcoma of the extremities: a 27-year experience in a single institution.* J Surg Oncol, 2007
- 44) Ayerza M.A. et al., *Effect of erroneous surgical procedures on recurrence and survival rates for patients with osteosarcoma.* Clin Orthop Relat Res, 2006
- 45) Briccoli A. et al., *Resection of recurrent pulmonary metastases in patients with osteosarcoma.* Cancer, 2005
- 46) Aung L. et al., *Metachronous skeletal osteosarcoma in patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for nonmetastatic osteosarcoma.* J Clin Oncol, 2003
- 47) Redondo A. et al., *SEOM clinical guidelines for the treatment of osteosarcoma in adults-2013.* Clin Transl Oncol, 2013
- 48) Weiss A. et al., *Advances in therapy for pediatric sarcomas.* Curr Oncol Rep, 2014
- 49) Chawla S.P. et al., *Phase II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor ridaforolimus in patients with advanced bone and soft tissue sarcomas.* J Clin Oncol, 2012
- 50) Schwartz G.K. et al., *Cixutumumab and temsirolimus for patients with bone and soft-tissue sarcoma: a multicentre, open-label, phase 2 trial.* Lancet Oncol, 2013
- 51) Ebb D. et al., *Phase II trial of trastuzumab in combination with cytotoxic chemotherapy for treatment of metastatic osteosarcoma with human epidermal growth factor receptor 2 overexpression: a report from the children's oncology group.* J Clin Oncol, 2012
- 52) Meyers P.A. et al., *Addition of pamidronate to chemotherapy for the treatment of osteosarcoma.* Cancer, 2011
- 53) Trieb K. et al., *Evaluation of HLA-DR expression and T-lymphocyte infiltration in osteosarcoma.* Pathol Res Pract, 1998
- 54) Goorin A.M. et al., *Weekly high-dose methotrexate and doxorubicin for osteosarcoma: the Dana-Farber Cancer Institute/the Children's Hospital--study III.* J Clin Oncol, 1987
- 55) Winkler K. et al., *Adjuvant chemotherapy in osteosarcoma - effects of cisplatin, BCD, and fibroblast interferon in sequential combination with HD-MTX and adriamycin. Preliminary results of the COSS 80 study.* J Cancer Res Clin Oncol, 1983
- 56) Kleinerman E.S. et al., *Phase II study of liposomal muramyl tripeptide in osteosarcoma: the cytokine cascade and monocyte activation following administration.* J Clin Oncol, 1992
- 57) Chou A.J. et al., *Addition of muramyl tripeptide to chemotherapy for patients with newly diagnosed metastatic osteosarcoma: a report from the Children's Oncology Group.* Cancer, 2009
- 58) Rao R.D. et al., *Aerosolized granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) therapy in metastatic cancer.* Am J Clin Oncol, 2003
- 59) Arndt C.A. et al., *Inhaled granulocyte-macrophage colony stimulating factor for first pulmonary recurrence of osteosarcoma: effects on disease-free survival and immunomodulation. a report from the Children's Oncology Group.* Clin Cancer Res, 2010

- 60) MacEwen E.G. et al., *c-Met tyrosine kinase receptor expression and function in human and canine osteosarcoma cells*. Clin Exp Metastasis, 2003
- 61) Pignochino Y. et al., *Sorafenib blocks tumour growth, angiogenesis and metastatic potential in preclinical models of osteosarcoma through a mechanism potentially involving the inhibition of ERK1/2, MCL-1 and ezrin pathways*. Mol Cancer, 2009
- 62) Pignochino Y. et al., *The Combination of Sorafenib and Everolimus Abrogates mTORC1 and mTORC2 Upregulation in Osteosarcoma Preclinical Models*. Clin Cancer Res, 2013
- 63) Cassinelli G. et al., *Antitumor efficacy of the heparanase inhibitor SST0001 alone and in combination with antiangiogenic agents in the treatment of human pediatric sarcoma models*. Biochem Pharmacol, 2013
- 64) Kumar R.M. et al., *Sunitinib malate (SU-11248) reduces tumour burden and lung metastasis in an intratibial human xenograft osteosarcoma mouse model*. Am J Cancer Res, 2015
- 65) Warzecha J. et al., *Inhibition of osteosarcoma cell proliferation by the Hedgehog-inhibitor cyclopamine*. J Chemother, 2007
- 66) Zhao H. et al., *Arsenic trioxide inhibits the growth of adriamycin resistant osteosarcoma cells through inducing apoptosis*. Mol Biol Rep, 2010
- 67) Hirose T. et al., *p53-independent induction of Gadd45 by histone deacetylase inhibitor: coordinate regulation by transcription factors Oct-1 and NF-Y*. Oncogene, 2003
- 68) Blattmann C. et al. *Enhancement of radiation response in osteosarcoma and rhabdomyosarcoma cell lines by histone deacetylase inhibition*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010
- 69) Yang C. et al., *Histone deacetylase inhibitor (HDACI) PCI-24781 potentiates cytotoxic effects of doxorubicin in bone sarcoma cells*. Cancer Chemother Pharmacol 2011;67:439–446.
