

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO IN
SCIENZE BIOCHIMICHE, NUTRIZIONALI E METABOLICHE

Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Odontoiatria

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN
FISIOPATOLOGIA, FARMACOLOGIA, CLINICA E TERAPIA DELLE
MALATTIE METABOLICHE (CICLO XXIV)

**ALTERAZIONI ISTOPATOLOGICHE INDOTTE DA
CELLULE UMANE LAM/TSC IN TOPI NUDI:
UN MODELLO DI LINFANGIOLEIOMIOMATOSI.
REVERSIONE DEL DANNO CON ANTICORPO ANTI-EGFR.**

Settore scientifico disciplinare: BIO/14

DOTTORANDO: dott.ssa Eloisa Chiaramonte

MATRICOLA: R08385

TUTOR: Chiar. ma Prof. ssa Anna Maria Di Giulio

COORDINATORE DEL DOTTORATO: Chiar. ma Prof. ssa Anna Maria Di Giulio

ANNO ACCADEMICO 2010/2011

INDICE

| | |
|---|-----------|
| INDICE | 1 |
| INTRODUZIONE | 4 |
| <i>Patogenesi</i> | 4 |
| <i>Amartina, tuberina e il complesso THC</i> | 5 |
| <i>Manifestazioni cliniche</i> | 7 |
| <i>Modello metastatico</i> | 10 |
| <i>Ruolo del sistema linfatico</i> | 12 |
| <i>Ruolo degli estrogeni</i> | 13 |
| <i>Modelli animali della LAM</i> | 14 |
| <i>Terapie e trials clinici</i> | 15 |
| BACKGROUND E SCOPO | 19 |
| RISULTATI | 21 |
| <i>Efficienza della somministrazione endonasale</i> | 21 |
| <i>Identificazione delle cellule umane a 30 settimane dalla somministrazione endonasale</i> | 21 |
| <i>Valutazione delle alterazioni polmonari</i> | 22 |
| <i>Valutazione della linfangiogenesi polmonare</i> | 24 |
| <i>Valutazione della linfangiogenesi linfonodale</i> | 24 |
| <i>Valutazione dell'angiogenesi linfonodale</i> | 25 |
| <i>Valutazione della sospensione farmacologica in vitro e in vivo</i> | 25 |
| <i>Proliferazione nei polmoni in seguito a sospensione farmacologica</i> | 26 |

| | |
|---|-----------|
| <i>Valutazione della linfangiogenesi polmonare in seguito a sospensione farmacologica</i> | 27 |
| <i>Valutazione dell'espressione del recettore degli estrogeni e del progesterone</i> | 28 |
| <i>Analisi dei noduli polmonari</i> | 29 |
| <i>Presenza delle cellule LAM/TSC nell'utero</i> | 29 |
| <i>Valutazione dell'espressione del recettore degli estrogeni e del progesterone nell'utero</i> | 30 |
| <i>Valutazione della linfangiogenesi uterina</i> | 31 |
| FIGURE E TABELLE | 32 |
| DISCUSSIONE | 55 |
| MATERIALI E METODI | 69 |
| <i>Mantenimento e conta delle cellule</i> | 69 |
| <i>Sospensione farmacologica in vitro</i> | 69 |
| <i>Marcatura delle cellule con PKH26</i> | 70 |
| <i>Somministrazione delle cellule LAM/TSC in topi nudi</i> | 70 |
| <i>Trattamento farmacologico degli animali</i> | 71 |
| <i>Inclusione in paraffina</i> | 71 |
| <i>Inclusione in OCT</i> | 72 |
| <i>Colorazione con ematossilina-eosina</i> | 72 |
| <i>Analisi stereologica</i> | 73 |
| <i>Estrazione dna umano da sezioni di paraffina e real-time PCR</i> | 74 |
| <i>Immunoistochimica</i> | 74 |

| | |
|---|-----------|
| <i>Quantificazione della proliferazione</i> | 76 |
| <i>Analisi dell'espressione genica di PCNA</i> | 76 |
| <i>Quantificazione positività al recettore degli estrogeni e del progesterone</i> | 77 |
| <i>Immunofluorescenza su cellule</i> | 77 |
| <i>Immunofluorescenza su tessuto</i> | 78 |
| <i>Analisi densità dei vasi linfatici (LVD)</i> | 79 |
| <i>Analisi semiquantitativa</i> | 79 |
| BIBLIOGRAFIA | 81 |

INTRODUZIONE

La linfangioleiomiomatosi (LAM) è una malattia rara e progressiva che colpisce quasi esclusivamente le donne in età fertile (Taveira-daSilva et al., 2006).

L'iperproliferazione di cellule muscolari lisce anomale, che prendono il nome di "cellule LAM" è alla base della malattia e causa la formazione di cisti polmonari, tumori addominali (es. angiomiolipomi [AML]) e l'infiltrazione del sistema linfatico assiale nel torace e nell'addome inclusi i linfonodi e il dotto toracico (es. adenopatie e linfangioleiomiomi) (Taveira-DaSilva et al., 2006).

La LAM può manifestarsi in forma sporadica (LAM sporadica) oppure associata a sclerosi tuberosa (TSC) (TSC associata a LAM – TSC/LAM). La LAM sporadica ha un'incidenza di 2,6 su 1 milione di donne, per un totale di 250.000-300.000 soggetti affetti in tutto il mondo, mentre nelle pazienti TSC la LAM si manifesta nel 30%-40% dei casi (Costello et al., 2000; Kinder et al., 2010).

A differenza della LAM, la sclerosi tuberosa (TSC) è una malattia genetica a trasmissione autosomica dominante a penetranza incompleta ed espressione variabile che colpisce 1/6000 nati vivi (Sweeney et al., 2004; Henske et al., 2005; Holmes et al., 2007). La TSC è multisistemica ed è caratterizzata da lesioni benigne amartomatose in diversi organi come il cervello, il rene, il polmone, la cute, la retina e il cuore (Roach et al., 2004). Tra le manifestazioni cliniche più comuni si osservano manifestazioni dermatologiche, angiomiolipomi renali, LAM polmonare e manifestazioni neurologiche come epilessia, ritardo mentale e autismo (Leung et al., 2007).

PATOGENESI

La LAM e la TSC sembrano avere dei meccanismi patogenetici simili. Infatti, la perdita della funzionalità dei geni *TSC* è alla base dell'insorgenza della TSC e sembra ormai certo che sia anche alla base dello sviluppo della LAM (Crino et al., 2006). Mutazioni in uno dei geni oncosoppressori *TSC1* o *TSC2* portano a un'iperattivazione della via di mTOR (mammalian target of Rapamycin) che regola numerose funzioni cellulari tra cui la crescita, la sopravvivenza e la motilità (Sengupta et al., 2010).

La perdita di eterozigosità (*LOH – loss of heterozygosity*) nella LAM e nella TSC sembra seguire il modello "two hit" di Knudson secondo il quale nella cellula esiste una mutazione (ereditaria o *de novo*) (*first hit*) a carico di un allele che viene seguita da una seconda mutazione (*second hit*) di origine somatica nell'allele omologo. La seconda mutazione porta a *LOH* e, quindi, all'inattivazione genica (Knudson, 1971). La TSC è

una malattia genetica in cui i pazienti presentano la prima mutazione nella linea germinale (*first hit*), ereditata da un genitore affetto, mentre la seconda mutazione (*second hit*), presente in alcuni tipi di cellule, può avvenire in seguito ad un evento somatico. La perdita di eterozigotà è stata dimostrata sia nel gene *TSC1* che nel gene *TSC2* come dimostrato nei tessuti di pazienti (Carbonara et al., 1994; Henske et al., 2005). Nella LAM sporadica le mutazioni avvengono entrambe in seguito ad eventi somatici e gli organi in cui compaiono sono solitamente polmoni, rene, utero e linfonodi (Carsillo et al., 2000; Smolarek et al., 1998). La LAM sporadica e la TSC/LAM condividono, quindi, alterazioni negli stessi geni, tuttavia, la LAM sporadica sembra essere dovuta quasi esclusivamente a mutazioni nel gene *TSC2* mentre la TSC/LAM può insorgere in seguito a mutazioni sia nel gene *TSC1* che nel gene *TSC2* (Seyama et al., 2010).

AMARTINA, TUBERINA E IL COMPLESSO THC

TSC1 o *TSC2* codificano rispettivamente per amartina e tuberina, due proteine in grado di interagire fra di loro per formare un complesso funzionale che prende il nome di complesso tuberina-amartina (THC) (Yu et al., 2001; Plank et al., 1998; van Slegtenhorst et al., 1998).

Amartina è una proteina di 130 kDa ed è espressa ubiquitariamente. A livello strutturale amartina presenta un domino *coiled-coil* tra gli aminoacidi 730-996, in prossimità della porzione C-terminale, dove sono presenti numerosi siti d'interazione con altre proteine. La regione tra i residui 145-510, vicino la porzione N-terminale, è sede dell'interazione con Rho, una piccola proteina G, che gioca un ruolo fondamentale nella regolazione e nel rimodellamento dell'actina del citoscheletro, mentre i residui 881-1084 interagiscono con la regione N-terminale delle proteine *ezrin-radixin-moesin* (ERM), anch'esse implicate nella cascata delle Rho GTPasi e nel rimodellamento dell'actina (Krymskaya, 2003; Lamb et al., 2000). Nella porzione C-terminale è stato individuato il sito di legame per i neurofilamenti L (NF-19), molto importante nei neuroni corticali (Haddad et al., 2002). Sempre nella regione N-terminale si trova il sito di legame per tuberina (aa 302-430).

Tuberina è una proteina di 250 kDa, altamente conservata nell'evoluzione, con un elevato grado di omologia nelle varie specie. Il sito di legame responsabile dell'interazione con amartina è nella regione N-terminale, tra gli aminoacidi 1-418. Nella porzione C-terminale, tuberina presenta una piccola regione di omologia con la proteina ad attività GTPasica Rap1 che si estende per 157 aa tra i residui 1517-1674 (Maheshwar et al., 1997). Questo dominio permette a tuberina di agire con attività GAP

(GTPase Activating Protein) su substrati come Rheb, Rap1 e Rab5. Rheb è il più importante target dell'attività GAP di tuberina; ampiamente espressa a livello cerebrale, è una piccola proteina G ad attività GTPasica della superfamiglia di Ras che induce la fosforilazione di mTOR (mTOR - *mammalian Target Of Rapamycin*) in posizione Ser2448 (Inoki et al., 2003). Il complesso TSC è costituito da due subunità di amartina e una di tuberina ed è localizzata prevalentemente a livello citosolico (Nellist et al., 1999). L'interazione tra le due proteine è importante per la stabilità di entrambe, infatti, mentre amartina stabilizza tuberina prevenendone la degradazione, tuberina agisce come *chaperon* citosolica nei confronti di amartina (Nellist et al., 1999; Benvenuto et al., 2000). TSC esplica la sua funzione integrando diverse vie di trasduzione del segnale mediate dallo stato energetico cellulare e da fattori di crescita come l'*insulin-like growth factor* (IGF-1) e l'*epidermal growth factor* (EGF). Questi fattori, tramite i loro recettori, attivano la via delle MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*) e della PI3K. Tuberina possiede diversi siti di fosforilazione e la sua funzione può essere regolata da numerose chinasi. Tra queste, Akt/PKB fosforila tuberina sui residui aminoacidici Ser 939, Thr993, Ser1130 e Thr1462, mentre ERK2 fosforila la Ser664. La fosforilazione ad opera di queste due chinasi causa la separazione di tuberina da amartina con la perdita della funzionalità di TSC. La funzione principale di TSC è l'inibizione di mTOR, una serina-treonina chinasi che, fisiologicamente, porta ad un aumento della crescita e delle funzioni cellulari (Hay et al., 2004). In particolare, esercita la sua funzione andando a fosforilare due molecole effettrici, S6K e 4EBP1 (4EBP1 - *4 Elongation Binding Protein*), proteine implicate nella regolazione della traduzione e della crescita cellulare. Le cellule TSC e LAM, nelle quali le mutazioni in *TSC1* o *TSC2* conducono ad un'alterata funzionalità del complesso TSC, sono caratterizzate da elevati livelli di fosforilazione della proteina S6 dovuta alla mancata inibizione di mTOR da parte di TSC (Goncharova et al., 2002).

Le cellule LAM sono immunostochimicamente indistinguibili dalle cellule muscolari lisce infatti esprimono i marcatori tipici come α -actina, desmina e vimentina (Matsumoto et al., 1999). Inoltre, presentano positività ai marcatori patologici specifici CD44v6 e HMB45 (Pacheco-Rodriguez et al., 2007; Bonetti et al., 1993). L'anticorpo HMB45 riconosce la proteina gp100 presente nella linea melanocitica ed è considerato un marcatore specifico della TSC e, quindi, della LAM (Bonetti et al., 1993). La positività all'HMB45 è stata dimostrata anche nelle cellule muscolari lisce di AML (Hoon et al., 1994). Inoltre, le cellule LAM esprimono i recettori per gli estrogeni e il progesterone e sono caratterizzate da elevati livelli della forma fosforilata di S6 (Logginidou et al., 2000; Goncharova et al., 2002).

MANIFESTAZIONI CLINICHE

La LAM tende a presentarsi tra il menarca e la menopausa, in media dalle ultime stime, intorno ai 34 anni e nei primi stadi può essere asintomatica (Johnson, 2006).

Uno dei primi sintomi, solitamente, è la comparsa di dispnea sotto sforzo che, senza una causa apparente, inizia a progredire, ma spesso l'esordio clinico è acuto per l'insorgenza improvvisa di pneumotorace, chilotorace o emorragie intraddominali che portano a cianosi, insufficienza respiratoria e ipertensione polmonare (Ryu et al., 2006; Taveira-daSilva et al., 2006). La dispnea polmonare si osserva nel 70 % dei casi ed è il risultato dell'ostruzione delle vie aeree e della formazione di cisti che sostituiscono il normale parenchima polmonare (Johnson, 2006; Taveira-daSilva et al., 2010). La distruzione cistica causa conseguenze fisiologiche devastanti dovute a un progressivo declino della funzione polmonare che porta a insufficienza respiratoria con conseguente necessità di ossigeno-terapia o, nei casi più gravi, necessità di un trapianto polmonare, mentre gli episodi di pneumotorace si presentano nel 50% delle pazienti (Taveira-daSilva et al., 2006). Alcune pazienti non vanno mai incontro ad episodi di pneumotorace che, se sono presenti, possono essere frequenti durante tutta la storia clinica e sono una delle cause di significativa morbidità della malattia (Johnson and Tattersfield, 2000).

Il chilotorace è una complicanza meno comune; all'esordio della LAM si presenta nel 10-15% dei casi, ma la sua incidenza solitamente aumenta fino al 20-40% durante il corso della malattia, spesso recidiva e risulta difficile da trattare (Seyama et al., 2010).

Altri sintomi respiratori comuni sono solitamente tosse cronica, dolore al petto, respiro affannoso, emottisi e chiloptisi (Johnson, 2006). L'emottisi e la chiloptisi sono dovuti all'ostruzione dei capillari e dei vasi linfatici polmonari da parte delle cellule LAM (Johnson, 2006).

I sintomi polmonari sono sempre manifesti nelle pazienti LAM e tendono a dominare durante tutto il decorso della malattia; tuttavia, insorgono anche numerose manifestazioni extrapolmonari (Taylor et al., 1990; Kitaichi et al., 1995; Urban et al., 1999; Johnson and Tattersfield, 2000).

Tra le manifestazioni extrapolmonari vi sono la disfunzione del sistema linfatico, come la chilosì nelle cavità corporee, le linfadenopatie toraco-addominali e i linfangioleiomiomi che suggeriscono una componente linfoproliferativa maligna nella LAM (Hirama et al., 2007; Young et al., 2008; Glasgow et al., 2009). I linfangioleiomiomi sono masse cistiche che normalmente si sviluppano nel mediastino, nel retroperitoneo e nella regione pelvica. Nelle pazienti con LAM sporadica si presentano più frequentemente (29%) rispetto a quelle affette da LAM associata a TSC (9%). I sintomi

associati ai linfangioleiomiomi sono nausea, gonfiore e distensione addominale, edema periferico e sintomi urinari (Avila et al., 2001). Questi sintomi possono peggiorare durante la giornata, infatti, è stato dimostrato che vi è una variazione giornaliera delle masse tumorali con un incremento pomeridiano dovuto a un aumentato flusso linfatico in seguito all'assunzione di cibo e all'esercizio fisico (Avila et al., 2001).

Un'altra delle manifestazioni tipiche della LAM è l'angiomiolipoma, un tumore benigno che si localizza solitamente a livello renale, composto da cellule adipose, cellule muscolari lisce e vasi sanguigni displastici. L'angiomiolipoma si presenta nel 40% delle pazienti affette da LAM sporadica e nell'80% delle pazienti TSC/LAM (Ryu et al., 2006). Nelle pazienti con LAM sporadica gli angiomiolipomi sono solitamente unilaterali, piccoli e limitati al distretto renale, mentre nelle pazienti TSC/LAM sono spesso molto grandi, bilaterali e multipli, colpiscono organi quali la milza o il fegato oltre al rene e sono soggetti ad emorragia (Avila et al., 2007). La maggior parte di questi tumori sono asintomatici e variano da pochi millimetri fino a 20 cm di diametro (Avila et al., 2000; Bissler et al., 2004). I sintomi insorgono quando le masse tumorali superano i 4 cm e consistono in dolore al fianco, ematuria e sanguinamento. Quest'ultimo può manifestarsi in maniera inaspettata e richiede trasfusioni, embolizzazione arteriosa o resezione chirurgica (Bissler et al., 2004; Sooriakumaran et al., 2009). Tra le manifestazioni presenti nella LAM vi è la presenza di leiomioma uterino che è il più frequente tumore solido pelvico che colpisce le donne (Wallach et al., 2004). Uno studio condotto su 456 pazienti affette da LAM sporadica e LAM associata a TSC ha riportato che il 38% delle pazienti affette da LAM presentano leiomiomi uterini (Taveira-daSilva et al., 2011). I leiomiomi uterini e la LAM hanno in comune numerose caratteristiche legate al fatto che colpiscono quasi esclusivamente le donne in età fertile, e occasionalmente donne in menopausa (Taveira-DaSilva et al., 2006; Wallach et al., 2004). La crescita dei leiomiomi uterini è fortemente correlata con la presenza di estrogeni e, in alcuni casi, è possibile osservare la loro insorgenza durante la gravidanza, dovuta alla dipendenza dai livelli ormonali (Buttram et al., 1981; Wallach et al., 2004). Anche nella LAM gli estrogeni sono coinvolti nella sopravvivenza e nelle metastasi delle cellule patologiche e la gravidanza è correlata di solito con un peggioramento della funzionalità polmonare delle pazienti (Yu et al., 2009; Cohen et al., 2008). Infine, sia nei leiomiomi che nelle lesioni LAM si osserva una forte positività al recettore degli estrogeni.

Nella LAM la diagnosi precoce è spesso difficoltosa perché nei primi stadi l'esame fisico delle pazienti è normale e i test di funzionalità polmonare possono risultare nella norma

(Chu et al., 1999). Anche la capacità polmonare totale è preservata e la radiografia del torace non mostra alterazioni significative (Johnson, 2006). Negli stadi successivi, col progredire della malattia, i test di funzionalità polmonare mostrano una riduzione della FEV1 (*Forced Expiratory Volume in 1 second*) e un aumento del volume residuo (RV) e della capacità polmonare totale indicanti rispettivamente intrappolamento aereo e iperinflazione polmonare (Ryu et al., 2006).

La diagnosi definitiva della LAM viene effettuata con una biopsia tissutale (solitamente del polmone ma occasionalmente dei linfonodi o dei linfangioleiomiomi) e/o in combinazione con la TAC del torace ad alta risoluzione (HRCT). La diagnosi patologica mostra la presenza di infiltrati nodulari di cellule muscolari lisce anomale (cellule LAM) positive ad α -actina e all'anticorpo HMB45 (Johnson et al., 2010). I noduli non hanno una localizzazione precisa e possono essere presenti in piccoli gruppi dispersi nel parenchima in prossimità delle lesioni cistiche lungo i vasi sanguigni, linfatici e bronchiolari del polmone (Ferrans et al., 2000; Goncharova et al., 2008). La TAC del torace ad alta risoluzione (HRCT) permette di individuare le cisti polmonari che si presentano come cisti dalle pareti sottili diffuse su tutto il polmone, tipicamente rotonde o ovoidali e con un diametro che varia da 2-5 mm fino a 25-30 mm (Seaman et al., 2011). Quando la TAC del torace ad alta risoluzione mostra un quadro classico di LAM con presenza di cisti dalle pareti sottili in associazione ad altre manifestazioni tipiche quali l'angiomiolipoma, linfangioleiomiomi o effusioni pleuriche, la biopsia solitamente non è necessaria.

La difficoltà di una diagnosi precoce deriva anche dal fatto che i sintomi polmonari come pneumotorace, asma ed enfisema sono comuni ad altre malattie. Per esempio, la visualizzazione delle cisti con HRCT non è sufficiente da sola per diagnosticare con certezza la LAM poiché altre patologie come la sindrome di Birt-Hogg-Dubè, l'istocitosi a cellule Langerhans e la sindrome di Sjögren presentano cisti polmonari (Taveira-daSilva et al., 2006; Johnson, 2006). È stato dimostrato che, in media, il tempo che trascorre tra l'insorgenza dei sintomi legati alla LAM e la diagnosi definitiva è di circa 3-6 anni (Taveira-daSilva et al., 2001).

Il decorso clinico delle pazienti LAM è altamente variabile e il tasso di mortalità è molto alto (10-20% entro i 10 anni dall'insorgenza dei sintomi) (Urban et al., 1999; Johnson et al., 2004). Normalmente, le pazienti con LAM sporadica possono avere un decorso più rapido e severo rispetto a quelle TSC/LAM e alcuni studi hanno riportato una sopravvivenza del 40-70% a 10 anni dall'insorgenza dei sintomi (Johnson et al., 2010). Studi più recenti indicano una prognosi migliore con una sopravvivenza del 91% a 10 anni e in alcuni casi superiore ai 15-20 anni (Taylor et al., 1990; Kitaichi et al., 1995;

Urban et al., 1999; Johnson et al., 2004). Il perfezionamento delle tecniche diagnostiche e dei trattamenti, incluso il trapianto polmonare, potrebbero aver contribuito alla maggiore sopravvivenza.

MODELLO METASTATICO

Sebbene le caratteristiche istologiche delle cellule LAM siano benigne, è stato proposto un modello metastatico per spiegare le manifestazioni multisistemiche di questa patologia (Henske, 2003).

Questo modello è giustificato da numerosi studi riportati in letteratura. Un'evidenza è data dal fatto che il potenziale metastatico delle cellule LAM è stato confermato da osservazioni cliniche effettuate durante il follow-up di pazienti con LAM sporadica che sono state sottoposte a trapianto polmonare (Karbowniczek et al., 2003). Sono stati documentati casi in cui, in seguito a trapianto polmonare con donatore di sesso maschile, la LAM si è manifestata nuovamente. Tramite analisi genetica è stato possibile attribuire la LAM recidiva alle cellule del ricevente (Nine et al., 1994; O'Brien et al., 1995; Bittman et al., 1997; Karbowniczek et al., 2003; Astrinidis et al., 2004). E' noto che le cellule tumorali in grado di metastatizzare possono disseminare per via ematica, per via linfatica, per contiguità o nelle cavità. A questo proposito è stato ipotizzato che le cellule LAM utilizzino la via ematogena e la via linfatica per metastatizzare, infatti, la loro presenza è stata confermata nel sangue e in altri fluidi corporei come urine, effusioni pleuriche di chilo e ascite (Crooks et al., 20004). Inoltre, a sostegno del modello metastatico sono state individuate cellule simili fenotipicamente e geneticamente in angiomiolipomi renali, linfonodi e polmoni di pazienti con LAM sporadica. Fenotipicamente le cellule LAM sono risultate positive ai recettori estrogenici e progestinici e all'anticorpo HMB45, considerato un buon marcatore delle cellule LAM (Bonetti et al., 1993). Dal punto di vista genetico le cellule LAM di pazienti affette da LAM sporadica presentano le medesime mutazioni somatiche nel gene *TSC2* e lo stesso pattern di LOH dimostrando un'origine comune (Smolarek et al., 1998; Carsillo et al., 2000; Sato et al., 2002; Henske, 2003).

I meccanismi molecolari alla base delle capacità metastatiche della LAM non sono stati ancora chiariti, tuttavia, l'individuazione di molecole di adesione (CD44v6), metalloproteasi (MMP-2, MMP-9, MMP-1) e chemochine (CCL2, CXCL1, CXCL5) nelle cellule, nei tessuti e nei fluidi di lavaggio bronco-alveolare delle pazienti LAM suggeriscono che potrebbe esserci il reclutamento di cellule patologiche nel polmone (Matsui et al., 2000; Pacheco- Rodriguez et al., 2007; Pacheco- Rodriguez et al., 2009).

CD44v6, una variante di CD44, è stata individuata sulla superficie delle cellule LAM con LOH per il gene *TSC2* e nei noduli polmonari (Pacheco et al., 2007). CD44 è una glicoproteina transmembrana responsabile del legame con l'acido ialuronico, l'osteopontina e le metalloproteasi, incluse la MMP-7 e la MMP-9 che clivano CD44 nella variante v6 (Bajorath, 2000; Ponta et al., 2003; Mielgo et al., 2006). CD44v6, normalmente, è associata a tumorigenicità ed è coinvolta nell'homing durante i processi metastatici poiché permette alle cellule di aderire alla matrice extracellulare (Marhaba and Zoller, 2004). Nel siero delle pazienti LAM sono presenti elevati livelli di CD44v6 e di osteopontina, regolatore dell'espressione genica e della funzione di CD44, i quali potrebbero giocare un ruolo nella disseminazione metastatica delle cellule LAM e nella sua patogenesi (Pacheco et al., 2007). Inoltre, CD44v6 e osteopontina potrebbero essere importanti bersagli molecolari. Anche le metalloproteasi sono implicate nei meccanismi tumorali e metastatici e sono associate alle lesioni LAM (Hayashi et al., 1997; Chang et al., 2002; Folkman, 2003). Fisiologicamente, le metalloproteasi sono componenti della matrice extracellulare e giocano un ruolo fondamentale nel rimodellamento polmonare e nella linfangiogenesi (Ji, 2006). È stato dimostrato che i noduli polmonari LAM sono fortemente positivi a MMP-2, MMP-9, MMP-1 e che i livelli sierici della MMP-9 nelle pazienti LAM sono elevati suggerendo che la distruzione polmonare potrebbe essere dovuta ad un'eccessiva produzione di metalloproteasi a carico delle cellule LAM (Hayashi et al., 1997; Matsui et al., 2000).

La metastasi delle cellule verso organi specifici può dipendere da citochine e dall'interazione tra fattori solubili prodotti dal microambiente con i recettori delle cellule metastatiche. A questo proposito, è stato ipotizzato che ligandi e recettori delle chemochine possano partecipare alla patogenesi della LAM. Numerose citochine (CCL2, CCL19, CXCL1, CXCL5, CXCL11, CXCL12 e CXCL16) sono espresse nei lavaggi bronco-alveolari delle pazienti e i recettori delle chemochine come CCR2, 7, 10 e CXCR2,1 e 4 sono quelli maggiormente individuati nelle sezioni polmonari LAM (Pacheco-Rodriguez et al., 2009). Inoltre, è stato dimostrato che la presenza di polimorfismi nel gene *CCL2* correla con il declino della FEV1 (*Forced Expiratory Volume in 1 second*) nelle pazienti. In uno studio condotto su 30 pazienti LAM è stata individuata forte positività dei noduli sia per CCL2 che per il suo ligando MCP-1 nel 70% dei casi (Pacheco-Rodriguez et al., 2009). MCP-1 è una chemochina che stimola l'angiogenesi, la fibrosi e il reclutamento dei monociti e la sua produzione, congiuntamente al suo recettore (CCL2), è regolata da *TSC2* infatti, risulta espressa a livelli elevati anche in alcune lesioni TSC.

RUOLO DEL SISTEMA LINFATICO

Tra i mediatori fondamentali della disseminazione metastatica e della crescita tumorale la linfangiogenesi è considerata un fattore determinante poiché permette la formazione di nuovi vasi linfatici per l'invasione tumorale. I principali mediatori della linfangiogenesi includono l'angiopoietina-2, la neutrofillina-2 e Prox1, ma soprattutto due membri della famiglia del VEGF: VEGF-C e VEGF-D. Nelle lesioni LAM si osserva un aumento dei vasi linfatici che potrebbe essere vista come una forma di linfangiogenesi associata a tumore. Seppur le cellule LAM siano state individuate nel sangue, la via linfatica è preferita a quella ematogena per la disseminazione metastatica (Kumasaka et al., 2004). Kumasaka et al. hanno dimostrato che le cellule LAM si dispongono in gruppi (*LAM cell clusters - LCC*) circondati da cellule endoteliali linfatiche che migrano all'interno del sistema linfatico, in particolare a livello diaframmatico e del dotto toracico (Kumasaka et al., 2005). Dall'analisi immunohistochimica è emerso che i *clusters* sono ricoperti da uno strato di cellule endoteliali linfatiche positive a VEGFR-3 e sezioni seriali hanno confermato che queste strutture si trovano libere nel lume dei vasi linfatici nel polmone, nel linfonodo e nelle chilo raccolto dalle varie cavità corporee (Kumasaka et al., 2005; Hirama et al., 2007; Mitani et al., 2009). Nei vasi linfatici e nei distretti linfonodali le cellule LAM proliferanti causano l'ostruzione al flusso di linfa e chilo provocando la dilatazione dei vasi, mentre a livello polmonare tale ostruzione blocca il passaggio dell'aria con la dilatazione degli spazi alveolari e la formazione di cisti che causano ipossemia e pneumotorace (Matsui et al., 2000). Nella linfangiogenesi associata a tumore solitamente le cellule tumorali producono fattori di crescita che favoriscono il fenomeno linfangiogenico. *In vitro* è stato dimostrato che il VEGF-C e il VEGF-D agiscono come stimoli proliferativi sulle cellule LAM e che la proliferazione indotta da VEGF-C è il risultato in parte di una stimolazione autocrina e in parte la derivazione dal *cross-talk* con le cellule endoteliali linfatiche (Issaka et al., 2009). Inoltre, nei tessuti affetti da LAM è stato dimostrato che le cellule esprimono VEGF-C e VEGF-D con intensità variabile e che il grado di espressione di VEGF-C correla significativamente con l'LHS (LAM Histologic Score), che rappresenta la severità istologica della LAM (utilizzata come predittore prognostico) (Kumasaka et al., 2004; Seyama et al., 2006). In accordo con i risultati istologici è stato individuato un aumento di fattori linfangiogenici nel siero delle pazienti LAM. In particolare, il VEGF-D sembra essere il principale mediatore della linfangiogenesi nella LAM. I livelli sierici di VEGF-D nelle pazienti che presentano una forma grave della malattia sono più alti rispetto alle pazienti con una forma moderata di LAM o ai soggetti sani (Seyama et al., 2006). Uno studio su 111 pazienti ha

riportato che soggetti con LAM sporadica hanno un livello medio di VEGF-D sierico pari a 1869 pg/ml, e se è presente in maniera specifica un coinvolgimento del linfatico il livello raggiunge 2277 pg/ml, mentre nei soggetti sani è di 657 pg/ml (Glasgow et al., 2009). Inoltre, è stata evidenziata una correlazione tra elevati livelli sierici di VEGF-D e il grado di distruzione cistica rilevato tramite TAC (tomografia assiale computerizzata) (Glasgow et al., 2009). L'aumento dei livelli di VEGF-D, oltre a essere considerato un buon biomarcatore del coinvolgimento linfatico e della gravità della malattia permette di discriminare la LAM da altre patologie polmonari che causano distruzione cistica giocando un ruolo diagnostico (Glasgow et al., 2009).

RUOLO DEGLI ESTROGENI

La LAM può essere considerata una malattia ormone-dipendente con un ruolo chiave degli estrogeni nella sua patogenesi. La LAM colpisce quasi esclusivamente donne in età fertile, quindi, donne soggette a cambiamenti ormonali ciclici; la menopausa solitamente è associata ad una condizione meno severa della malattia. A livello clinico la gravidanza e l'utilizzo di contraccettivi orali sembrano correlati ad un peggioramento della malattia con una maggior frequenza delle complicanze e un declino delle funzionalità polmonari più rapido (Wahedna et al., 1994; Oberstein et al., 2003; Cohen et al., 2008). In uno studio condotto su 328 pazienti LAM è stato osservato che la gravidanza è associata, oltre che ad un aumento delle complicanze respiratorie, anche ad un peggiore *outcome* ostetrico (Cohen et al., 2008). Infatti, quando la diagnosi viene effettuata durante la gravidanza il 67% delle pazienti riporta eventi di pneumotorace, il 47% dei casi ha parto prematura e il 7% va incontro ad aborto spontaneo. La gravidanza di conseguenza viene fortemente sconsigliata alle pazienti (Cohen et al., 2008).

A livello microscopico diversi studi hanno riportato la positività delle cellule LAM ai recettori degli estrogeni (ER) e a quelli del progesterone (PR) (Berger et al., 1990; Tawfik et al., 1996; Logginidou et al., 2000). Entrambi i recettori sono fortemente espressi sia negli angiomiolipomi che nei noduli polmonari e la loro localizzazione è per lo più nucleare con intensità molto variabile. Si può presupporre che le cellule LAM siano influenzate dalla presenza di estrogeni, così come le cellule tuberina-deficienti che sono positive al recettore degli estrogeni sono responsive agli estrogeni. Su cellule ELT3 (isolate da leiomioma uterino di ratto Eker e caratterizzate dalla perdita di tuberina) e su cellule isolate da angiomiolipoma il trattamento con estrogeni è associato a una forte e rapida attivazione di p42/44 MAPK con conseguente aumento della proliferazione cellulare e resistenza all'*anoikis* (Yu et al., 2009). Inoltre, la stimolazione estrogenica porta ad un aumento della sintesi e dell'attività della MMP-2 attraverso un meccanismo

post-trascrizionale che promuove l'invasività delle cellule LAM (Glassberg et al., 2008). L'azione degli estrogeni è stata dimostrata anche *in vivo*. Sviluppando tumori sottocutanei con l'utilizzo di cellule ELT3 e cellule di angiomiolipoma è stato osservato che la stimolazione con gli estrogeni provoca un'aumento della crescita tumorale (Clements et al., 2009; Yu et al., 2009). Inoltre, se le cellule vengono somministrate per via endovenosa la presenza di estrogeni aumenta la sopravvivenza e il numero delle cellule circolanti e promuove la formazioni di metastasi polmonari (Yu et al., 2009).

In conclusione, gli estrogeni sembrano agire sulla proliferazione e l'invasività delle cellule LAM, favoriscono la crescita tumorale, la sopravvivenza di cellule circolanti e la formazione di metastasi polmonari, tuttavia, gli interventi terapeutici volti a diminuire la quantità di estrogeni non si sono dimostrati particolarmente efficaci nel controllare e/o bloccare la malattia pur apportando un generale miglioramento delle condizioni cliniche (Taveira-daSilva et al., 2006).

MODELLI ANIMALI DELLA LAM

I modelli animali sono ideali per testare possibili interventi terapeutici e sono fondamentali per i test pre-clinici. Purtroppo, non è ancora stato creato un modello in grado di riprodurre i meccanismi patologici e fisiopatologici che portano allo sviluppo della LAM e le sue complicanze, come gli angiomiolipomi. Negli ultimi anni sono stati creati numerosi modelli TSC, grazie anche all'utilizzo dell'ingegneria genetica, che hanno permesso di acquisire informazioni riguardo al ruolo dei geni *TSC1* e *TSC2*. Inizialmente sono stati creati modelli murini con totale perdita dei geni *TSC1* o *TSC2* ma è stato osservato che mutazioni in omozigosi portano a letalità embrionale (E 10.5-11.5 per *TSC2* E E 9.5-12.5 per *TSC2*) indicando che la funzione di amartina e tuberina è essenziale per lo sviluppo (Onda et al., 1999; Kobayashi et al., 2001). Sono stati creati topi con mutazioni in eterozigosi in cui è stata riscontrata un'elevata incidenza di tumori renali ed extrarenali come cistadenomi renali, emangiomi epatici e adenomi polmonari (Onda et al., 1999; Kobayashi et al., 1999; Kobayashi et al., 2001). Sono stati sviluppati anche modelli murini con inattivazione condizionale dei geni *TSC1* e *TSC2* che ha permesso di sviluppare anomalie del SNC, tipiche della TSC, come astrocitosi, anomalie neuronali e gliali, episodi epilettici ecc (Uhlman et al., 2002; Holmes et al., 2007; Meikle et al., 2007). Tuttavia, in nessun modello si osservano angiomiolipomi o lesioni polmonari istologicamente simili a quelle LAM e TSC. Il modello maggiormente utilizzato è il ratto Eker caratterizzato dalla presenza di mutazioni nella linea germinale del gene *TSC2* che causa la perdita della regione C-terminale di tuberina (Kobayashi et al., 1997). Lo stato di eterozigosi nel ratto Eker causa tumori renali, leiomiomi uterini,

emangiosarcomi, astrocitomi a cellule giganti e adenomi (Walker et al., 2003). Dal leiomioma uterino sono state isolate cellule muscolari lisce denominate ELT3 che hanno una mutazione sul gene *TSC2* che causa la perdita della funzionalità di tuberina (Walker et al., 2003). Queste cellule sono utilizzate a loro volta per creare modelli *in vivo* e *in vitro*. Recentemente è stato sviluppato un modello murino per studiare il coinvolgimento degli estrogeni nella sopravvivenza di cellule tuberina deficienti e nella formazione di metastasi polmonari (Yu et al., 2009). In questo modello è stato dimostrato che somministrando cellule ELT3 sottocute si formano delle masse tumorali dalle quali migrano cellule al polmone dove, con la somministrazione di estrogeni si formano metastasi. Gli estrogeni in questo modello promuovono la sopravvivenza delle cellule circolanti e la loro disseminazione dal sito tumorale primario (Yu et al., 2009). Pur essendo utile per capire il ruolo degli estrogeni nella disseminazione metastatica, in questo modello oltre ai tumori non sono state individuate altre manifestazioni tipiche della LAM come la formazione di cisti o manifestazioni extrapolmonari.

TERAPIE e TRIALS CLINICI

Al giorno d'oggi non esiste una cura per la LAM, tuttavia, vengono utilizzati trattamenti di supporto che, in alcuni casi, sono in grado di migliorare il decorso clinico delle pazienti. Circa il 20% delle pazienti LAM risponde positivamente all'utilizzo di broncodilatatori, raccomandato per migliorare l'ostruzione delle vie aeree. L'ossigenoterapia, che col progredire della malattia diventa necessaria, previene l'ipossemia, migliora la performance durante gli esercizi fisici e previene l'ipertensione polmonare (Taveira-daSilva et al., 2006).

Basandosi sul fatto che la LAM colpisce esclusivamente le donne e che fattori ormonali possono avere un ruolo importante nella patogenesi la manipolazione ormonale è stata considerata come uno dei possibili approcci terapeutici. Per prevenire la distruzione cistica polmonare sono stati utilizzati l'ovarectomia, la terapia progestinica, il tamoxifene e il trattamento con agonisti dell'ormone che rilascia gonadotropine. L'ovarectomia e il trattamento con progesterone sembrano gli unici in grado di offrire un miglioramento o una stabilizzazione della malattia (Hohman et al., 2008). L'ovarectomia sembra stabilizzare donne soggette a formazione di chilo e ascite; pazienti che presentano chilotorace sembrano essere responsive al trattamento con progesterone (Kelly and Moss, 2001; Schiavina et al., 2007). Sebbene i dati siano incoraggianti purtroppo la risposta a questi trattamenti non è omogenea, in alcuni casi i dati riportati nei diversi studi sono contrastanti e non è stata dimostrata un'effettiva efficacia terapeutica.

Nei casi più gravi, quando la richiesta di ossigeno-terapia è continuo e la D_{LCO} e/o la FEV 1 (D_{LCO} – diffusione polmonare del monossido di carbonio; FEV1) sono inferiori al 40% del valore predetto è raccomandato il trapianto polmonare. Questo tipo d'intervento è l'unica possibilità di cura per le donne affette da LAM, tuttavia, alcune donne sono soggette a recidive dovute alla natura metastatica delle cellule LAM in grado di invadere nuovamente l'organo trapiantato.

La rapamicina (sirolimus), un farmaco immunosoppressore che controlla la proliferazione e la crescita cellulare, esplica la sua azione nell'inibire l'attività di mTOR. Mimando l'azione del complesso amartina-tuberina, la rapamicina è il farmaco d'elezione per le cellule con mutazioni nei geni *TSC1* e *TSC2*, quindi, è stata utilizzata in recenti trials clinici per controllare l'iperproliferazione delle cellule LAM e TSC. Questo farmaco è in grado di inibire *in vitro* la crescita anomala delle cellule con mutazioni nei geni TSC e *in vivo* causa la *down-regolazione* dell'attività di S6, riduce le dimensioni cellulari e causa apoptosi nei tumori renali dei modelli animali di TSC (Kenerson et al., 2005). I trials clinici che si sono ad oggi conclusi indicano che il trattamento con sirolimus (rapamicina) è in grado di stabilizzare le funzioni polmonari e ridurre le dimensioni degli angiomiolipomi nelle pazienti LAM e TSC, contenendo i sintomi e migliorando la qualità della vita (Davies et al., 2011; McCormack et al., 2011; Taveira-daSilva et al., 2011). Inoltre, è stato dimostrato che i livelli sierici di VEGF-D sono fortemente ridotti in risposta al trattamento farmacologico suggerendo il potenziale ruolo del sirolimus nella gestione delle pazienti LAM, specialmente in quelle che hanno un coinvolgimento linfatico (McCormack et al., 2011). Purtroppo, studi sui modelli animali e alcuni dati clinici hanno dimostrato la presenza di un meccanismo di farmacoresistenza. Negli studi sui modelli animali è stato dimostrato che il trattamento a lungo termine con rapamicina e i suoi derivati porta alla riduzione delle lesioni macroscopiche, tuttavia, non riesce ad agire in maniera significativa su quelle microscopiche che continuano a crescere quando il trattamento viene interrotto (Kenerson et al., 2005). Il blocco della via di PI3K/mTOR, quindi, sembra avere un effetto citostatico, ma non è in grado di eliminare definitivamente il tumore nel modello animale (Pollizzi et al., 2009). Anche nei pazienti TSC e LAM gli angiomiolipomi regrediscono durante il trattamento con sirolimus, ma tornano a volumi elevati quando il trattamento viene interrotto (Bissler et al., 2008). Inoltre, è stato dimostrato che il sirolimus stabilizza le funzioni polmonari portando a un miglioramento della qualità della vita delle pazienti LAM esclusivamente durante il periodo di trattamento al termine del quale, si ha un nuovo declino delle funzionalità polmonari (McCormack et al., 2011). Infine, l'applicabilità di una terapia basata sull'utilizzo della rapamicina è

risultata dubbia in alcuni casi poiché il trattamento è stato associato a gravi effetti collaterali a livello respiratorio richiedendo la sospensione della terapia farmacologica (Nehurohr et al., 2011).

Questi dati suggeriscono che, sebbene la rapamicina sia il farmaco d'elezione e abbia dato dei risultati incoraggianti, è necessario individuare un trattamento alternativo o da utilizzare in combinazione ad essa per riuscire a eradicare completamente le lesioni nella LAM. A questo proposito sono state individuate numerose molecole target come Rheb, recettori tirosin-chinasici, metalloproteasi ecc. (Kinder et al., 2010). Tra i diversi target molecolari per studiare i meccanismi alla base della LAM e della TSC vi è anche la via Raf/MEK/Erk. L'EGF (*Epidermal Growth Factor*) e il suo recettore, EGFR, normalmente attivano questa via e promuovono processi responsabili della crescita e della progressione tumorale tra cui la proliferazione, la maturazione, l'angiogenesi, l'invasione, la metastasi e l'inibizione dell'apoptosi (Rocha-Lima et al., 2007). Per questi motivi, negli ultimi anni, l'EGFR è diventato un'importante bersaglio terapeutico contro diversi tipi di tumore. Per bloccare il recettore sono state sviluppate numerose strategie agendo sulle diversi componenti del recettore stesso. Sono stati sviluppati anticorpi monoclonali in grado di legare il dominio extracellulare responsabile del legame con il ligando con conseguente inibizione di tutta la cascata attivata dall'EGF (Baselga, 2001; Rocha-Lima et al., 2007). Uno degli anticorpi anti-EGFR è il Cetuximab (Erbix), un anticorpo monoclonale chimerico che lega l'EGFR con alta affinità. L'anticorpo blocca il legame con il ligando e induce l'internalizzazione del recettore e la sua degradazione con conseguente down-regolazione dell'espressione dell'EGFR sulla superficie cellulare (Rocha-Lima et al., 2007). Studi recenti nel nostro laboratorio hanno dimostrato che cellule isolate da angiomiolipoma renale di pazienti affetti da TSC ($TSC2^{-/-}$ e $TSC2^{-/meth}$ ASM) sono dipendenti dall'EGF per proliferare (Lesma et al., 2005; Lesma et al., 2009). La dipendenza dall'EGF è strettamente correlata con l'assenza di tuberina, infatti, in seguito a trasfezione con il gene *TSC2*, le cellule $TSC2^{-/-}$ ASM non necessitano di EGF per crescere e proliferare (Lesma et al., 2008). Il trattamento farmacologico con un anticorpo anti-EGFR (clone 225) è in grado di causare progressiva morte delle cellule $TSC2^{-/-}$ e $TSC2^{-/meth}$ ASM in circa 12 giorni, mentre la rapamicina ha effetto esclusivamente se aggiunta al piastramento (Lesma et al., 2005; Lesma et al., 2009). Questi dati confermano che è necessario indagare nuovi target terapeutici per individuare un trattamento efficace per la LAM e la TSC e che la via Raf/MEK/Erk potrebbe essere un ottimo bersaglio terapeutico. Inoltre, la creazione di un modello animale in grado di ricreare le caratteristiche patologiche e fisiopatologiche della LAM è

necessario per poter studiare i meccanismi alla base di questa malattia e testare un possibile intervento terapeutico.

BACKGROUND e SCOPO

Presso l'ospedale san Paolo è in atto un programma di tipo assistenziale e di ricerca di base nel quale vengono arruolati e assistiti i pazienti affetti da TSC e i loro famigliari. Nell'ambito di questo progetto sono stati isolati diversi tipi di cellule da tessuti patologici (angiomiolipoma e polmone) che hanno permesso di evidenziare la loro dipendenza per la crescita dall'EGF e di correlarla alla perdita di tuberina. In particolare, sono state isolate e subclonate due linee cellulari entrambe derivanti da angiomiolipomi asportati a pazienti affetti da TSC. Queste cellule hanno in comune caratteristiche fenotipiche e biochimiche; tuttavia, sono geneticamente differenti. Entrambe sono cellule muscolari lisce (positive ad α -actina) positive ai marcatori di TSC e LAM, rispettivamente HMB45 e CD44v6, ed entrambe non esprimono tuberina (Lesma et al., 2005; Lesma et al., 2009). La mancata espressione di tuberina, in seguito ad una mutazione su un allele del gene *TSC2* è dovuta nel primo caso alla presenza sull'allele sano di un'altra mutazione (*TSC2*^{-/-} ASM) e nel secondo caso ad un evento epigenetico sul promotore del gene stesso (*TSC2*^{-/meth} ASM) (Lesma et al., 2005; Lesma et al., 2009). Pur essendo cellule muscolari lisce è stato dimostrato che queste cellule necessitano del fattore di crescita epidermico (EGF) per crescere e che questa dipendenza è correlata alla perdita di tuberina. Infatti, se viene indotta l'espressione di tuberina, le cellule perdono la dipendenza dall'EGF (Lesma et al., 2008; Lesma et al., 2009).