- 70) Watanabe K. et al., *Sensitization of osteosarcoma cells to death receptor-mediated apoptosis by HDAC inhibitors through downregulation of cellular FLIP*. Cell Death Differ, 2005
- 71) Baranski Z. et al., *MEK inhibition induces apoptosis in osteosarcoma cells with constitutive ERK1/2 phosphorylation*. Genes Cancer, 2015
- 72) Ehnman M. and Larsson O., *Microenvironmental Targets in Sarcoma*. Front Oncol, 2015
- 73) Botter S.M. et al., *Recent advances in osteosarcoma*. Curr Opin Pharmacol, 2014
- 74) Alfranca A. et al., *Bone microenvironment signals in osteosarcoma development*. Cell Mol Life Sci, 2015
- 75) Mori K, et al., *Human osteosarcoma cells express functional receptor activator of nuclear factor-kappa B*. J Pathol, 2007
- 76) Bago-Horvath Z. et al, *Impact of RANK signalling on survival and chemotherapy response in osteosarcoma*. Pathology, 2014
- 77) Trusolino L. and Comoglio P.M., *Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth*. Nat Rev Cancer, 2002

- 87) Matsumoto K. and Nakamura T., *Hepatocyte growth factor: renotropic role and potential therapeutics for renal diseases*. *Kidney Int*, 2001.
- 79) Mizuno et al., *Hepatocyte growth factor suppresses interstitial fibrosis in a mouse model of obstructive nephropathy*. *Kidney Int*, 2001
- 80) Bussolino F. et al., *Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth*. *J Cell Biol*, 1992
- 81) Soman N.R. et al., *The TPR-MET oncogenic rearrangement is present and expressed in human gastric carcinoma and precursor lesions*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991
- 82) Schmidt L. et al., *Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas*. *Nat Genet*, 1997
- 83) Houldsworth J. et al., *Gene amplification in gastric and esophageal adenocarcinomas*. *Cancer Res*, 1990
- 84) Di Renzo M.F. et al., *Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer*. *Clin Cancer Res*, 1995
- 85) Bean J. et al., *MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007
- 86) Sirotnak F.M. et al., *Microarray analysis of prostate cancer progression to reduced androgen dependence: studies in unique models contrasts early and late molecular events*. *Mol Carcinog*, 2004.
- 87) Verras M. et al., *The androgen receptor negatively regulates the expression of c-Met: implications for a novel mechanism of prostate cancer progression*. *Cancer Res*, 2007
- 88) Patanè S. et al., *MET overexpression turns human primary osteoblasts into osteosarcomas*. *Cancer Res*, 2006
- 89) Dani N. et al., *The MET oncogene transforms human primary bone-derived cells into osteosarcomas by targeting committed osteo-progenitors*. *J Bone Miner Res*, 2012
- 90) Sampson E.R. et al., *The orally bioavailable met inhibitor PF-2341066 inhibits osteosarcoma growth and osteolysis/matrix production in a xenograft model*. *J Bone Miner Res*. 2011
- 91) Yakes F.M. et al., *Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth*. *Mol Cancer Ther*, 2011
- 92) Kurzrock R. et al., *Activity of XL184 (Cabozantinib), an oral tyrosine kinase inhibitor, in patients with medullary thyroid cancer*. *J Clin Oncol*, 2011
- 93) Viola D. et al., *Cabozantinib (XL184) for the treatment of locally advanced or metastatic progressive medullary thyroid cancer*. *Future Oncol*, 2013
- 94) Elisei R. et al., *Cabozantinib in progressive medullary thyroid cancer*. *J Clin Oncol*, 2013
- 95) Smith D.C. et al., *Cabozantinib in patients with advanced prostate cancer: results of a phase II randomized discontinuation trial*. *J Clin Oncol*, 2013

- 96) Choueiri T.K. et al., *Cabozantinib versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma*. N Engl J Med, 2015
- 97) Motzer R.J. et al., *Interferon-alfa as a comparative treatment for clinical trials of new therapies against advanced renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, 2002
- 98) Cody J.J. et al., *A simplified method for the generation of human osteoclasts in vitro*. Int J Biochem Mol Biol, 2011
- 99) Lacey D.L. et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998
- 100) Kong Y.Y. et al., *Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand*. Nature, 1999
- 101) Nakagawa N. et al., *RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 1998
- 102) Simonet W.S. et al., *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell, 1997