Più recentemente nel nostro laboratorio sono state isolate cellule dal versamento chiloso di una paziente affetta da LAM/TSC. Queste cellule, chiamate cellule LAM/TSC, sono muscolari lisce (positive ad α -actina) e positive a CD44v6 e HMB45. Inoltre, non esprimono tuberina. L'analisi genetica ha evidenziato una mutazione sul gene *TSC2* (R750X-2251, C>T stop codon Ex21), ma non la perdita di eterozigotità (LOH) anche utilizzando un vasto pannello di microsatelliti. Tuttavia, come per le cellule *TSC2*^{-/meth} ASM, le cellule LAM/TSC esprimono tuberina in seguito al trattamento con 5-azacitidina o triscostatina A, rimodellanti della cromatina in grado di riattivare geni silenziati per un evento epigenetico. Questo ha permesso di ipotizzare che la mancata espressione di tuberina fosse dovuta ad un evento epigenetico. Le cellule LAM/TSC condividono con le cellule *TSC2*^{-/-} e *TSC2*^{-/meth} ASM la dipendenza dall'EGF per crescere e la sensibilità all'anticorpo anti-EGFR. Infatti, bloccando il recettore dell'EGF si ha progressiva e completa morte cellulare. Le cellule LAM/TSC sono sensibili anche

all'azione della rapamicina, inibitore di mTOR, che non provoca però la morte completa delle cellule.

La caratteristica fondamentale delle cellule LAM/TSC che le contraddistingue dalle cellule precedentemente isolate nel nostro laboratorio, è la loro origine, infatti, sono circolanti (isolate da versamento linfatico), quindi, con capacità metastatiche intrinseche. Le cellule LAM/TSC *in vitro* sono in grado di passare da uno stato in cui sono adese alla piastra di coltura ad uno in cui si trovano sospese e vitali, una caratteristica tipica delle cellule che hanno capacità migratoria. Inoltre, presentano marcatori tipici dell'*epithelial-mesenchymal transition (EMT)*, processo responsabile della progressione tumorale e della formazione di metastasi. Durante l'EMT le cellule sono sottoposte ad una serie di modificazioni che porta ad un'alterazione dell'interazione tra cellula-cellula e tra cellula-matrice extracellulare che favorisce la formazione di metastasi. Marcatori tipici di questo processo sono l'E-caderina, SNAIL e vimentina. L'E-caderina, che media l'adesione cellulare, viene persa durante la migrazione, mentre il suo inibitore, SNAIL, e vimentina, marcatore mesenchimale di cellule indifferenziate, sono fortemente espressi. Le cellule LAM/TSC non esprimono E-caderina, mentre sono positive a SNAIL e vimentina confermando le loro capacità metastatiche e di invasività (manoscritto in preparazione). Proprio grazie a queste caratteristiche intrinseche le cellule LAM/TSC possono essere considerate ottime candidate per la creazione di un modello animale. La possibilità di utilizzare queste cellule può permettere, non solo di creare un buon modello della malattia, ma anche di comprendere i meccanismi metastatici alla base della LAM e della TSC.

Dal momento che fino ad oggi per creare un modello animale sono state utilizzate esclusivamente cellule ingegnerizzate o cellule ELT3 derivanti dal ratto Eker, la peculiarità di questo studio è quella di utilizzare cellule umane LAM/TSC, cellule primarie isolate da una paziente, per creare un nuovo modello sperimentale per lo studio della LAM. Il nostro scopo è stato quello di sfruttare le caratteristiche mesenchimali e di invasività proprie di queste cellule che potenzialmente dovrebbero invadere più facilmente gli organi bersaglio e sviluppare le manifestazioni patologiche tipiche della malattia, in particolare quelle a livello polmonare. Inoltre, in seguito ai risultati ottenuti *in vitro*, lo scopo dello studio è stato quello di valutare l'effetto farmacologico dell'anticorpo anti-EGFR e della rapamicina sul modello creato per confermare l'efficacia dei farmaci *in vivo* e individuare un possibile approccio terapeutico.

RISULTATI

EFFICIENZA DELLA SOMMINISTRAZIONE ENDONASALE

Le cellule LAM/TSC, marcate con PKH26, sono state somministrate in topi nudi atimici *nu/nu* di sesso femminile di 3 settimane per via endonasale ed è stata esaminata la presenza delle cellule nella trachea per valutare se fossero rimaste intrappolate nelle prime vie aeree formando aggregati. A 24 ore dalla somministrazione in trachea non sono presenti cellule LAM/TSC, riconoscibili grazie alla marcatura con PKH26 (**FIG 1A**), mentre sono già individuabili nel parenchima polmonare (**FIG 1B**).

IDENTIFICAZIONE DELLE CELLULE UMANE A 30 SETTIMANE DALLA SOMMINISTRAZIONE ENDONASALE

Nel nostro laboratorio è stato precedentemente creato un modello animale di LAM utilizzando cellule TSC2^{-/-} ASM isolate da un angiomiolipoma renale asportato da una paziente affetta da TSC. E' stato dimostrato che le cellule, somministrate per via endonasale, invadono i polmoni e i linfonodi causando lesioni polmonari simili a quelle presenti nella LAM già a 8 settimane dalla somministrazione, ma in maniera più marcata dopo 30 settimane.

L'utilizzo delle cellule LAM/TSC per la creazione di un modello murino di LAM deriva dalla diversa origine patologica di queste cellule rispetto alle cellule TSC2^{-/-} ASM e dalle loro caratteristiche intrinseche, come la mesenchimalità e l'invasività.

Per verificare se anche le cellule LAM/TSC a 30 settimane dalla somministrazione fossero in grado di sopravvivere, invadere polmoni e linfonodi e causare eventuali alterazioni istopatologiche sono stati utilizzati diversi approcci metodologici. La presenza delle cellule LAM/TSC è stata valutata utilizzando tecniche di immunohistochimica e *real-time PCR*.

L'analisi immunohistochimica è stata effettuata utilizzando l'anticorpo monoclonale HLA-A,-B,-C che riconosce un epitopo dell'antigene del complesso maggiore di istocompatibilità umana di classe I. Il complesso maggiore d'istocompatibilità di classe I, che nell'uomo prende il nome di HLA (*Human Leukocyte Antigen*), è ampiamente distribuito su quasi tutte le cellule umane nucleate e deriva da tre loci situati sul cromosoma 6 e chiamati HLA-A, HLA-B e HLA-C. Cellule positive all'anticorpo HLA-A,-B,-C sono state identificate nella parete degli alveoli polmonari (**Fig. 2A**) e nei linfonodi (**Fig. 2B**) confermando, *in situ*, la presenza delle cellule somministrate. Le

cellule marcate con HLA-A,-B,-C formano dei piccoli clusters e, in alcuni casi, la loro posizione nel parenchima polmonare è all'estremità dell'apertura dell'alveolo dove sembra ci sia un punto di rottura che potrebbe essere dovuto alla presenza delle cellule stesse (**Fig. 2A**).

Per individuare le cellule umane tramite *real-time PCR*, sono stati utilizzati una sonda e dei primers specifici umani che riconoscono una sequenza LINE-1 (*Long Interspersed Nuclear Element*) e una sequenza XIST (*X Inactive-Specific Transcript*). Purtroppo questa tecnica non si è rivelata valida nel nostro studio poiché non è stato possibile individuare DNA genomico umano nei campioni testati per l'elevata presenza di sequenze di DNA murino sovrapponibili a quello umano che inficiano la specificità del risultato. Un debole segnale è stato rilevato nei campioni derivanti dai linfonodi, ma insufficiente per poter essere considerato accettabile.

VALUTAZIONE DELLE ALTERAZIONI POLMONARI

Le cisti polmonari sono il segno distintivo della LAM, infatti, sono presenti in tutte le pazienti. La loro distribuzione è uniforme in tutto il polmone e la loro grandezza solitamente è molto variabile, da pochi mm a qualche cm (Avila et al., 2000).

Per valutare la presenza di eventuali alterazioni la struttura polmonare degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC è stata esaminata in seguito a colorazione con ematossilina-eosina.

A 30 settimane dalla somministrazione delle cellule si osserva una maggiore apertura degli spazi alveolari in seguito a rottura delle pareti alveolari che causa distruzione cistica (**Fig. 3A**). Le cisti sono di grandezza variabile e sono individuabili su tutto il parenchima polmonare. Oltre alla formazione di cisti gli animali trattati con cellule LAM/TSC presentano un elevato numero di vasi sanguigni che solitamente si accompagna ad una maggior compattazione del tessuto. Quantitativamente, il numero di vasi sanguigni è significativamente maggiore negli animali che hanno ricevuto le cellule (14,6 vasi/campo) rispetto agli animali controllo (8,3 vasi/campo ($p < 0,01$)). (**Fig. 3B**).

Per stimare il danno morfologico causato dalle cisti polmonari, le sezioni sono state analizzate con metodo stereologico valutando la percentuale di spazio aereo alveolare. Poiché gli animali con un maggior numero di vasi presentano anche una compattazione del tessuto e un minor numero di cisti, l'analisi stereologica dei polmoni è stata condotta su due livelli a seconda del tipo di lesione osservata. Negli animali che in seguito alla somministrazione delle cellule LAM/TSC presentano un maggior numero di vasi, la percentuale di spazio aereo alveolare è equiparabile a quello degli animali

controllo (65,1% vs 65,3%), mentre gli animali con un numero di vasi simili al controllo hanno uno spazio aereo alveolare significativamente maggiore rispetto ai controlli (72,8%; $p < 0,001$) (**Fig. 3C**).

I trattamenti con l'anticorpo anti-EGFR o la rapamicina sono efficaci nel ridurre il danno polmonare causato dalla somministrazione endonasale delle cellule LAM/TSC (**Fig. 4A**). Morfologicamente i polmoni degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR presentano cisti significativamente ridotte rispetto agli animali non trattati e il quadro istologico è simile a quello degli animali controllo. Il trattamento con rapamicina è in grado di contenere la formazione di cisti, ma causa un notevole ispessimento del parenchima polmonare (**Fig. 4A**). L'analisi stereologica indica che entrambi i trattamenti sono in grado di ridurre in maniera significativa il grado di distruzione cistica, causato dalle cellule LAM/TSC, rispetto agli animali non trattati; l'anticorpo anti-EGFR riduce la percentuale di spazio aereo alveolare al 61,1% (vs 72,8%; $p < 0,001$) e la rapamicina al 51,6% (vs 72,8%; $p < 0,001$) (**Fig. 4B**).

PROLIFERAZIONE IN VIVO

Le cellule LAM/TSC sono cellule con un'elevata capacità proliferativa poiché la mancata formazione del complesso amartina-tuberina causa l'iperattivazione di mTOR (Goncharova et al., 2002).

Le cellule LAM/TSC isolate nel nostro laboratorio, *in vitro* hanno un alto tasso di crescita, quindi, è stata valutata l'attività proliferativa anche *in vivo* tramite l'utilizzo dell'anticorpo Ki67 che riconosce le cellule durante il ciclo cellulare nel passaggio dallo stadio G1 allo stadio M (**Fig. 5A**). Nei polmoni degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC la positività all'anticorpo Ki67 è pari al 7,8% delle cellule totali (**Fig. 5B**). La presenza delle cellule LAM/TSC è associata a un notevole aumento dell'attività proliferativa rispetto agli animali controllo in cui le cellule proliferanti sono il 3,5% ($p < 0,001$). In seguito a trattamento farmacologico con l'anticorpo anti-EGFR o la rapamicina la percentuale di cellule proliferanti torna a livelli simili al controllo, rispettivamente 4% e 3,6%, indicando un contenimento della proliferazione cellulare da parte dei due farmaci (**Fig. 5B**). Per confermare questi dati è stata effettuata anche un'analisi quantitativa tramite *Real-Time PCR* utilizzando come marcatore di proliferazione cellulare PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) (**Fig. 5C**). Negli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC i livelli di espressione di mRNA di PCNA sono significativamente più elevati rispetto agli animali controllo e agli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR o la rapamicina, confermando l'effetto di inibizione della proliferazione dei farmaci (**Fig. 5C**).

VALUTAZIONE DELLA LINFANGIOGENESI POLMONARE

Oltre alle manifestazioni polmonari la LAM è caratterizzata dal coinvolgimento del sistema linfatico. Le lesioni LAM sono ricche di vasi linfatici ed è stato dimostrato che esiste una significativa correlazione tra la severità della malattia, il danno polmonare e il grado di linfangiogenesi (Matsui et al, 2001; Kumasaka et al., 2004). Per valutare se le cellule LAM/TSC, oltre alla distruzione cistica, causassero alterazioni linfatiche, è stata studiata la presenza di vasi linfatici nel polmone degli animali a cui sono state somministrate le cellule tramite l'anticorpo LYVE-1, marcatore specifico delle cellule endoteliali linfatiche (Banerji s. et al., 1999). Negli animali che hanno ricevuto le cellule LAM/TSC si osserva un elevato numero di piccoli vasi linfatici rispetto agli animali controllo. Questi vasi presentano un diametro inferiore rispetto a quelli individuati nei polmoni degli animali degli altri gruppi sperimentali (**Fig. 6A**) e, quantitativamente, la densità dei vasi linfatici (LVD – *Lymphatic vessel density*) è aumentata significativamente negli animali che hanno ricevuto le cellule LAM/TSC (8,4 eventi/campo) rispetto agli animali controllo (3,3 eventi/campo) ($p < 0,001$) (**Fig. 6B**). I trattamenti farmacologici sono in grado di riportare i valori di LVD a livelli simili a quelli del gruppo controllo. Si contano 3,6 eventi/campo in seguito a trattamento con anticorpo anti-EGFR e 3,9 eventi/campo con rapamicina. Questi dati suggeriscono che entrambi i trattamenti farmacologici sono in grado di ridurre significativamente gli eventi linfangiogenici a livello polmonare causati dalla somministrazione delle cellule LAM/TSC ($p < 0,01$) (**Fig. 6B**).

VALUTAZIONE DELLA LINFANGIOGENESI LINFONODALE

Nelle pazienti affette da LAM i fenomeni di linfangiogenesi sono evidenti non solo nelle lesioni polmonari, ma anche in quelle extrapolmonari (Kumasaka et al., 2004). Oltre ai polmoni, uno degli organi maggiormente colpiti è il linfonodo che può presentarsi ingrossato e spugnoso (Seyama et al., 2010). In base a questo, è stata studiata la linfangiogenesi nei linfonodi dei topi nudi tramite l'espressione di PROX-1. PROX-1 è un fattore di crescita considerato il principale regolatore del fenotipo linfatico (Wigle e Oliver, 1999). A livello embrionale regola la formazione di vasi linfatici e la sua espressione è necessaria per mantenere mature e differenziate le cellule endoteliali linfatiche. Infatti, l'alterazione nei livelli di espressione di PROX-1 sono sufficienti a de-differenziare le cellule endoteliali linfatiche in cellule endoteliali vascolari (Petrova et al., 2002; Johnson et al., 2008). Nei linfonodi degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC è rilevabile un elevato numero di cellule positive a PROX-1 rispetto

al controllo (**Fig. 7A**). Tramite l'analisi della densità ottica relativa, è stato dimostrato che questo aumento è significativo ($p < 0,05$ vs animali controllo) (**Fig. 7B**). L'anticorpo anti-EGFR e la rapamicina agiscono efficacemente nel limitare la positività a PROX-1 nei linfonodi riducendo significativamente la sua espressione rispetto agli animali a cui sono state somministrate le cellule e anche rispetto al controllo, dimostrando l'efficacia dei due agenti farmacologici nel ridurre gli eventi linfangiogenici.

VALUTAZIONE DELL'ANGIOGENESI LINFONODALE

E' stato riportato che le lesioni LAM presentano un aumento di vasi linfatici e, anche se più limitatamente, di vasi sanguigni (Kumasaka et al., 2004). Tuttavia, considerando che nei polmoni dei topi nudi a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC vi è un aumento dei vasi sanguigni abbiamo indagato, anche a livello linfonodale i fenomeni angiogenici. I vasi sanguigni sono stati identificati tramite l'anticorpo CD31, marker delle cellule endoteliali vascolari, valutando le venule ad endotelio alto (HEV – *High Endothelial Venules*), strutture caratteristiche del sistema vascolare linfonodale caratterizzate da cellule endoteliali cuboidali e fortemente positive a CD31. Nei linfonodi degli animali di tutti i gruppi sperimentali sono presenti livelli paragonabili di venule ad endotelio alto (**Fig. 8A**). Il grado di angiogenesi è stato, quindi, analizzato tramite l'analisi semiquantitativa dell'immunoreattività a CD31 grazie alla quale è stato possibile confermare che non vi è un'alterazione significativa dell'angiogenesi tra tutti i gruppi sperimentali (**Fig. 8B**). Negli animali a cui sono state somministrate le cellule è osservabile un leggero aumento della marcatura a CD31 che non è però significativo rispetto agli animali controllo o a quelli trattati farmacologicamente (**Fig. 8B**). Questi dati sono in accordo con le evidenze cliniche che indicano la LAM come una patologia prevalentemente linfangiogenica piuttosto che angiogenica e il sistema linfatico come la via d'elezione per la migrazione e la metastatizzazione delle cellule LAM (Seyama et al., 2010).

VALUTAZIONE DELLA SOSPENSIONE FARMACOLOGICA IN VITRO E IN VIVO

I trials clinici basati sull'utilizzo della rapamicina hanno messo in evidenza che la terapia con rapamicina è in grado di migliorare le funzionalità polmonari e di ridurre le dimensioni degli angiomiolipomi esclusivamente durante il periodo di trattamento farmacologico (Bissler et al., 2008; McCormack et al., 2011).

Nel nostro modello murino l'efficacia e la durata dell'effetto farmacologico della rapamicina e dell'anticorpo anti-EGFR anche dopo la sospensione del trattamento è stata valutata sia *in vitro* che *in vivo*.

Le cellule LAM/TSC sono state incubate per sei giorni con l'anticorpo anti-EGFR (5 µg/ml) o con la rapamicina (1 ng/ml). Dopo sei giorni di trattamento, entrambi i farmaci sono in grado di inibire la crescita delle cellule LAM/TSC di circa il 50% (**Fig. 9**). Al sesto giorno i trattamenti sono stati sospesi e la proliferazione è stata monitorata per altri sei giorni (**Fig. 9**). A due giorni dalla sospensione dei trattamenti l'effetto dei due farmaci permane mantenendo il tasso di crescita cellulare basso e significativamente diminuito rispetto al controllo. A distanza di sei giorni le cellule incubate con l'anticorpo anti-EGFR vanno incontro a morte cellulare, mentre la rapamicina ha un'azione citostatica contenendo il tasso di proliferazione, ma senza causare morte cellulare (**Fig. 9**).

Gli animali sono stati trattati con l'anticorpo anti-EGFR o la rapamicina per 4 settimane (26^{esima} - 30^{esima} settimana) e il sacrificio degli animali è avvenuto 8 settimane dopo la fine dei trattamenti.

Negli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR o con la rapamicina e sacrificati subito dopo la fine dei trattamenti (30^{esima} settimana) si osservava una diminuzione delle cisti polmonari e una riduzione della percentuale di spazio aereo alveolare. Il quadro morfologico dei polmoni degli animali sacrificati 8 settimane dopo la fine di trattamenti farmacologici è paragonabile a quello degli animali sacrificati alla 30^{esima} settimana (**Fig. 10A**). L'azione di entrambi i farmaci sulla riduzione delle dimensioni delle cisti polmonari permane e l'ispessimento tissutale causato dal trattamento con rapamicina, riscontrato subito dopo la fine dei trattamenti, regredisce (**Fig. 10A**).

L'analisi stereologica, quantificando questi dati osservazionali, ha indicato che la percentuale di spazio aereo alveolare negli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC è significativamente aumentata rispetto agli animali controllo (68% vs 77%, $p < 0,001$), mentre negli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR o la rapamicina è significativamente diminuita (68% e 53,8%) rispetto agli animali non trattati (77%) (**Fig. 10B**).

PROLIFERAZIONE NEI POLMONI IN SEGUITO A SOSPENSIONE FARMACOLOGICA

Come dimostrato precedentemente (**Fig. 5**), in seguito alla somministrazione endonasale delle cellule LAM/TSC in topi nudi si riscontra un aumento delle cellule

proliferanti nel parenchima polmonare che viene contenuto dai trattamenti farmacologici. Per verificare la durata dell'efficacia farmacologica la proliferazione a livello polmonare è stata valutata negli animali sacrificati 8 settimane dopo la fine dei trattamenti (**Fig. 11A**). 38 settimane dopo la somministrazione delle cellule LAM/TSC la proliferazione cellulare è pari all'8,7% delle cellule totali con un aumento significativo rispetto al controllo (3,4%; $p < 0,001$) (**Fig. 11B**). I trattamenti con l'anticorpo anti-EGFR o la rapamicina mantengono la loro efficacia anche 8 settimane dopo la fine dei trattamenti, con il 5,5% e il 4,9% rispettivamente di cellule proliferanti, valori significativamente inferiori rispetto agli animali non trattati ($p < 0,001$ vs 8,7%) (**Fig. 11B**). La percentuale di cellule proliferanti presenti nel parenchima polmonare 38 settimane dopo la somministrazione delle cellule LAM/TSC è aumentata rispetto a quella nel parenchima degli animali sacrificati a 30 settimane, ma la differenza non è significativa (8,7% vs 7,8%) (**Tab. 1**). 8 settimane dopo la sospensione del trattamento con l'anticorpo anti-EGFR o la rapamicina la percentuale delle cellule proliferanti è aumentata rispetto alle cellule proliferanti presenti subito dopo la fine dei trattamenti (rispettivamente 5,5% vs 4% $p < 0,05$ e 4,9% vs 3,6% $p < 0,01$) (**Tab. 1**).

I risultati ottenuti mediante la conta delle cellule proliferanti sono stati confermati quantitativamente tramite *real-time PCR* (**Fig. 11C**). 38 settimane dalla somministrazione delle cellule LAM/TSC i livelli di espressione di mRNA PCNA sono aumentati rispetto ai valori di mRNA PCNA del controllo ($p < 0,001$) (**Fig. 11C**). I trattamenti farmacologici con l'anticorpo anti-EGFR o la rapamicina sono efficaci nel ridurre i livelli di espressione di mRNA PCNA aumentati in seguito alla somministrazione di cellule LAM/TSC ($p < 0,001$) (**Fig. 11C**).

VALUTAZIONE DELLA LINFANGIOGENESI POLMONARE IN SEGUITO A SOSPENSIONE FARMACOLOGICA

Tra i meccanismi fisiopatologici che portano allo sviluppo e alla progressione della LAM la linfangiogenesi occupa un ruolo fondamentale (Seyama et al, 2006; Glasgow et al., 2009). Il coinvolgimento linfatico è correlato ad una maggiore severità della malattia ed il fattore linfangiogenico VEGF-D, che è considerato un fattore prognostico nelle pazienti LAM, è fortemente aumentato (Matsui et al., 2001; Seyama et al, 2006; Glasgow et al., 2009). In seguito a trattamento con sirolimus i livelli di VEGF-D nelle pazienti LAM diminuiscono drasticamente, mantenendosi agli stessi livelli anche dopo la sospensione del trattamento farmacologico (McCormack et al., 2011). Questo ha suggerito un'azione persistente del sirolimus.