- 103) Grimaud E.F. et al., *Osteoprotegerin: a new therapeutic agent for the treatment of bone disease*. Drug Discov Today, 2001
- 104) Good C.R. et al., *Immunohistochemical study of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANK-L) in human osteolytic bone tumors*. J Surg Oncol, 2002
- 105) Grimaud E.F. et al., *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL)/Osteoprotegerin (OPG) Ratio Is Increased in Severe Osteolysis*. The American Journal of Pathology, 2003
- 106) Previdi S. et al., *Interaction between human-breast cancer metastasis and bone microenvironment through activated hepatocyte growth factor/Met and beta-catenin/Wnt pathways*. Eur J Cancer, 2010
- 107) Weber M.H. et al., *Mechanisms of tumor metastasis to bone*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2000
- 108) Eilon G. and Mundy G.R., *Direct resorption of bone by human breast cancer cells in vitro*. Nature, 1978
- 109) Guise T.A. and Mundy G.R., *Cancer and bone*. Endocr Rev, 1998.
- 110) Goltzman D., *Osteolysis and cancer*. Journal of Clinical Investigation, 2001
- 111) Chirgwin J.M. and Guise T.A., *Molecular mechanisms of tumor-bone interactions in osteolytic metastases*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 2000
- 112) Chikatsu N. et al., *Interactions between cancer and bone marrow cells induce osteoclast differentiation factor expression and osteoclast-like cell formation in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2000
- 113) Perez M. et al., *Melanoma cells stimulate osteoclastogenesis, c-Src expression and osteoblast cytokines*. Eur J Cancer, 2001
- 114) Thomas R.J. et al., *Breast cancer cells interact with osteoblasts to support osteoclast formation*. Endocrinology, 1999

- 115) Mancino A.T. et al., *Breast cancer increases osteoclastogenesis by secreting M-CSF and upregulating RANKL in stromal cells.* J Surg Res, 2001
- 116) Ohshiba T. et al., *Role of RANKL-induced osteoclast formation and MMP-dependent matrix degradation in bone destruction by breast cancer metastasis.* Br J Cancer, 2003
- 117) Croucher P.I. et al., *Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma.* Blood, 2001
- 118) Zhang J. et al., *Osteoprotegerin inhibits prostate cancer-induced osteoclastogenesis and prevents prostate tumor growth in the bone.* J Clin Invest, 2001
- 119) Nagai M. et al., *Cancer cells responsible for humoral hypercalcemia express mRNA encoding a secreted form of ODF/TRANCE that induces osteoclast formation.* Biochem Biophys Res Commun, 2000
- 120) Michigami T. et al., *Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) is a key molecule of osteoclast formation for bone metastasis in a newly developed model of human neuroblastoma.* Cancer Res, 2001
- 121) Guise T.A. and Chirgwin J.M., *Transforming growth factor-beta in osteolytic breast cancer bone metastases.* Clin Orthop Relat Res, 2003
- 122) Blum, B. et al., *Measurement of bone morphogenetic proteins and other growth factors in demineralized bone matrix.* Orthopedics, 2004
- 123) Gonzalez-Suarez E. et al., *RANK ligand mediates progesterin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis.* Nature, 2010
- 124) Kukita A. and Kukita T., *Multifunctional properties of RANKL/RANK in cell differentiation, proliferation and metastasis.* Future Oncol, 2013
- 125) Szwarc M.M. et al., *Aberrant Activation of the RANK Signaling Receptor Induces Murine Salivary Gland Tumors.* PLoS One, 2015
- 126) Luo X.H. et al., *Adiponectin stimulates RANKL and inhibits OPG expression in human osteoblasts through the MAPK signaling pathway.* J Bone Miner Res, 2006
- 127) Heinemann C. et al., *Development of an osteoblast/osteoclast co-culture derived by human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterials testing.* Eur Cell Mater, 2011
- 128) Haider M.T. et al. *Rapid modification of the bone microenvironment following short-term treatment with Cabozantinib in vivo.* Bone, 2015
- 129) Dai J. et al. *Cabozantinib inhibits prostate cancer growth and prevents tumor-induced bone lesions.* Clin Cancer Res 2014
- 130) Bentzien F. et al., *In vitro and in vivo activity of cabozantinib (XL184), an inhibitor of RET, MET, and VEGFR2, in a model of medullary thyroid cancer.* Thyroid, 2013.