Così come la sospensione farmacologica non sembra determinare una drastica regressione dell'efficacia dell'anticorpo anti-EGFR e della rapamicina sul danno polmonare dal punto di vista morfologico nel modello animale proposto in questo studio, allo stesso modo risulta importante verificare l'effetto della sospensione dei trattamenti sulla linfangiogenesi.

I polmoni di tutti i gruppi sperimentali sono stati marcati con l'anticorpo LYVE-1 ed è stata effettuata l'analisi quantitativa tramite valutazione della densità dei vasi linfatici (LVD – *Lymphatic Vessels Density*). 8 settimane dopo la sospensione dei trattamenti, negli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR, persiste l'effetto farmacologico con una significativa riduzione della densità dei vasi linfatici rispetto agli animali che hanno ricevuto le cellule e che non sono stati trattati farmacologicamente (**Fig. 12A**). Quantitativamente gli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC presentano 11,2 eventi/campo, mentre quelli trattati con l'anticorpo anti-EGFR hanno, in media, 7,6 eventi/campo ($p < 0,01$ vs animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC) (**Fig. 12B**). Dopo 8 settimane dalla sospensione della rapamicina la densità dei vasi linfatici a livello polmonare è simile a quella degli animali che non hanno ricevuto nessun trattamento. Negli animali trattati con rapamicina si contano 10,85 eventi/campo ($p < 0,8$ vs animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC) (**Fig. 12B**). 8 settimane dopo la sospensione dei trattamenti la densità dei vasi linfatici è aumentata significativamente rispetto al controllo a differenza degli animali sacrificati subito dopo la fine dei trattamenti farmacologici nei quali la densità dei vasi linfatici era paragonabile al controllo (**Fig. 6A**).

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE DEGLI ESTROGENI E DEL PROGESTERONE

La LAM è una malattia che colpisce quasi esclusivamente le donne in età fertile e, sebbene il ruolo degli estrogeni nella patogenesi della malattia sia tuttora sconosciuto, la loro azione sembra influenzare la sopravvivenza e la disseminazione delle cellule LAM (Yu et al, 2009).

E' stato dimostrato che le cellule LAM esprimono il recettore degli estrogeni e quello del progesterone (Berger et al., 1990), quindi, è stata valutata la presenza di tali recettori nelle cellule utilizzate in questo studio. Le cellule LAM/TSC esprimono il recettore degli estrogeni e del progesterone con una positività rispettivamente del 78% e del 100% (**Fig. 13A, B, C e D**).

L'espressione di tali recettori nelle cellule LAM/TSC è mantenuta anche in seguito alla somministrazione endonasale in topi nudi. Per valutare la positività ai recettori

estrogenici e progestinici delle cellule LAM/TSC nel tessuto polmonare, è stata effettuata una doppia marcatura con l'anticorpo HLA-A, -B, -C e gli anticorpi che riconoscono in maniera specifica i recettori stessi (**Fig. 13E e F**). Tutte le cellule positive all'anticorpo HLA-A, -B, -C esprimono anche il recettore del progesterone (**Fig. 13F**), e la maggior parte, ma non tutte, sono positive al recettore degli estrogeni (**Fig. 13E**), suggerendo che la somministrazione endonasale non causa un cambiamento nell'espressione dei recettori estrogenici e progestinici delle cellule LAM/TSC.

ANALISI DEI NODULI POLMONARI

Tra le caratteristiche istopatologiche della LAM nel tessuto polmonare è possibile osservare la formazione di noduli polmonari di cellule LAM di varie dimensioni (Matsui et al., 2000).

Dopo la somministrazione delle cellule LAM/TSC in topi nudi il 47% presenta la formazione di noduli polmonari di varia grandezza spesso localizzati in prossimità di vasi linfatici o vascolari. Negli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR si osservano noduli nel 25% degli animali e in quelli trattati con rapamicina nel 33,3% (**Tab. 2**). L'organizzazione cellulare di questi noduli è casuale e non sembra avere una struttura organizzata (**Fig. 14**).

E' stato dimostrato che le cellule e le lesioni LAM (a livello polmonare e renale, come gli angiomiolipomi) sono positive ai recettori degli estrogeni e del progesterone (Logginidou et al., 2000). E' stata, quindi, analizzata l'espressione dei recettori estrogenici e progestinici nei noduli dei topi nudi.

I noduli sono fortemente positivi sia al recettore degli estrogeni che a quello del progesterone (**Fig. 15**). Come per i noduli osservati nelle pazienti affette da LAM, anche in quelli nei topi nudi l'espressione è nucleare e l'intensità è variabile. All'interno dei noduli sono presenti cellule positive all'anticorpo umano COX IV che dimostrano la presenza di cellule umane, le cellule LAM/TSC (**Fig. 15**). Inoltre, sono presenti cellule che esprimono la forma fosforilata di S6, che nelle cellule LAM patologiche è fortemente espressa (**Fig. 15**).

PRESENZA DELLE CELLULE LAM/TSC NELL'UTERO

Tra le manifestazioni cliniche della LAM si osservano leiomiomi uterini con un'incidenza del 38% (Taveira-daSilva et al., 2011). Il leiomioma uterino è considerato il tumore solido più comune nelle donne in età fertile e origina dalle cellule muscolari lisce dell'utero (Wallach et al., 2004). Come per la LAM anche i leiomiomi uterini sono considerati tumori estrogeno-dipendenti (Wallach et al., 2004). Per determinare nel

nostro modello animale l'invasività delle cellule LAM/TSC, nell'utero è stata valutata la presenza di cellule umane tramite positività all'anticorpo umano COX IV e la presenza di eventuali alterazioni strutturali. Nell'utero degli animali a cui sono state somministrate le cellule sono presenti poche cellule umane positive a COX IV (**Fig. 16**). Le cellule non formano *clusters*, ma si distribuiscono come cellule singole esclusivamente nella fascia del miometrio e non sembrano causare alterazioni morfologiche. Infatti, in seguito a colorazione con ematossilina-eosina, non sono state individuate alterazioni istopatologiche di nessun tipo (**Fig. 17**). Il tessuto risulta normale, non alterato rispetto agli animali controllo e, sia nel miometrio che nell'endometrio, non sono presenti formazioni che possano essere ricondotte alla presenza di leiomiomi (**Fig. 17**).

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL RECETTORE DEGLI ESTROGENI E DEL PROGESTERONE NELL'UTERO

Gli estrogeni sono considerati il maggior promotore della crescita dei leiomiomi uterini (Wallach et al.; 2004). La loro crescita, infatti, è massima durante la fase riproduttiva della donna e occasionalmente durante la gravidanza, quando l'azione degli ormoni è massima (Wallach et al., 2004). Inoltre, i leiomiomi sono caratterizzati da un'elevata positività al recettore degli estrogeni (Wallach et al., 2004).

Pur non causando alterazioni morfologiche la somministrazione di cellule LAM/TSC provoca un aumento del recettore degli estrogeni nell'utero rispetto agli animali controllo (**Fig. 18A**). Negli animali controllo la media di cellule positive al recettore degli estrogeni è di 398 cellule positive/campo mentre negli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC si contano 541 cellule positive/campo ($p < 0,05$) (**Fig. 18B**). In seguito ai trattamenti farmacologici si osserva una significativa diminuzione di cellule positive al recettore degli estrogeni, in particolare, 346 cellule positive/campo con l'anticorpo anti-EGFR ($p < 0,001$ vs animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC) e 339 cellule positive/campo dopo trattamento con rapamicina ($p < 0,001$ vs animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC) (**Fig. 18B**). La positività è per lo più a livello nucleare con una distribuzione omogenea nel miometrio, nell'endometrio e nelle ghiandole. L'intensità di marcatura è variabile e negli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC è più intensa rispetto a quella degli animali degli altri gruppi sperimentali ad indicare probabilmente una maggiore espressione del recettore a livello cellulare (**Fig. 18A**).

Il recettore del progesterone presenta lo stesso pattern di marcatura (**Fig. 19A**). Lo *staining* è nucleare, è presente in tutte le zone del tessuto uterino e l'intensità è maggiore

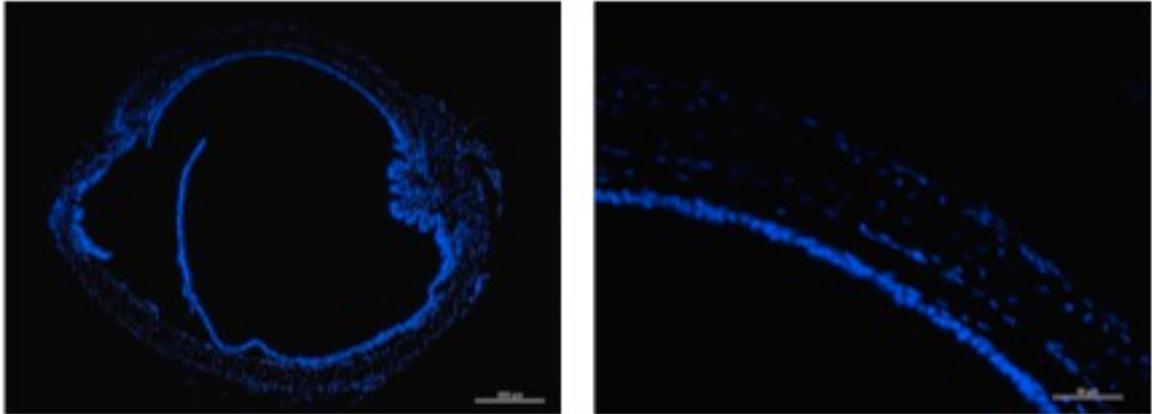
negli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC (**Fig. 19A**). Dall'analisi semiquantitativa emerge che gli animali trattati con le cellule LAM/TSC hanno un numero di cellule positive al recettore del progesterone significativamente maggiore rispetto agli animali controllo (331 *vs* 256 cellule positive/campo, $p < 0,01$) (**Fig. 19B**). I trattamenti farmacologici causano una riduzione significativa delle cellule positive al recettore del progesterone con 329 cellule positive/campo per gli animali trattati con anticorpo anti-EGFR ($p < 0,01$ *vs* animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC) e 321 cellule positive/campo per gli animali trattati con rapamicina ($p < 0,01$ *vs* animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC) (**Fig. 19B**).

VALUTAZIONE DELLA LINFANGIOGENESI UTERINA

Poichè le cellule LAM/TSC mostrano capacità migratorie nel tessuto uterino è stata valutata la linfangiogenesi in questo tessuto. I vasi sono stati marcati con l'anticorpo LYVE-1 e, anche in questo caso, è stata effettuata l'analisi quantitativa calcolando la densità dei vasi linfatici (LVD). In tutti i gruppi sperimentali non si osservano alterazioni del sistema linfatico. I vasi si trovano esclusivamente nella fascia più esterna dell'utero, alla fine del miometrio e nel perimetrio, e non sono presenti strutture che invadono l'utero in maniera anomala (**Fig. 20A**). Anche dal punto di vista quantitativo non è stata riscontrata un'alterazione della densità dei vasi linfatici. Negli animali controllo si contano 7,04 eventi/campo e negli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC 7,15 eventi/campo (**Fig. 20B**). Il trattamento farmacologico non si accompagna a una riduzione della densità dei vasi linfatici nell'utero, ma i valori restano equiparabili a quelli degli animali controllo e degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC (**Fig. 20A**). In media, sono presenti 7,1 eventi/campo negli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR e 6,8 eventi/campo negli animali trattati con la rapamicina. La lieve diminuzione della densità dei vasi causata dalla rapamicina non è significativa (**Fig. 20B**).

FIGURE E TABELLE

A



B

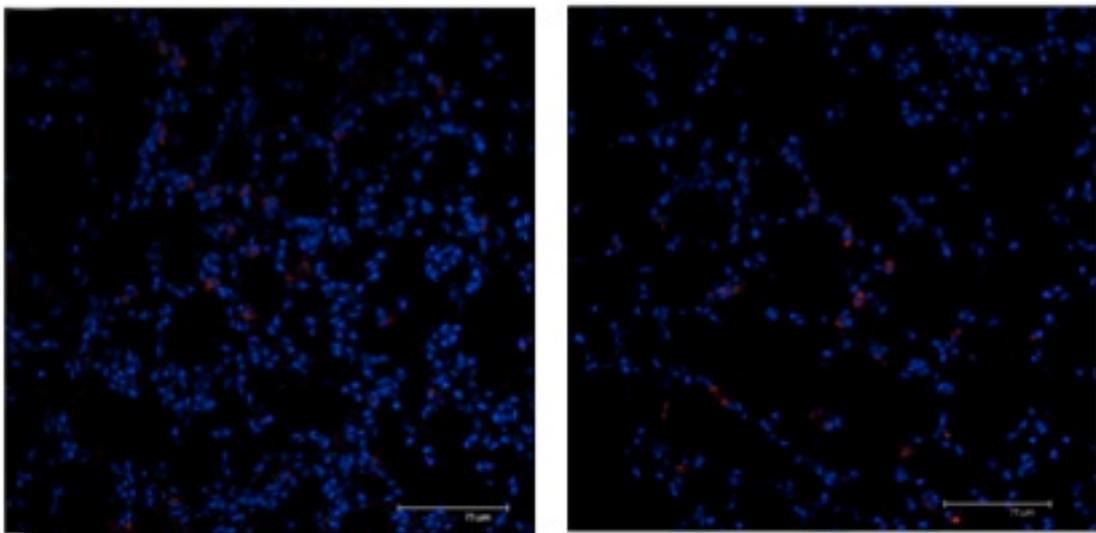
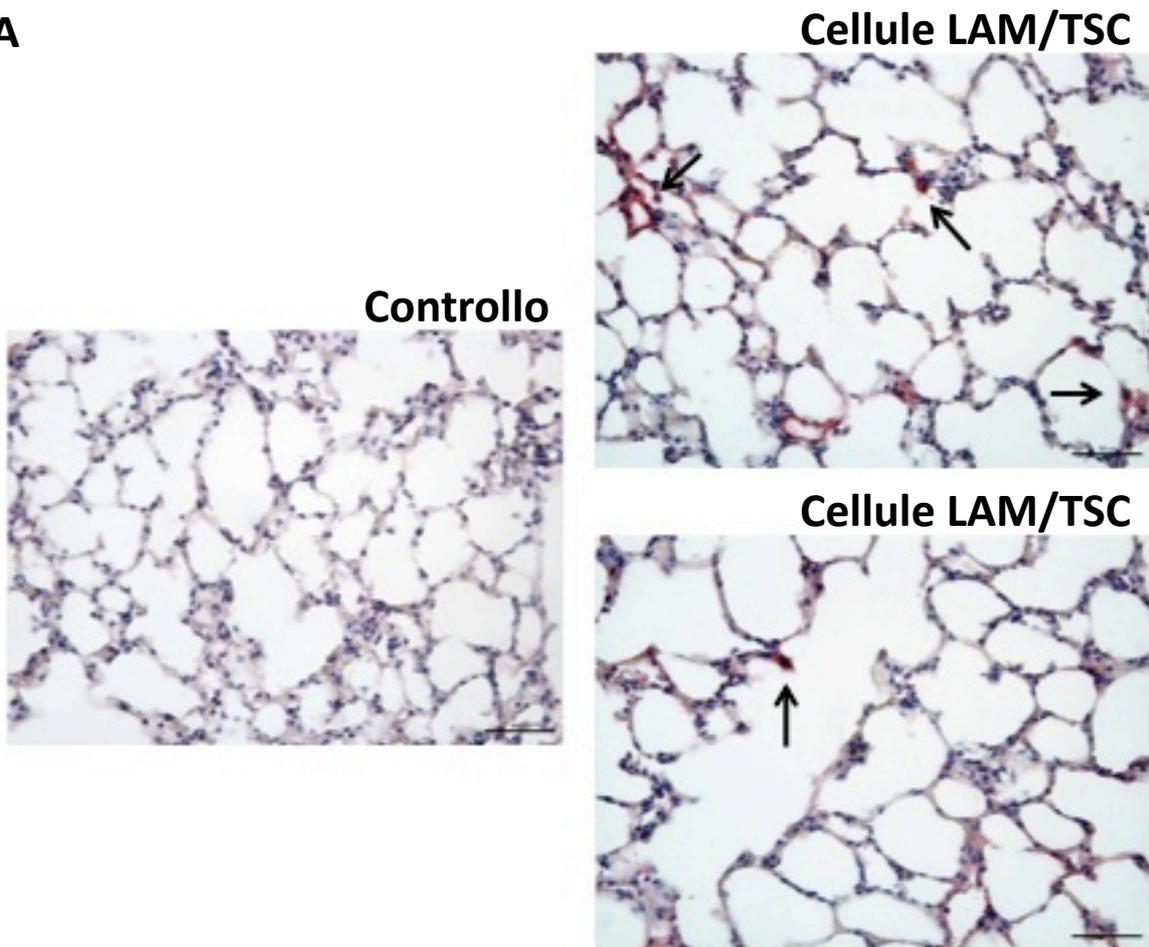


Figura 1: Identificazione delle cellule LAM/TSC tramite marcatura con PKH26 nella trachea (A) e nel polmone (B) a 24 ore dalla somministrazione endonasale.

A



B

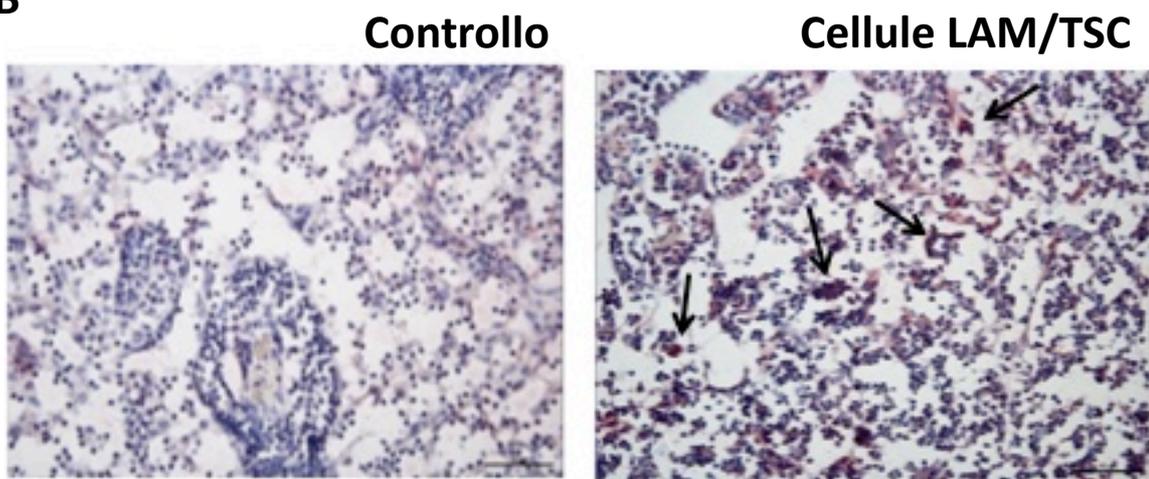


Figura 2: Identificazione delle cellule LAM/TSC tramite marcatura con HLA-A,-B,-C nei polmoni (A) e nei linfonodi (B).

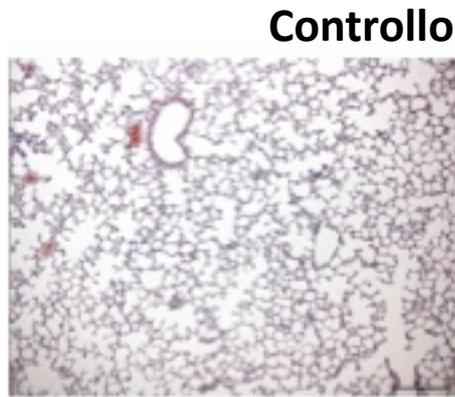
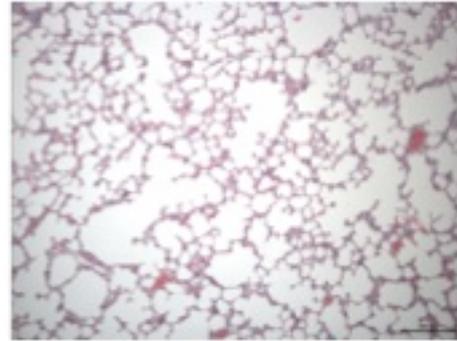
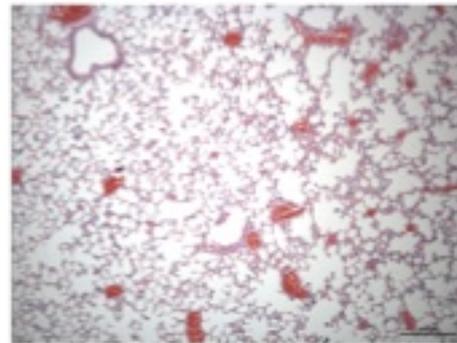
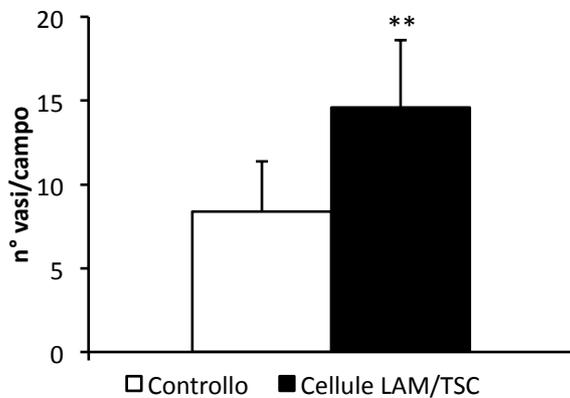
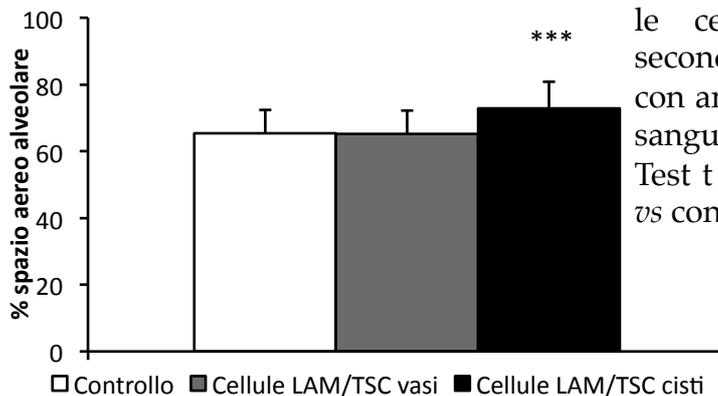
A**Cellule LAM/TSC****Cellule LAM/TSC****B****C**

Figura 3: Colorazione con ematossilina-eosina dei polmoni degli animali controllo e degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC. In alto a destra un polmone caratterizzato da cisti polmonari e, in basso a destra, un polmone ricco in vasi linfatici (A). Valutazione del numero dei vasi/campo nei polmoni dei topi controllo e in quelli a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC (B). Valutazione della % di spazio aereo alveolare nei polmoni dei topi controllo e negli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC suddivisi a seconda del tipo di lesione osservata: con ampie cisti e con aumento dei vasi sanguigni (C).

Test t di Student: *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ vs controllo.