- 131) Wang X. et al., *Cabozantinib Inhibits Abiraterone's Upregulation of IGF1R Phosphorylation and Enhances Its Anti-Prostate Cancer Activity.* Clin Cancer Res, 2015
- 132) Xie Z. et al., *MET Inhibition in Clear Cell Renal Cell Carcinoma.* J Cancer, 2016

- 133) Neradil J. et al., *DHFR-mediated effects of methotrexate in medulloblastoma and osteosarcoma cells: The same outcome of treatment with different doses in sensitive cell lines*. Oncol Rep, 2015
- 134) Blagosklonny M.V. and Pardee A.B., *The restriction point of the cell cycle*. Cell Cycle, 2002
- 135) Kajstura M. et al., *Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete "sub-G1" peaks on DNA content histograms*. Cytometry A, 2007
- 136) Messerschmitt P.J. et al., *Specific tyrosine kinase inhibitors regulate human osteosarcoma cells in vitro*. Clin Orthop Relat Res, 2008
- 137) Shor A.C. et al., *Dasatinib inhibits migration and invasion in diverse human sarcoma cell lines and induces apoptosis in bone sarcoma cells dependent on SRC kinase for survival*. Cancer Res, 2007
- 138) Organ S.L. and Tsao M.S., *An overview of the c-MET signaling pathway*. Ther Adv Med Oncol, 2011
- 139) Zhang W. and H.T. Liu, *MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells*. Cell Res, 2002
- 140) Song G. et al., *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. J Cell Mol Med, 2005
- 141) Wang R.C. et al., *Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation*. Science, 2012
- 142) Grimaldi A. et al., *Antagonistic effects of chloroquine on autophagy occurrence potentiate the anticancer effects of everolimus on renal cancer cells*. Cancer Biol Ther, 2015
- 143) Misirkic M. et al., *Inhibition of AMPK-dependent autophagy enhances in vitro antiglioma effect of simvastatin*. Pharmacol Res, 2012
- 144) Quail D.F. and Joyce J.A., *Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis*. Nat Med, 2013
- 145) Graham T.J. et al. *Preclinical evaluation of imaging biomarkers for prostate cancer bone metastasis and response to cabozantinib*. J Natl Cancer Inst, 2014
- 146) Smith D.C. et al., *Cabozantinib in chemotherapy-pretreated metastatic castration-resistant prostate cancer: results of a phase II nonrandomized expansion study*. J Clin Oncol, 2014
- 147) Basch E. et al., *Effects of cabozantinib on pain and narcotic use in patients with castration-resistant prostate cancer: results from a phase 2 nonrandomized expansion cohort*. Eur Urol 2015
- 148) Smith M.R. et al., *Final analysis of COMET-1: Cabozantinib versus prednisone in metastatic castration-resistant prostate cancer patients previously treated with docetaxel and abiraterone and/or enzalutamide*. Genitourinary Cancers Symposium, 2015
- 149) Santini D. and Tonini G., *Treatment of Advanced Renal-Cell Carcinoma*. N Engl J. Med, 2016
- 150) Motzer R.J. et al., *Treatment of Advanced Renal-Cell Carcinoma*. N Engl J Med, 2016
- 151) Iuliani M. et al., *Biological and clinical effects of abiraterone on anti-resorptive and anabolic activity in bone microenvironment*. Oncotarget, 2015
- 152) Feng X., *RANKing intracellular signaling in osteoclasts*. IUBMB Life, 2005

- 153) Wada T. et al., *RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease*. Trends Mol Med, 2006
- 154) Troen B.R., *The role of cathepsin K in normal bone resorption*. Drug News Perspect, 2004
- 155) Sundaram K. et al., *RANK ligand signaling modulates the matrix metalloproteinase-9 gene expression during osteoclast differentiation*. Exp Cell Res, 2007
- 156) Lampiasi N. et al., *The Alternative Faces of Macrophage Generate Osteoclasts*. Biomed Res Int, 2016
- 157) Stern P.H. and Alvares K., *Antitumor agent cabozantinib decreases RANKL expression in osteoblastic cells and inhibits osteoclastogenesis and PTHrP-stimulated bone resorption*. J Cell Biochem, 2014
- 158) Nagy V. and Penninger J.M., *The RANKL-RANK Story*. Gerontology, 2015.
- 159) Broadhead M.L. et al., *The molecular pathogenesis of osteosarcoma: a review*. Sarcoma, 2011