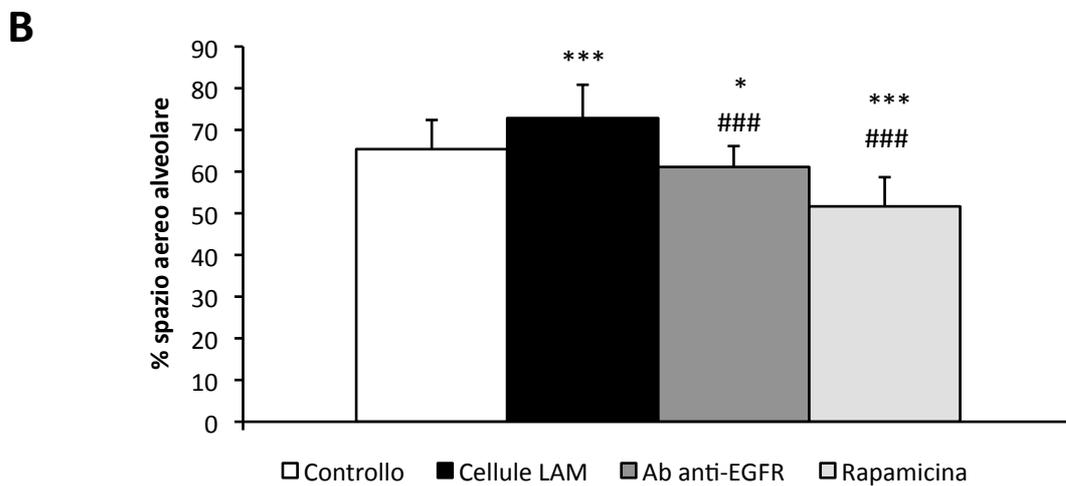
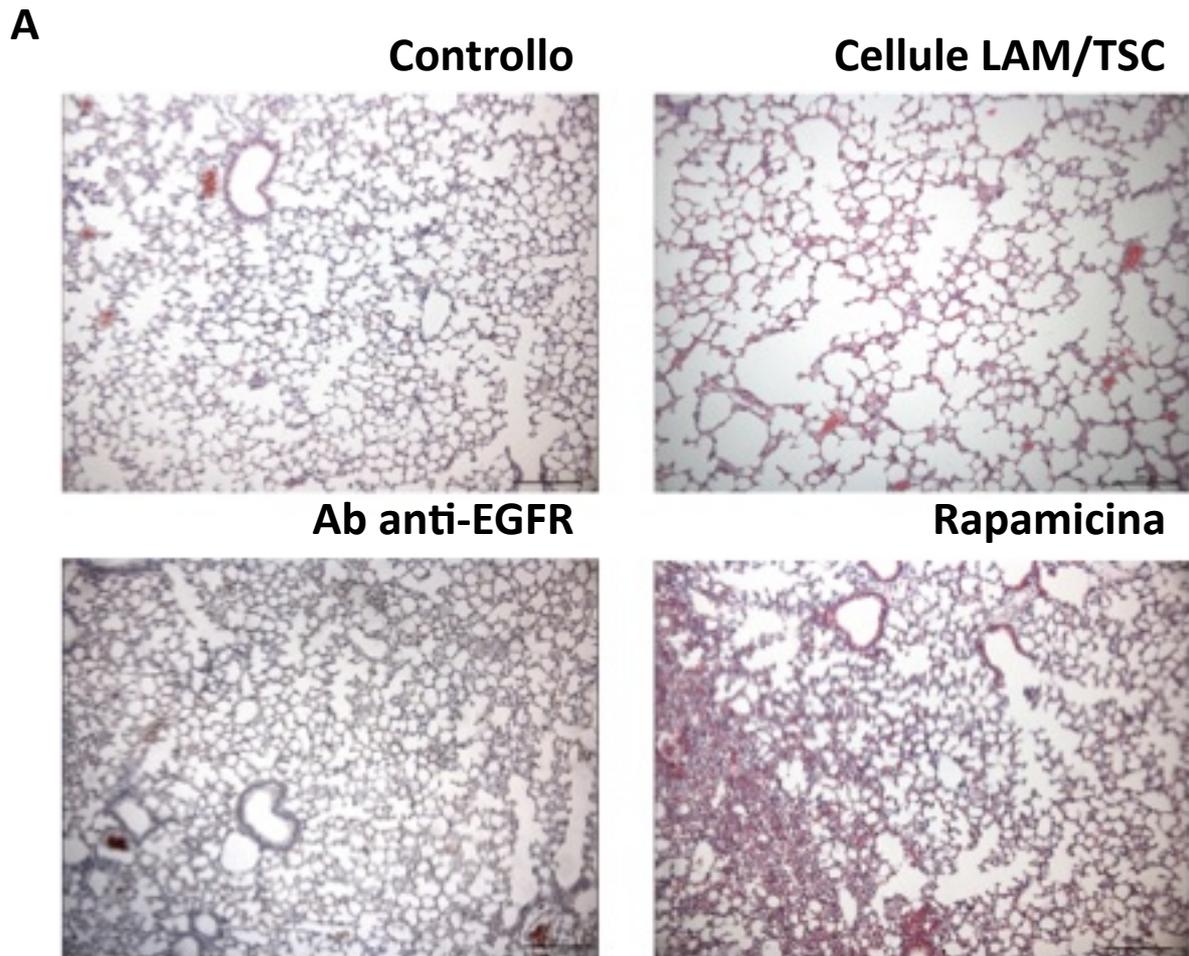


Figura 4: Colorazione con ematossilina-eosina dei polmoni degli animali controllo, degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC, degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR e degli animali trattati con la rapamicina (A). Il grafico esprime la % di spazio aereo alveolare nei polmoni dei topi nudi controllo, degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC, degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR, degli animali trattati con rapamicina (B). Test t di Student: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ vs controllo; ### $p < 0,001$ vs animali somministrati con cellule LAM/TSC.

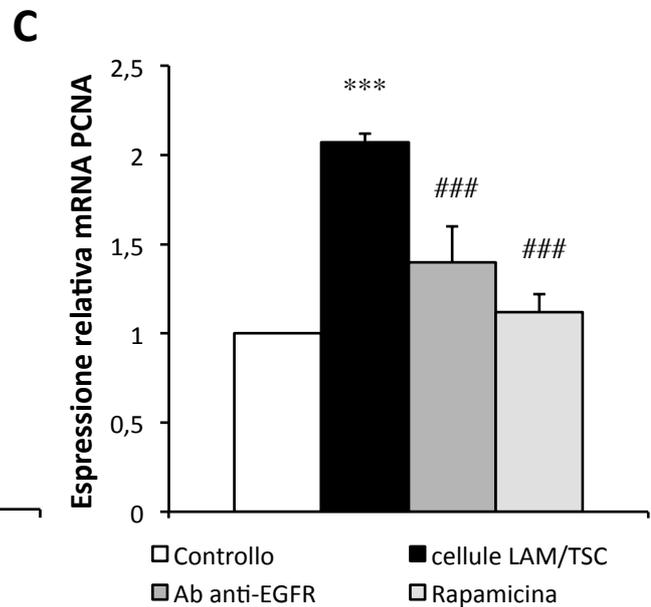
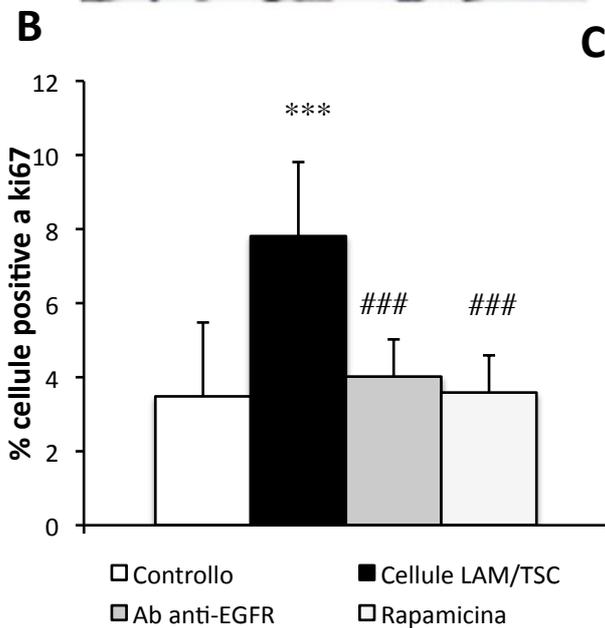
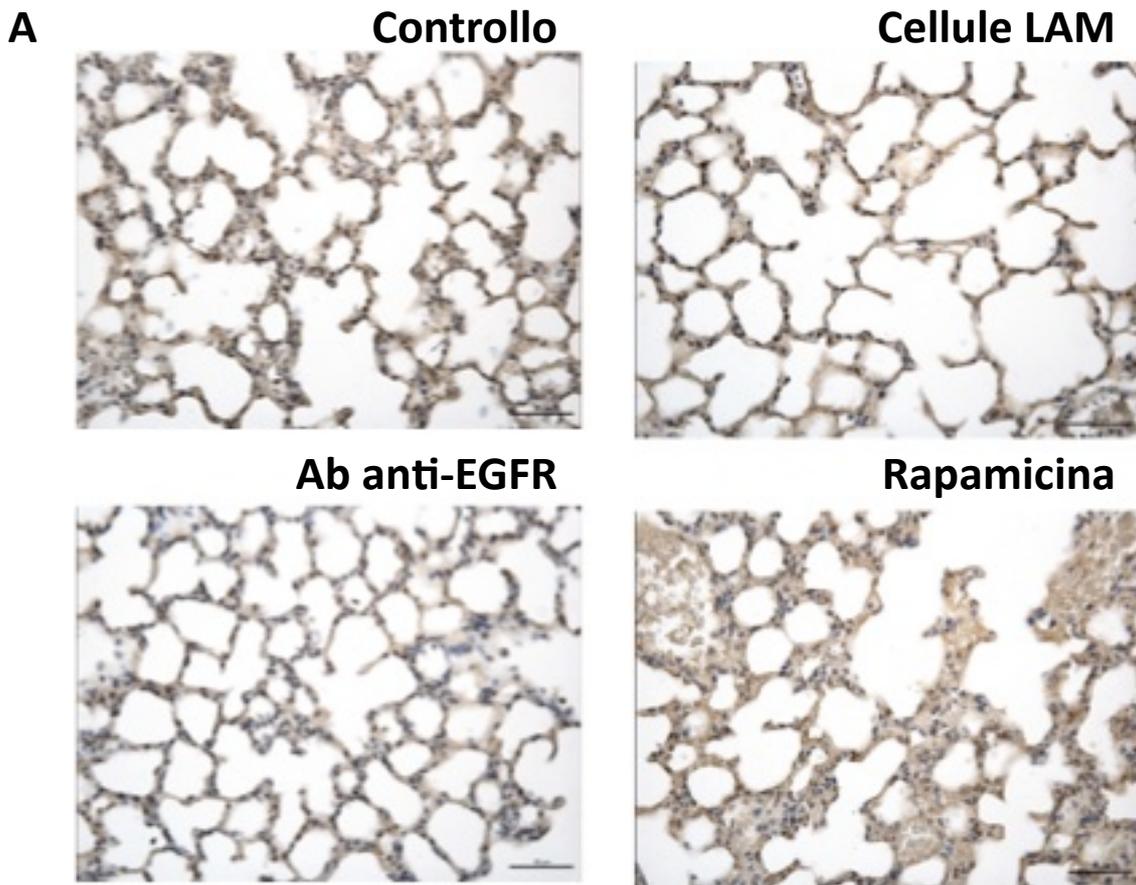


Figura 5: Valutazione della proliferazione cellulare tramite marcatura con ki67 nei polmoni degli animali controllo, degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC, degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR e degli animali trattati con la rapamicina (A). Il grafico esprime la % di cellule positive a ki67 rispetto alle cellule totali (B). Espressione dell'mRNA di PCNA (C). Test t di Student: ***p<0,001 vs controllo; ###p<0,001 vs animali somministrati con cellule LAM/TSC.

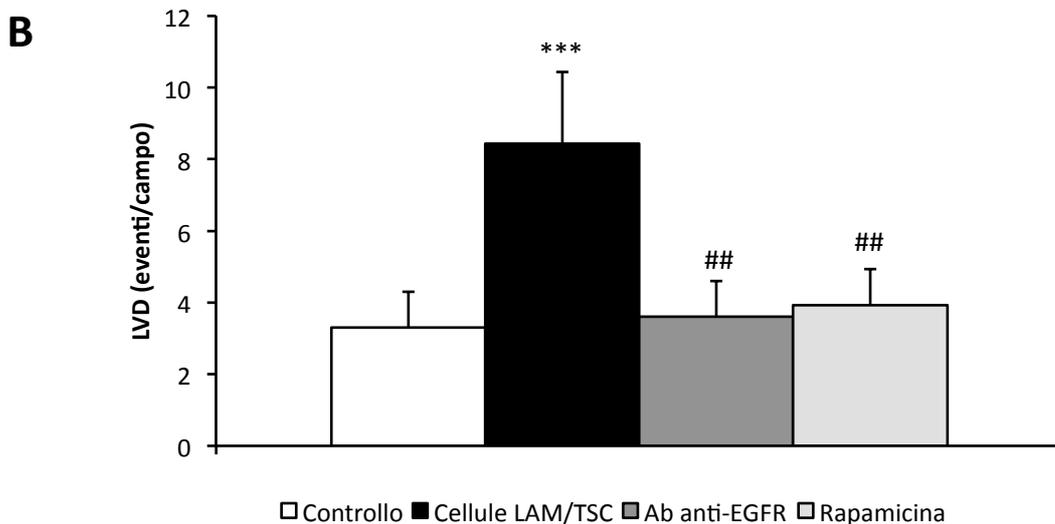
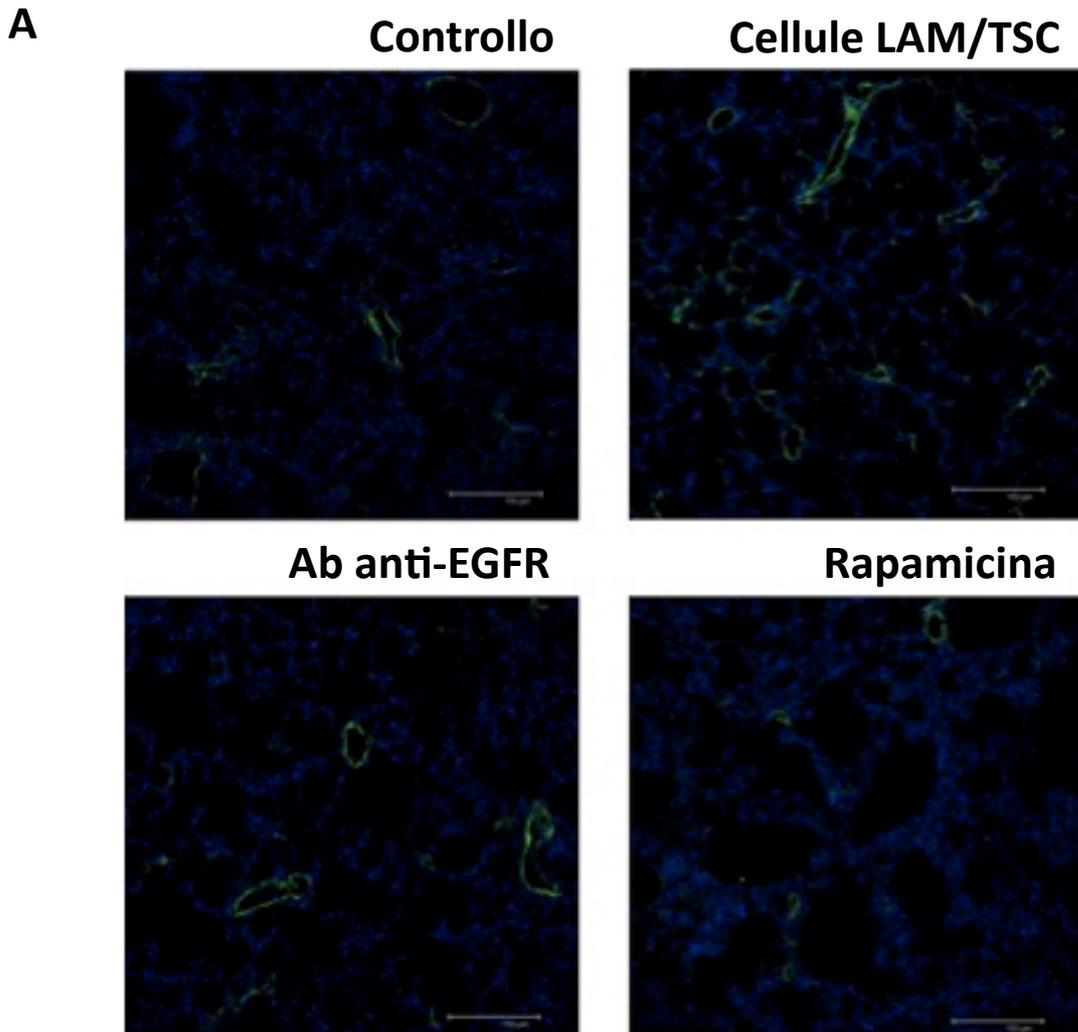


Figura 6: Valutazione della linfangiogenesi tramite marcatura con LYVE-1 nei polmoni degli animali controllo, degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC, degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR e degli animali trattati con la rapamicina (A). Quantificazione della densità dei vasi linfatici (LVD) (B). Test t di Student: *** $p < 0,001$ vs controllo; ## $p < 0,01$ vs animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC.

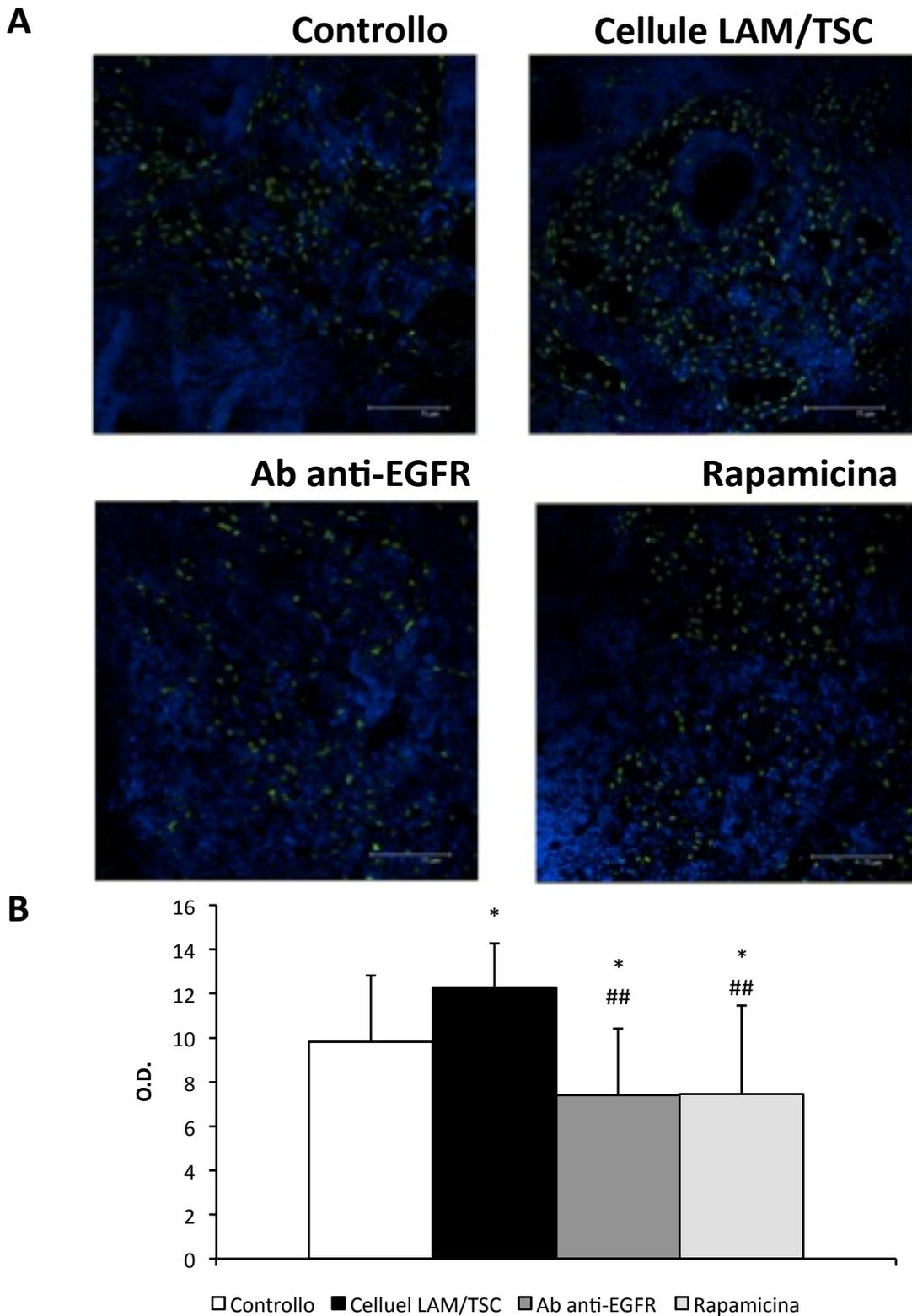


Figura 7: Valutazione della linfangiogenesi tramite marcatura con PROX-1 nei linfonodi degli animali controllo, degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC, degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR e degli animali trattati con la rapamicina (A). Quantificazione della densità ottica relativa di PROX-1 (B). Test t di Student: * $p < 0,05$ vs controllo; ## $p < 0,01$ vs animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC.

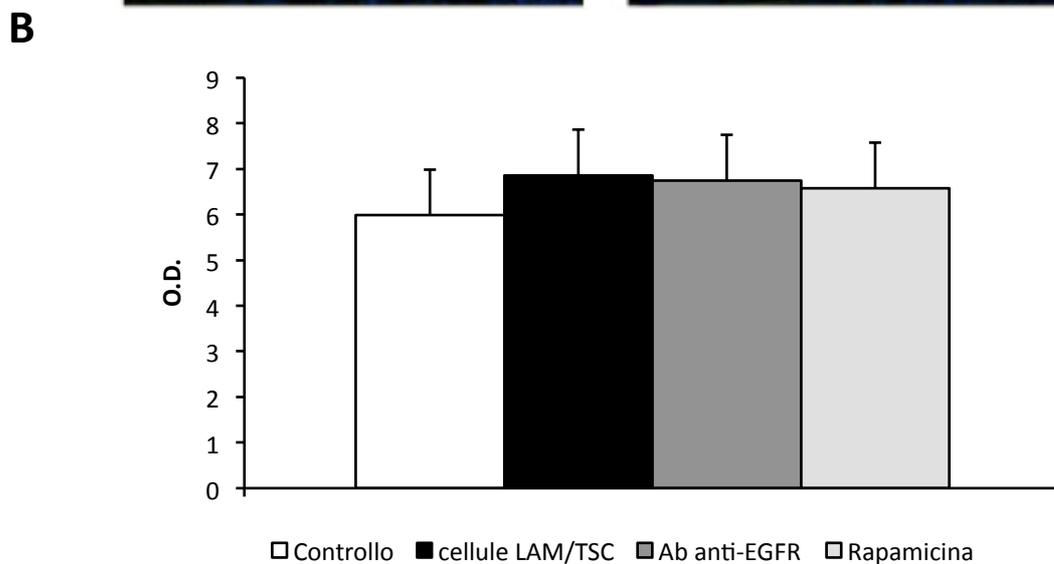
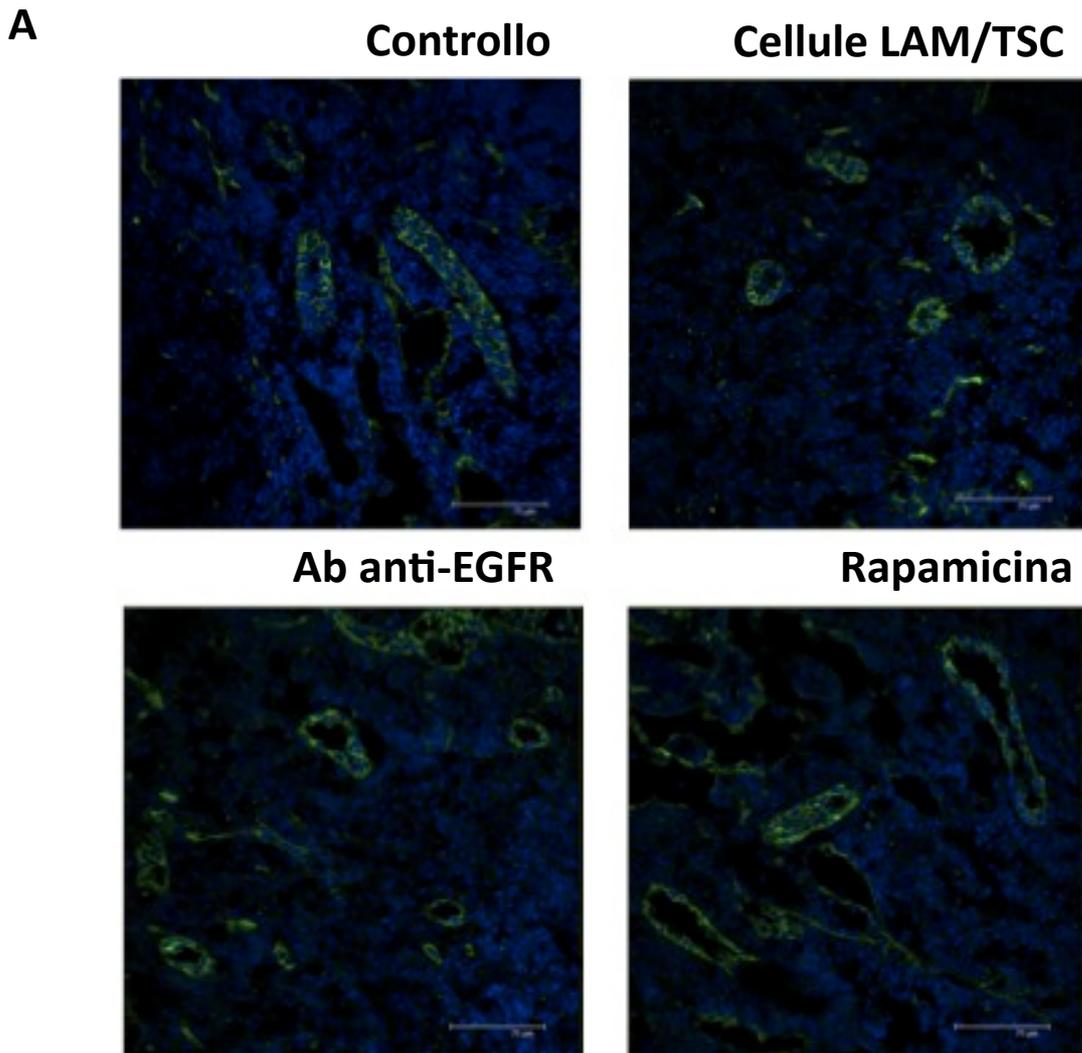


Figura 8: Valutazione dell'angiogenesi tramite marcatura con CD31 nei linfonodi degli animali controllo, degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC, degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR e degli animali trattati con la rapamicina (A). Quantificazione della densità ottica relativa (O.D.) di CD31 (B).

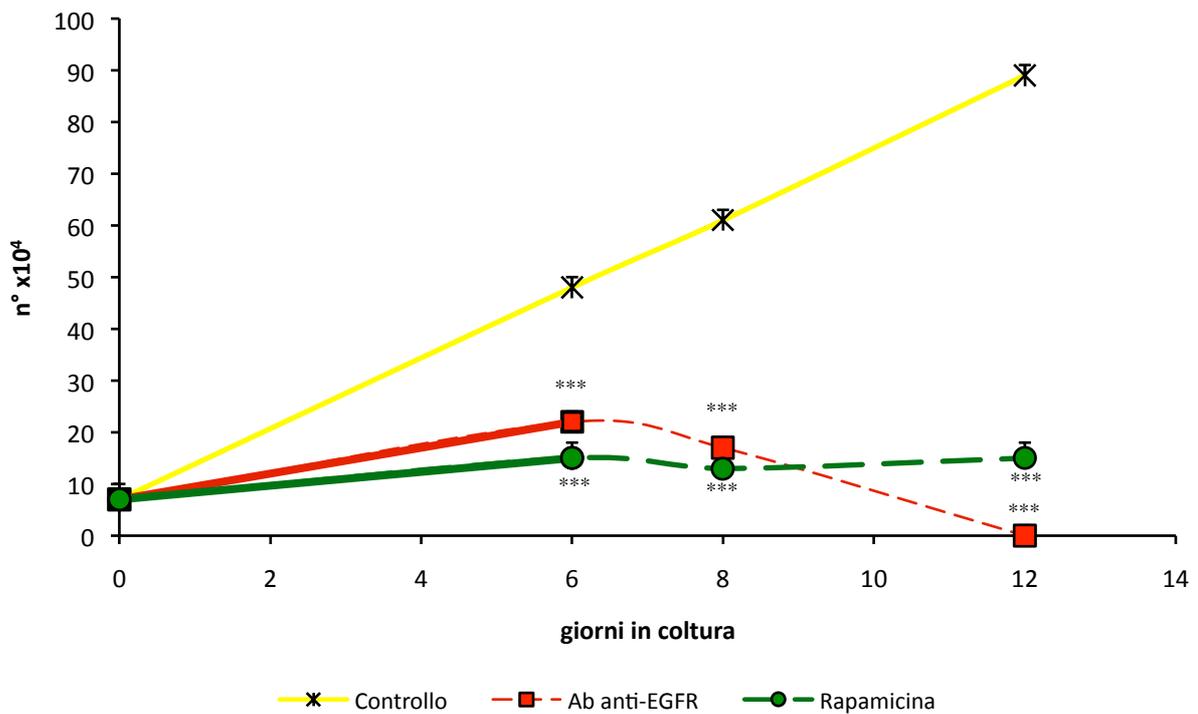


Figura 9: Valutazione della crescita delle cellule LAM/TSC. La crescita è stata valutata per 12 giorni: per sei giorni le cellule sono state incubate con l'anticorpo monoclonale anti-EGFR ($5 \mu\text{g/ml}$) e la rapamicina (1 ng/ml) (linee intere) e i seguenti 6 giorni i trattamenti sono stati sospesi (linee tratteggiate). Le cellule sono state contate il 6, 8 e 12^{esimo} giorno. Test t di Student: *** $p < 0,001$ vs controllo

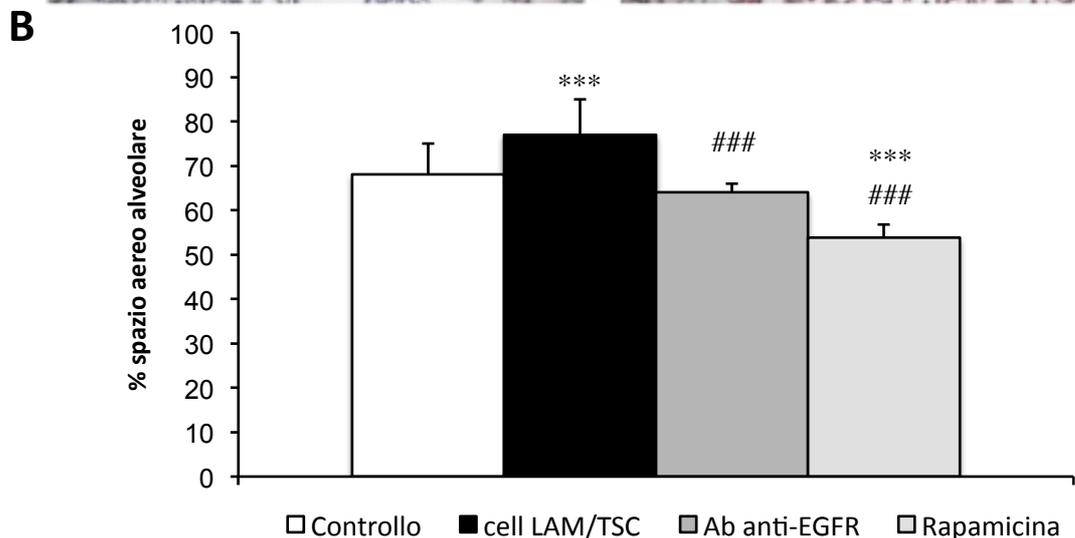
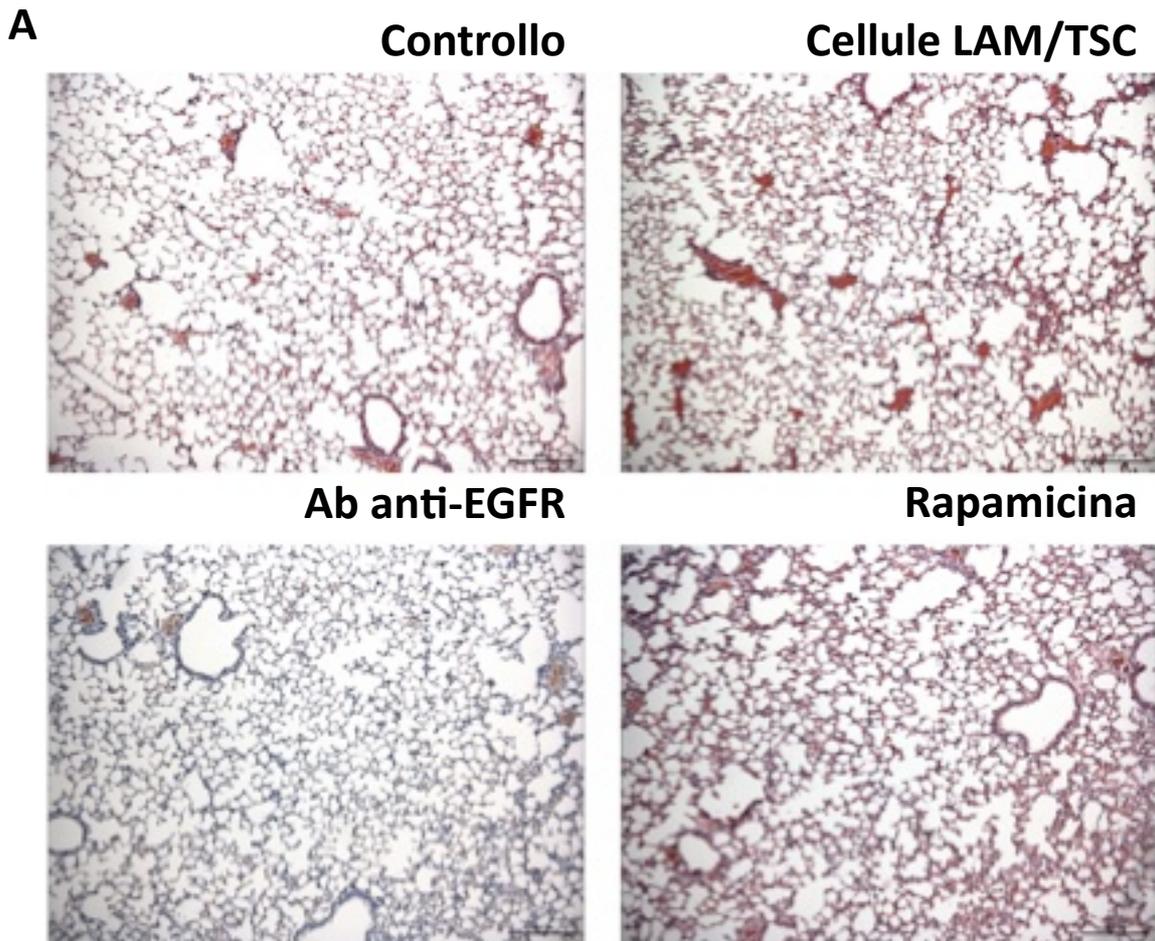


Figura 10: Colorazione con ematossilina-eosina dei polmoni degli animali controllo, degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC, degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR e degli animali trattati con la rapamicina per 4 settimane, dalla 26^{esima} alla 30^{esima} settimana dopo la somministrazione delle cellule. Gli animali sono stati sacrificati 8 settimane dopo la sospensione dei trattamenti, 38^{esima} settimana dopo la somministrazione delle cellule. (A). Il grafico esprime la % di spazio aereo alveolare in tutti i gruppi sperimentali (B). Test t di Student: *** $p < 0,001$ vs controllo; ### $p < 0,001$ vs animali trattati con cellule LAM/TSC.

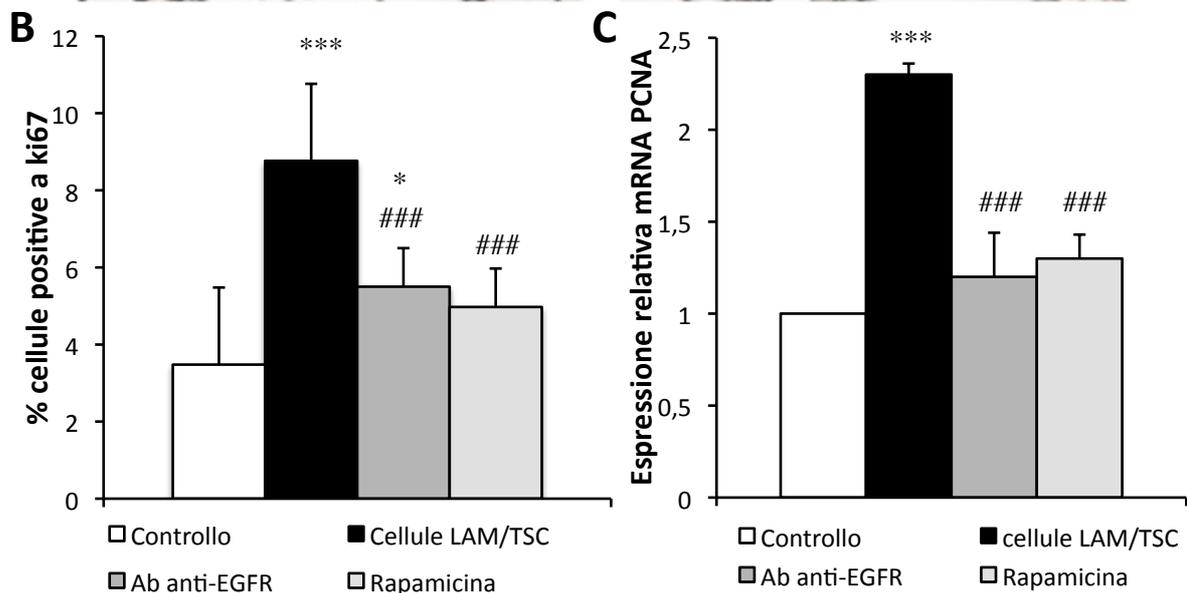
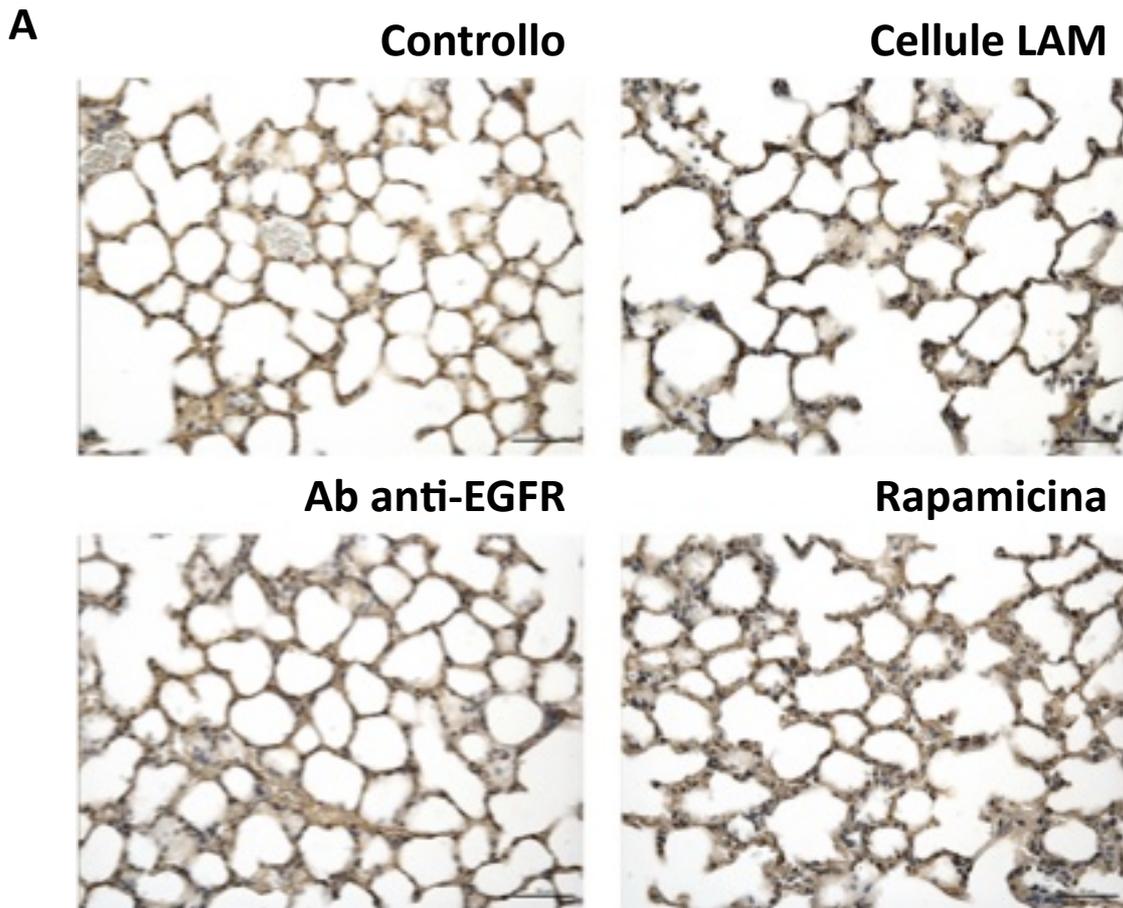


Figura 11: Valutazione della proliferazione cellulare tramite marcatura con ki67 nei polmoni degli animali controllo, degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC, degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR e degli animali trattati con la rapamicina per 4 settimane (26^{esima}-30^{esima} settimana) e sacrificati 8 settimane dopo la sospensione dei trattamenti (38^{esima} settimana) (A). Il grafico esprime la % di cellule positive a ki67 rispetto alle cellule totali (B). Espressione dell'mRNA di PCNA (C). Test t di Student: *p<0,05, ***p<0,001 vs controllo; ###p<0,001 vs animali trattati con cellule LAM/TSC.

| | cellule LAM/ TSC | Anticorpo anti-EGFR | Rapamicina |
|---|---------------------|------------------------|------------|
| % cellule positive a ki67 30 settimane dopo la somministrazione delle cellule | 7,8% | 4% | 3,6% |
| % cellule positive a ki67 38 settimane dopo la somministrazione delle cellule | 8,7% | 5,5% * | 4,9% ## |

Tabella 1: Confronto della percentuale di cellule positive a ki67 tra gli animali sacrificati alla 30^{esima} e quelli sacrificati alla 38^{esima} settimana.

Test t di student: * $p < 0,05$ vs animali trattati con anticorpo anti-EGFR e sacrificati alla 30^{esima} settimana; ## $p < 0,01$ vs animali trattati con rapamicina e sacrificati alla 30^{esima} settimana.

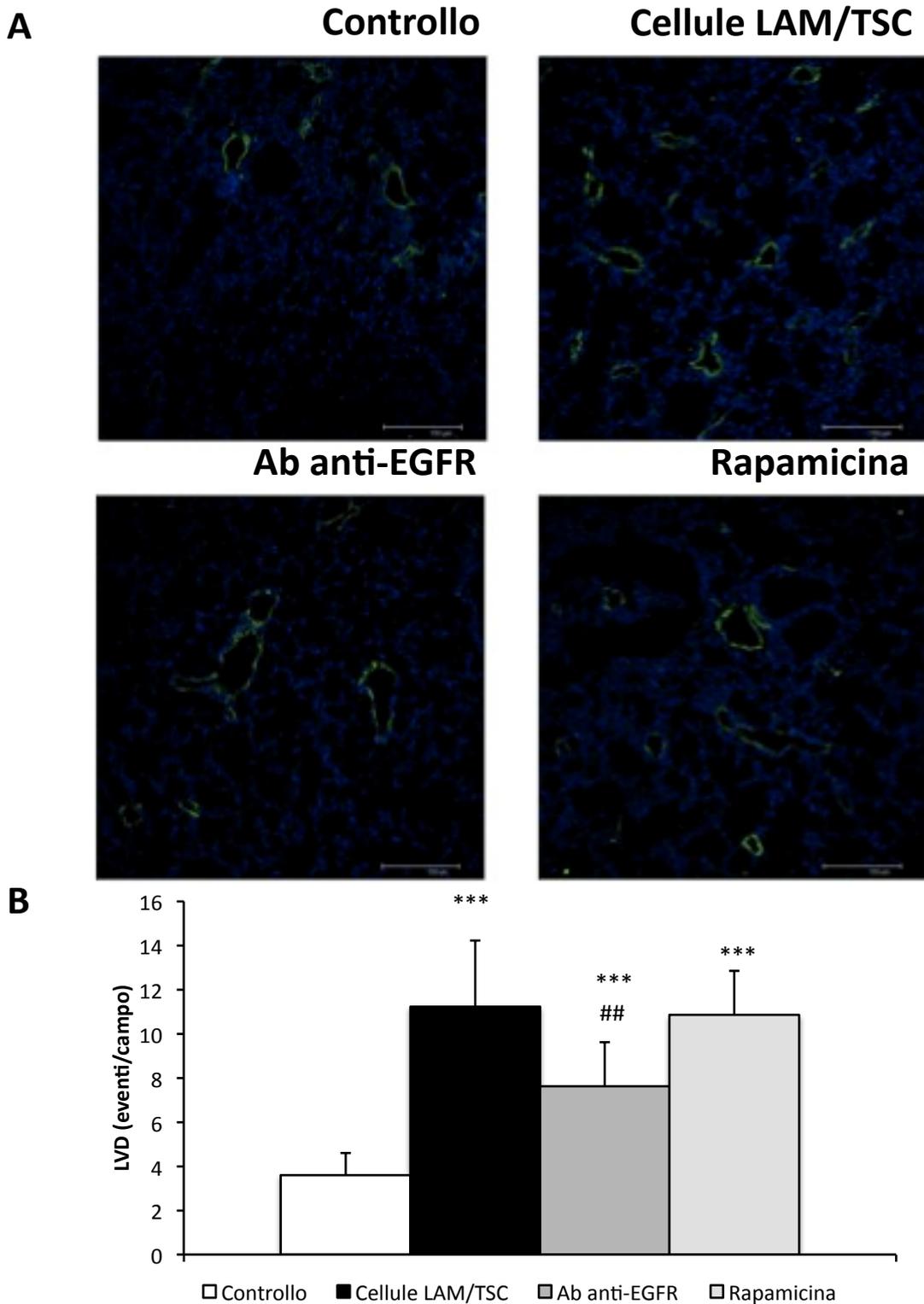


Figura 12: Valutazione della linfangiogenesi tramite marcatura con LYVE-1 nei polmoni degli animali controllo, degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC, degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR o con la rapamicina per 4 settimane (26^{esima}-30^{esima} settimana) e sacrificati 8 settimane dopo la sospensione farmacologica (38^{esima} settimana) (A). Quantificazione della densità dei vasi linfatici (LVD) (B). Test t di Student: *** $p < 0,001$ vs animali controllo; ## $p < 0,01$ vs animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC.

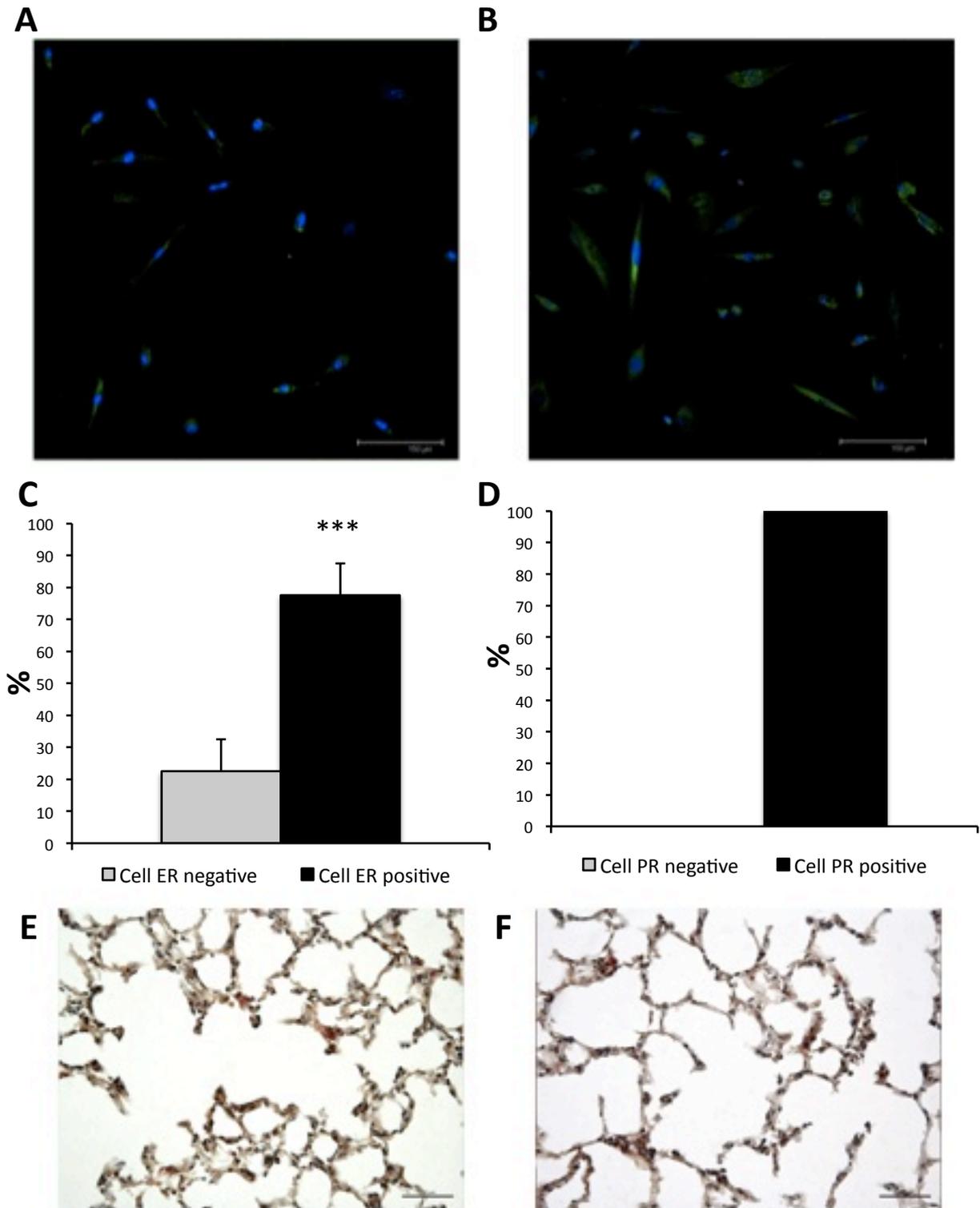


Figura 13: Espressione del recettore degli estrogeni (verde) (A) e recettore del progesterone (verde) (B) in cellule LAM/TSC. Quantificazione delle cellule positive al recettore degli estrogeni (C) e al recettore del progesterone (D) nelle cellule LAM/TSC *in vitro*. Colocalizzazione delle cellule umane LAM/TSC tramite l'anticorpo umano HLA-A, -B,- C (Vector Red) e recettore degli estrogeni (DAB) (E) o recettore del progesterone (DAB) (F). Test t di Student: *** $p < 0,001$ vs cellule ER negative

| | cellule LAM/TSC | Anticorpo anti-EGFR | Rapamicina |
|---|--------------------|------------------------|------------|
| % animali con noduli nel tessuto polmonare | 46% | 25% | 33,3% |

Tabella 2: Percentuale di animali nei quali è stata individuata la presenza di noduli polmonari dopo 30 settimane dalla somministrazione di cellule LAM/TSC.

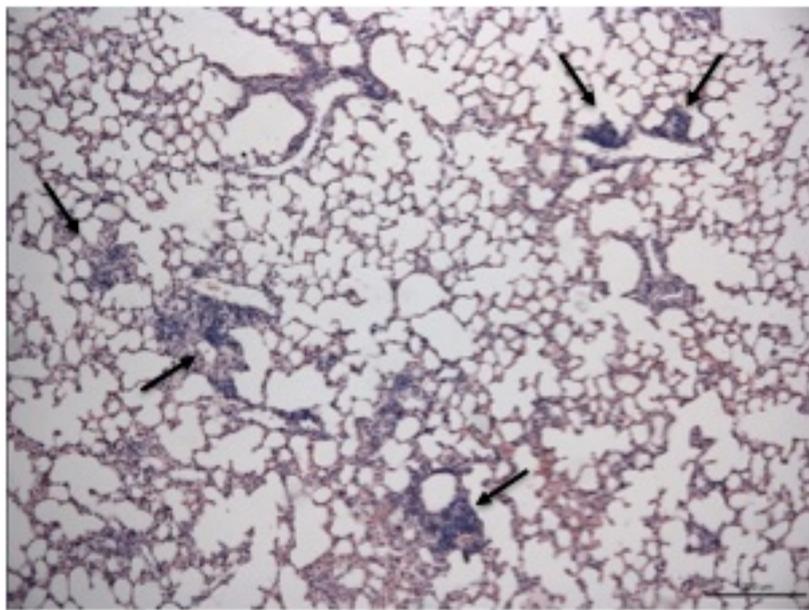


Figura 14: Presenza di noduli polmonari (frece). 30 settimane dopo la somministrazione delle cellule LAM/TSC per via endonasale.

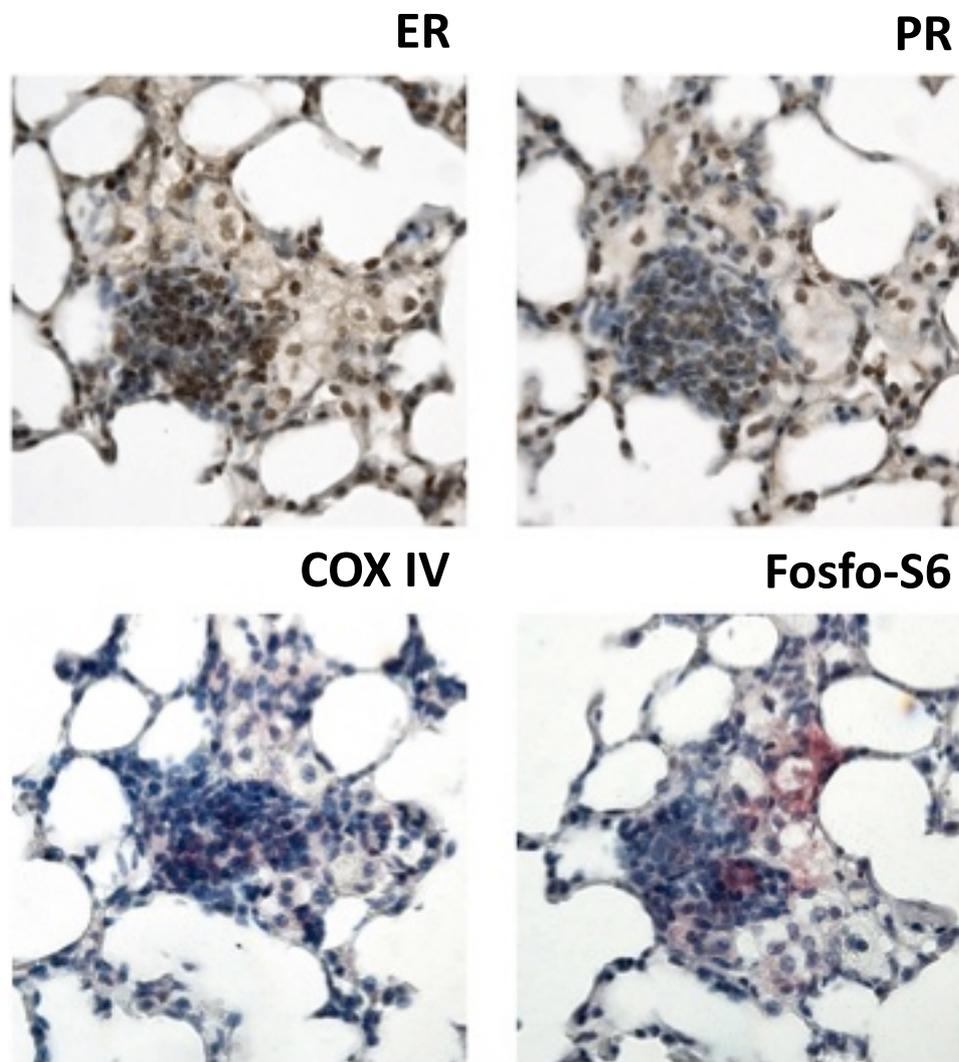
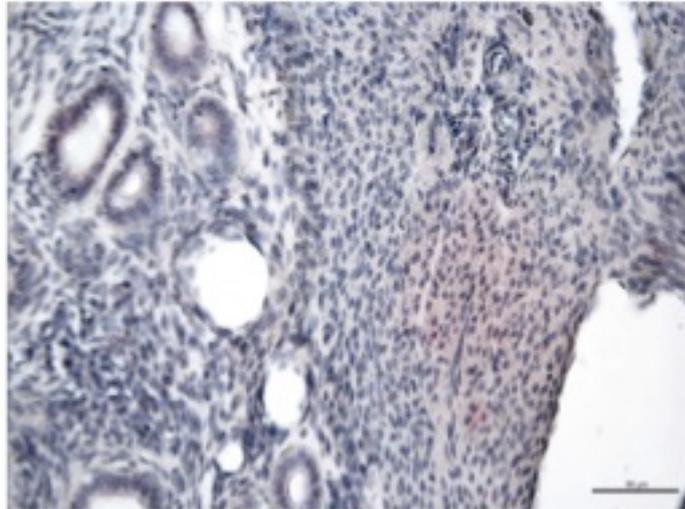


Figura 15: Sezioni seriali di un nodulo polmonare nel tessuto degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC. Positività al recettore degli estrogeni (in alto a sinistra), al recettore del progesterone (in alto a destra), a COX IV (in basso a sinistra) e a fosfo-S6 (in basso a destra).

Controllo



Cellule LAM/TSC

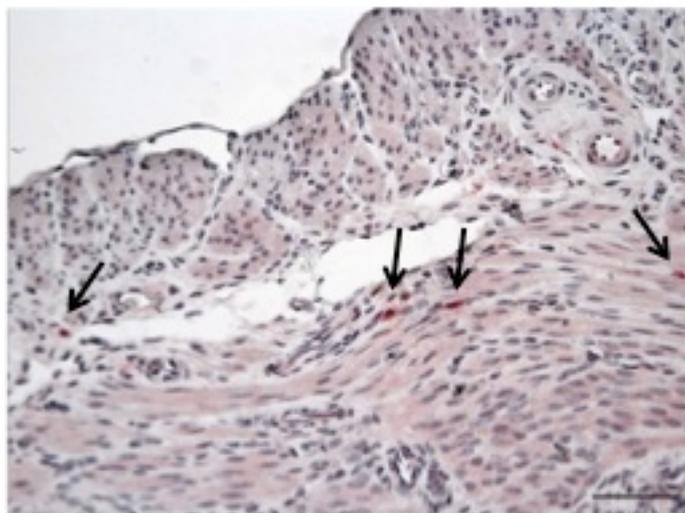
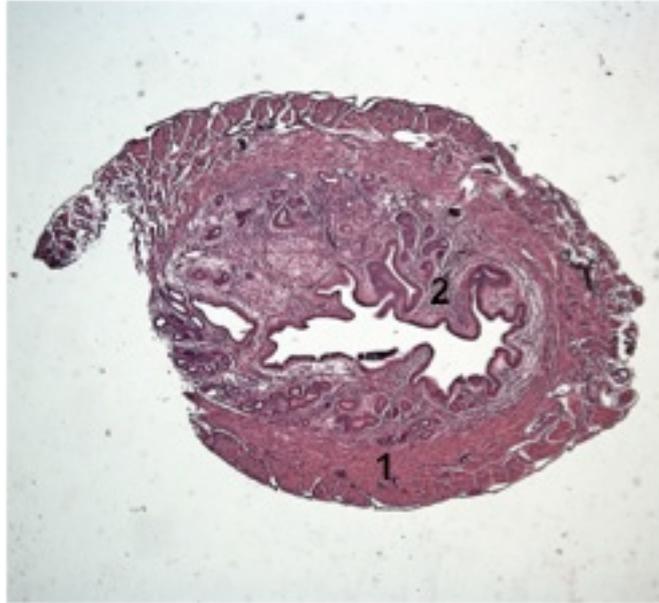


Figura 16: Espressione dell'anticorpo umano COX IV negli uteri degli animali controllo e negli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC. Le frecce indicano le cellule umane quindi positive a COX IV.

Controllo



Cellule LAM/TSC



Figura 17: Colorazione con ematossilina-eosina di sezioni di utero di un animale controllo e di un animale a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC. 1 miometrio, 2 endometrio.

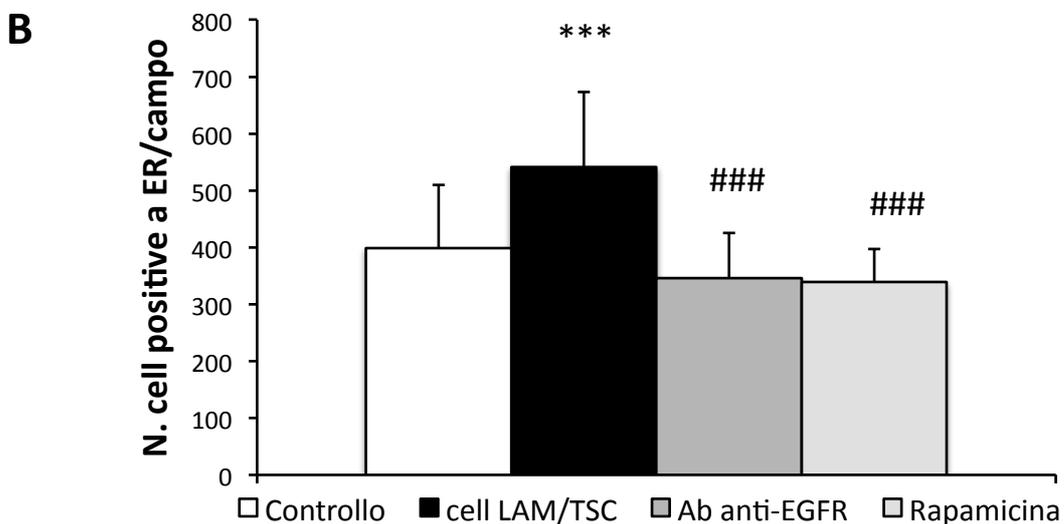
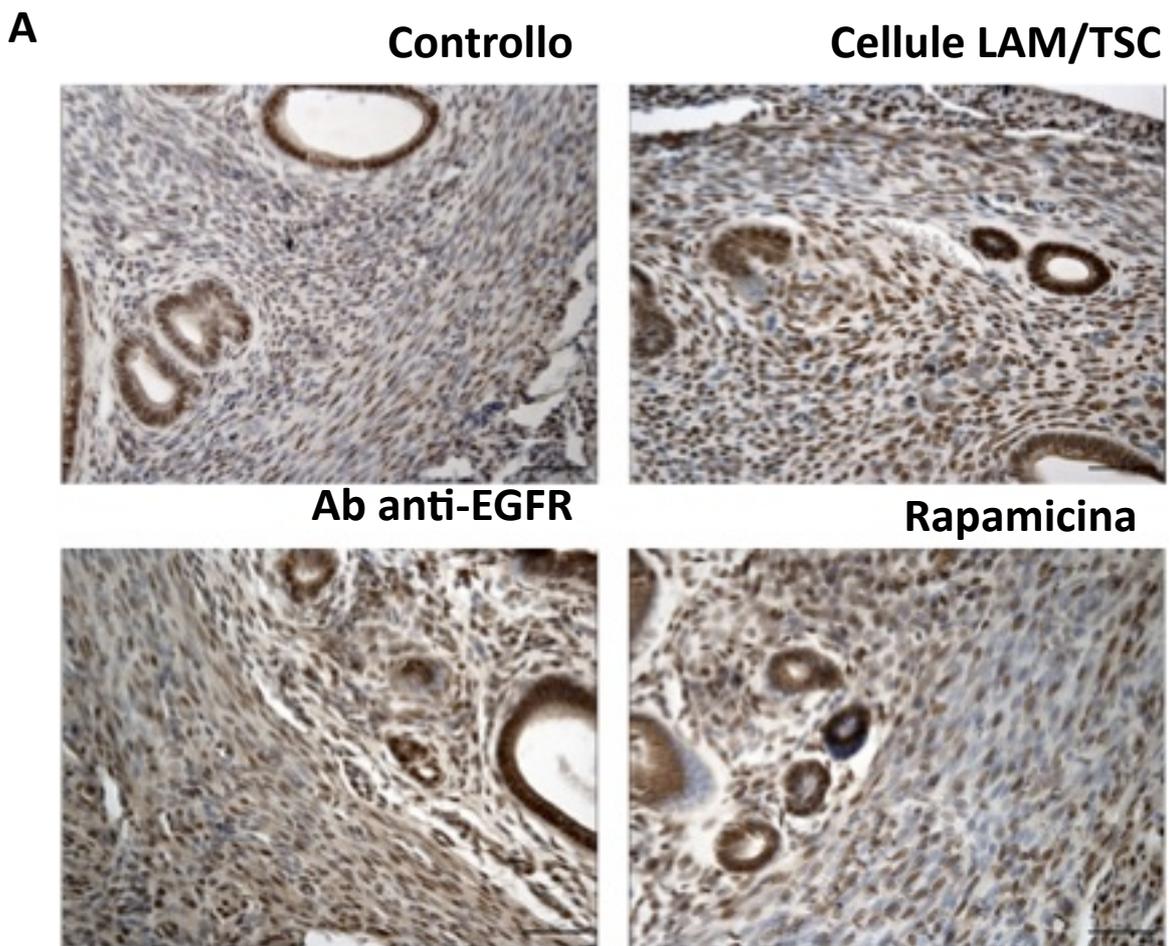


Figura 18: Espressione del recettore degli estrogeni negli uteri degli animali controllo, degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC, degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR e degli animali trattati con la rapamicina 30 settimane dopo la somministrazione delle cellule LAM/TSC (A). Quantificazione del numero di cellule positive al recettore degli estrogeni rispetto al campo ripreso (B). Test t di Student: *** $p < 0,001$ vs controllo; ### $p < 0,001$ vs animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC.

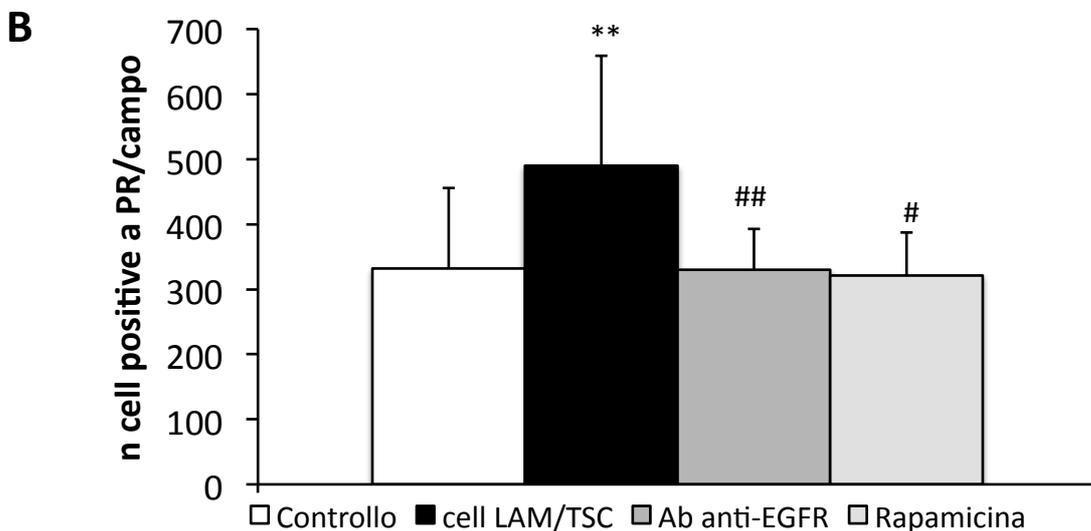
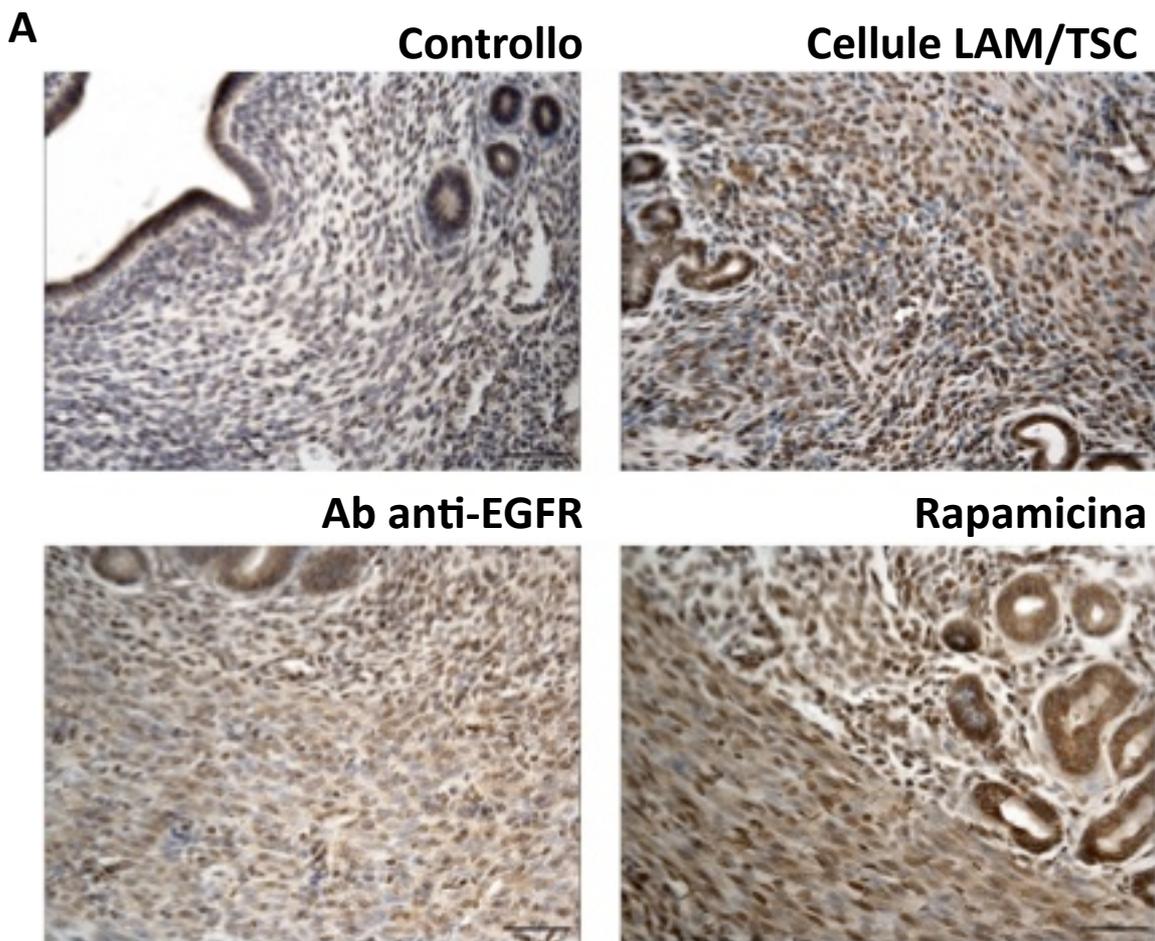


Figura 19: Espressione del recettore del progesterone negli uteri degli animali controllo, degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC, degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR e degli animali trattati con la rapamicina 30 settimane dopo la somministrazione delle cellule LAM/TSC (A). Quantificazione del numero di cellule positive al recettore del progesterone rispetto al campo ripreso (B). Test t di Student: ** $p < 0,01$ vs controllo; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ vs animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC.

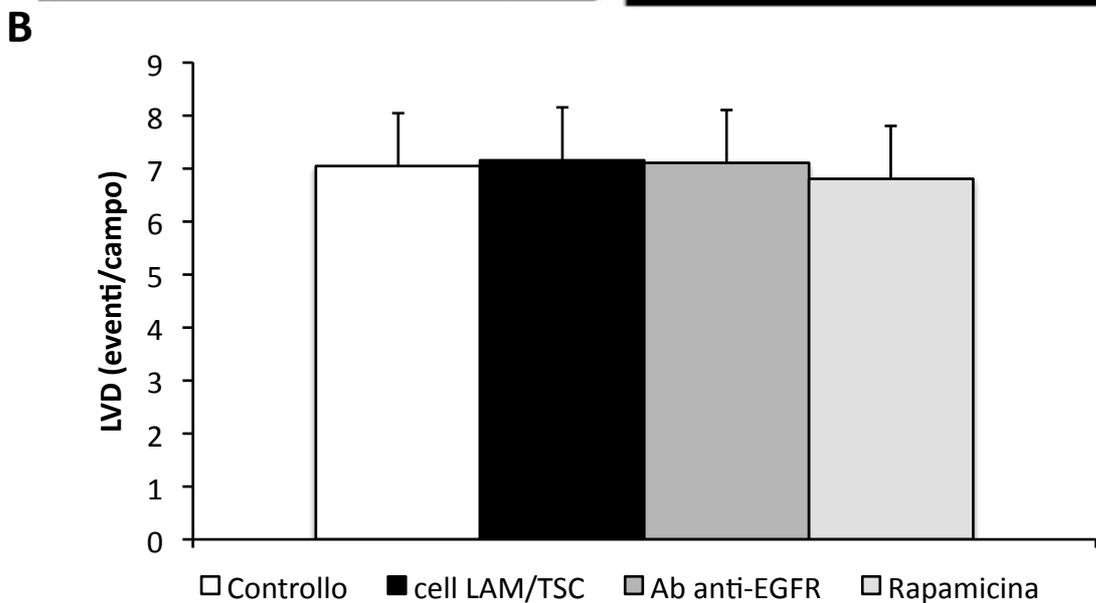
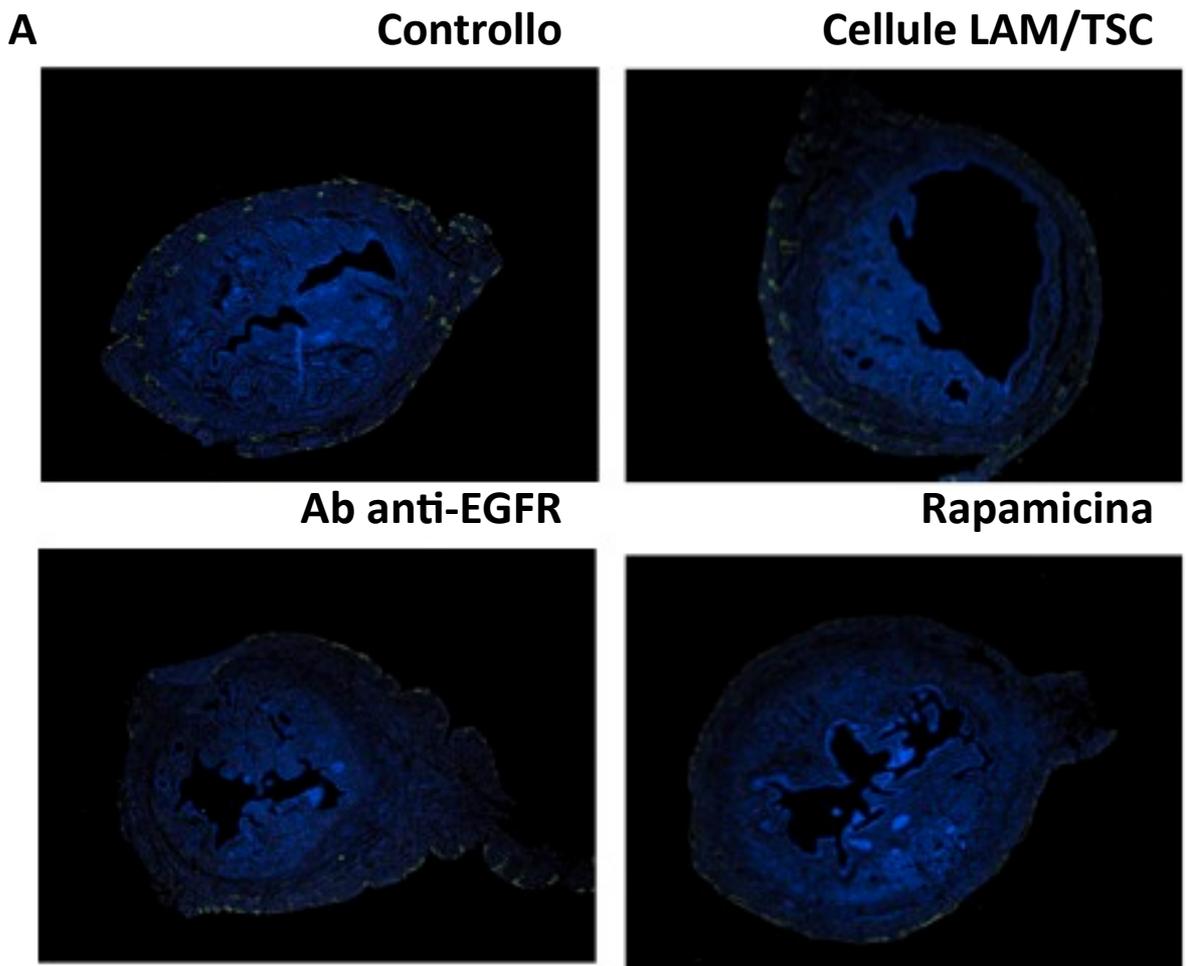


Figura 20: Valutazione della linfangiogenesi tramite marcatura con LYVE-1 nell'utero degli animali controllo, degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC, degli animali trattati con l'anticorpo anti-EGFR e degli animali trattati con la rapamicina per 4 settimane (A). Quantificazione della densità dei vasi linfatici (LVD) (B).

DISCUSSIONE

La linfangioleiomiomatosi (LAM) è una malattia rara e progressiva che colpisce quasi esclusivamente le donne in età fertile e può insorgere in maniera sporadica o in associazione alla TSC (Taveira-deSilva et al., 2006). Sebbene siano stati individuati i geni responsabili dello sviluppo della malattia, *TSC1* e *TSC2*, ancora oggi sono sconosciuti i meccanismi fisiopatologici che portano all'insorgenza e alla progressione dei sintomi della LAM. La ricerca *in vitro* ha permesso di ottenere buoni risultati e di individuare diversi bersagli molecolari su cui concentrare la ricerca per intervenire terapeuticamente (Kinder et al., 2010). Inoltre, sono stati creati modelli animali che hanno permesso di riprodurre alcune manifestazioni della LAM e della TSC, ma che non hanno sviluppato un quadro istopatologico riconducibile in maniera adeguata alla LAM. I modelli maggiormente utilizzati sono il ratto Eker, caratterizzato da mutazioni spontanee a carico del gene *TSC2* che ha una predisposizione a sviluppare adenomi renali, carcinomi e leiomiomi uterini, e i molti topi *Tsc2^{+/-}* creati in laboratorio che sviluppano tumori renali ed emangiomi (Kobayashi et al., 1995; Kobayashi et al., 1999; Onda et al., 1999). I modelli animali creati fino ad oggi sono frutto dell'ingegneria genetica o utilizzano cellule isolate dal leiomioma uterino del ratto Eker (cellule ELT3), ma non sono mai state utilizzate cellule umane per indurre la malattia.

In questo studio abbiamo sviluppato un modello di LAM utilizzando cellule umane LAM/TSC isolate dal chilotorace di una paziente affetta da TSC complicata gravemente da un quadro di LAM con coinvolgimento linfatico. Sfruttando le caratteristiche migratorie di queste cellule lo studio ha lo scopo di analizzare le capacità invasive che permettono il raggiungimento degli organi bersaglio e lo sviluppo di un quadro istopatologico che riproduca le manifestazioni della LAM. E' noto che le cellule LAM sono istologicamente benigne e capaci di migrare e metastatizzare in diversi organi (polmoni, linfonodi, utero, rene) (Henske, 2003). In genere, nelle cellule tumorali l'acquisizione di caratteristiche mesenchimali è un aspetto transiente e determinante per la loro capacità migratoria e invasiva. Le cellule utilizzate in questo studio, non solo hanno caratteristiche mesenchimali (positive ai marcatori SNAIL e vimentina), ma, *in vitro*, sono in grado di passare da uno stato in cui sono adese alla petri ad uno in cui si trovano in sospensione in maniera ciclica rimanendo vitali. Questo meccanismo potrebbe essere correlato all'*epithelial-mesenchymal transition*, un processo responsabile della progressione tumorale e della formazione di metastasi (Voulgari et al., 2009).

Le cellule LAM/TSC sono state somministrate in topi nudi per via endonasale allo scopo di favorire la migrazione a livello polmonare. Le cellule sono in grado di raggiungere e invadere i polmoni degli animali e sono individuabili anche dopo 38 settimane dalla somministrazione. La capacità migratoria è stata dimostrata identificando le cellule umane anche a livello linfonodale e uterino. La presenza delle cellule LAM/TSC nel polmone è associata a cambiamenti morfologici e ad un aumento dei vasi linfatici. Infatti, nel polmone, le cellule LAM/TSC, causano distruzione cistica del parenchima con la rottura dei setti interalveolari e l'apertura degli spazi che riducono la superficie utile per gli scambi gassosi. Questo quadro istologico è simile a quello presente nella LAM responsabile dei tipici problemi respiratori delle pazienti. Le cellule caratterizzate dall'assenza del complesso amartina-tuberina hanno un'alterata capacità proliferativa dovuta all'iperattivazione di mTOR (Goncharova et al., 2002). In accordo con questo, le cellule LAM/TSC isolate nel nostro laboratorio hanno un elevato tasso di crescita *in vitro*. Nei polmoni degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC si osserva un aumento delle cellule proliferanti che potrebbe essere alla base della distruzione cistica.

Queste caratteristiche nel modello murino supportano l'ipotesi che le cellule LAM hanno abilità metastatiche, quindi, non solo sono in grado di lasciare la loro sede primaria, entrare e sopravvivere nel sistema circolatorio linfatico e/o ematico, ma anche di crescere e proliferare nel sito di "metastasi".

Nel polmone e nei linfonodi si osserva un cospicuo aumento dei vasi linfatici in seguito a somministrazione endonasale delle cellule LAM/TSC. Questo è in accordo con la descrizione delle lesioni LAM delle pazienti nelle quali è presente una forte infiltrazione linfatica dimostrata con i marcatori specifici VEGFR-3, podoplanina e PROX-1 (Kumasaka et al., 2004). Il coinvolgimento delle cellule LAM nelle alterazioni del sistema linfatico è ampiamente supportato sia dai dati clinici che da numerosi studi presenti in letteratura. Tra le manifestazioni cliniche della LAM sono presenti eventi quali chilotorace e linfoadenopatie che sono causate dalla disfunzione del sistema linfatico e peggiorano le condizioni cliniche delle pazienti e il decorso della malattia. È stato dimostrato che l'entità del danno a livello polmonare e la severità istologica, indicata con l'LHS (*LAM Histology Score*), correla con l'intensità di espressione di VEGF-C e con il grado di linfoangiogenesi (Kumasaka et al., 2004; Matsui et al., 2001; Glasgow et al., 2009). Inoltre, il VEGF-D, un fattore linfoangiogenico, è aumentato nel siero delle pazienti LAM rispetto ai soggetti sani. Tale aumento è maggiore nei casi più gravi e quando è presente un coinvolgimento del sistema linfatico (Glasgow et al., 2009). Il VEGF-D, quindi, potrebbe essere considerato un buon marcatore del coinvolgimento

linfatico e un indice della severità e dell'aggressività della malattia (Glasgow et al., 2009).

All'interno del parenchima polmonare degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC è stato osservato un notevole aumento di vasi sanguigni, oltre a quello di vasi linfatici. Nelle pazienti LAM le cellule patologiche prediligono la via linfatica a quella ematogena, migrando sotto forma di *clusters* circondati da cellule endoteliali linfatiche (Kumasaka et al., 2005). Tuttavia, in alcuni casi, nelle lesioni LAM si osserva un aumento anche della vascolarizzazione ematica che spiegherebbe il quadro osservato nel nostro modello. Nel modello precedentemente creato nel nostro laboratorio somministrando cellule isolate da un angiomiolipoma di una paziente affetta da TSC, cellule $TSC2^{-/-}$ ASM, era stata osservata distruzione cistica e linfangiogenesi polmonare, ma non era mai stato riscontrato un incremento della vascolarizzazione ematica. La somministrazione di cellule LAM/TSC isolate da chilotorace per via endonasale sembra, quindi, in grado di causare alterazioni istopatologiche simili a quelle osservate nella LAM e di creare un quadro LAM più completo rispetto alla somministrazione delle cellule $TSC2^{-/-}$ ASM.

La LAM è una malattia spesso fatale e, ad oggi, non esiste ancora una cura. I trattamenti utilizzati sono essenzialmente di supporto per migliorare il decorso clinico della patologia.

La perdita di funzionalità della proteina tuberina e, di conseguenza, del complesso TSC causa la mancata regolazione di mTOR. La rapamicina, inibendo direttamente l'attività di mTOR, è in grado di mimare il complesso TSC, quindi è considerato il farmaco d'elezione per le cellule con mutazioni nei geni *TSC1* e *TSC2*. La rapamicina (Sirolimus) è un farmaco immunosoppressore che agisce arrestando la progressione delle cellule dalla fase G1 alla fase S attraverso l'interazione di proteine come *FK-binding protein* ed mTOR. Questo porta al blocco di numerose cascate del segnale e all'inibizione di citochine che regolano il ciclo cellulare. Recentemente la ricerca di molti gruppi si è focalizzata sull'utilizzo di rapamicina (sirolimus) e del suo derivato (everolimus) nell'individuazione di una terapia per la LAM e la TSC. Sono stati condotti numerosi trials clinici dove il primo goal è stato quello di dimostrare la capacità del sirolimus e dell'everolimus di ridurre le dimensioni degli angiomiolipomi (Bissler et al., 2008; Kinder et al., 2010). Da questi trials è emerso che il trattamento è in grado di ridurre significativamente il volume delle masse tumorali, ma che la sospensione farmacologica è associata all'aumento graduale delle dimensioni delle masse tumorali fino al raggiungimento delle dimensioni iniziali (Bissler et al., 2008). Per prevenire la ricrescita degli angiomiolipomi la somministrazione di rapamicina è stata protratta per periodi

più lunghi evidenziando che, per mantenere l'effetto farmacologico, potrebbe essere necessario un trattamento a lungo termine (Davies et al., 2011). Nelle pazienti LAM, la rapamicina stabilizza le funzionalità polmonari e riduce i livelli sierici di VEGF-D suggerendo che l'inibizione della via di mTOR potrebbe costituire un buon bersaglio terapeutico (McCormack et al., 2011; Taveira-daSilva et al., 2011). Tuttavia, quando il trattamento viene interrotto, le funzionalità polmonari vanno incontro ad un declino progressivo (McCormack et al., 2011). Inoltre, il miglioramento delle manifestazioni polmonari non è stato registrato in tutti i trials e la somministrazione di rapamicina in alcune pazienti è associata, a livello respiratorio, a gravi effetti collaterali che richiedono la sospensione del trattamento (Davies et al., 2011; Neurohr et al., 2011). L'efficacia della rapamicina sulle manifestazioni polmonari richiede, quindi, una riflessione adeguata, pur restando al momento l'unica terapia innovativa valutata nelle pazienti affette da LAM. Nelle cellule precedentemente isolate nel nostro laboratorio, $TSC2^{-/-}$ e $TSC2^{-/meth}$ ASM, e nelle cellule LAM/TSC la rapamicina ha effetti che concordano con quanto riportato nei trials clinici. In assenza di tuberina la rapamicina risulta efficace nella riduzione del tasso di crescita con un effetto prevalentemente citostatico, ma non citotossico (Lesma et al., 2005; Lesma et al., 2009). Nel modello murino proposto in questo studio il trattamento con rapamicina è in grado di contenere efficacemente la formazione di cisti polmonari, il grado di linfangiogenesi e la proliferazione cellulare nei polmoni e nei linfonodi. Tuttavia, la rapamicina causa aree di estesa emottisi tissutale e ispessimento delle pareti alveolari. Con la sospensione del trattamento farmacologico si assiste alla regressione della tossicità polmonare e, sebbene senza un significativo aumento della percentuale di spazio aereo alveolare, ad un lieve aumento della linfangiogenesi e del numero di cellule proliferanti. La tossicità polmonare della rapamicina, soprattutto la fibrosi focale e l'emorragia alveolare polmonare, sono effetti collaterali riportati in letteratura che migliorano con la sospensione del farmaco (Pham et al., 2004; Vlahkis et al., 2004).

Le cellule muscolari lisce con mutazioni e perdita di eterozigosità del gene $TSC2$ ($TSC2^{-/-}$ e $TSC2^{-/meth}$ ASM), *in vitro*, sono dipendenti dall'EGF per crescere (Lesma et al., 2005; Lesma et al., 2009). L'EGF e il suo recettore promuovono diversi processi responsabili della crescita e della progressione tumorale quali il differenziamento cellulare, la proliferazione, la migrazione, l'angiogenesi e l'apoptosi (Rocha-lima et al., 2007). Gli anticorpi in grado di bloccare l'EGFR sono efficaci nel trattamento di diverse neoplasie tra cui il cancro colon-rettale, il tumore del polmone non a piccole cellule (NSLC) e il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (Vokes et al., 2006). Il blocco del recettore dell'EGF nelle cellule $TSC2^{-/-}$ e $TSC2^{-/meth}$ ASM causa l'arresto della

proliferazione e la progressiva morte cellulare (Lesma et al., 2005; Lesma et al., 2009). Allo stesso modo, le cellule LAM/TSC sono dipendenti dall'EGF per la sopravvivenza e la proliferazione e sono sensibili al blocco del suo recettore. L'effetto dell'anticorpo anti-EGFR persiste anche in seguito alla sospensione del farmaco. Le cellule vanno incontro a morte in pochi giorni dimostrando che l'efficacia dell'anticorpo anti-EGFR sulla sopravvivenza cellulare è dovuto ad un meccanismo specifico per queste cellule. Infatti, l'azione dell'anticorpo anti-EGFR dipende dalla mancanza di tuberina (Lesma et al., 2008; Lesma et al., 2009). Nel modello sviluppato in questo studio l'azione dell'anticorpo anti-EGFR si esplica riducendo significativamente la proliferazione cellulare nel parenchima polmonare e il danno tissutale causato dalla formazione di cisti. Morfologicamente la distruzione cistica è revertita e la settazione alveolare ritorna simile a quella degli animali controllo. L'anticorpo anti-EGFR agisce anche sul grado di linfoangiogenesi, infatti, causa una diminuzione della densità dei vasi linfatici sia nel linfonodo che nei polmoni. Questi dati dimostrano che l'anticorpo anti-EGFR potrebbe risultare utile nel trattamento della LAM sia per migliorare la funzionalità polmonare sia per contenere la linfoangiogenesi. Gli effetti del trattamento con anticorpo anti-EGFR permangono anche 8 settimane dopo la sospensione farmacologica, infatti, non si osserva la formazione di cisti polmonari e si mantiene l'effetto contenitivo del grado di linfoangiogenesi. Tuttavia, è presente un incremento della percentuale delle cellule proliferanti. Ulteriori studi dovrebbero essere condotti per comprendere la causa di tale proliferazione.

La LAM è una malattia che colpisce quasi esclusivamente le donne in età fertile. Come per alcune patologie che colpiscono con un'alta incidenza le donne è stato ipotizzato un ruolo degli estrogeni nella patogenesi della LAM (Yu et al., 2009). La LAM, può essere considerata una malattia ormone-dipendente e, sebbene non sia ancora stato chiarito il ruolo degli ormoni nell'evoluzione della patologia, ci sono numerosi elementi a sostegno di quest'ipotesi. In alcuni casi, la gravidanza e l'utilizzo di contraccettivi orali correlano con una maggior frequenza delle complicanze e un declino delle funzionalità polmonari più rapido (Wahedna et al., 1994; Oberstein et al., 2003; Cohen et al., 2008). Inoltre, *in vitro*, la stimolazione estrogenica influenza la sopravvivenza e la disseminazione delle cellule LAM (Yu et al., 2009). Le cellule LAM sono positive ai recettori degli estrogeni e del progesterone ed entrambi i recettori sono espressi negli angiomiolipomi e nei noduli polmonari delle pazienti con localizzazione a livello nucleare ed espressione a intensità variabile (Berger et al., 2000; Tawfik et al., 1996; Logginidou et al., 2000). I noduli sono caratterizzati da *clusters* di cellule LAM organizzate solitamente a nido d'ape (Matsui et al., 2000). In accordo con questi dati, le

cellule LAM/TSC utilizzate in questo studio esprimono i recettori estrogenici (78% delle cellule) e progestinici (100% delle cellule). *In vivo*, mantengono questa positività anche dopo aver invaso il polmone. Inoltre, tra gli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC una buona percentuale presenta la formazione di noduli che sono fortemente positivi ai recettori degli estrogeni e del progesterone. All'interno dei noduli sono state individuate cellule umane e cellule positive alla forma fosforilata di S6 (fortemente espressa nelle cellule LAM) dimostrando che la loro formazione è secondaria alla somministrazione delle cellule LAM/TSC. L'espressione dei recettori estrogenici e progestinici nei noduli polmonari dei topi nudi dopo la somministrazione delle cellule LAM/TSC è simile a quello delle cellule presenti nelle lesioni LAM e negli AML (nucleare a intensità variabile) dimostrando la validità del modello murino per le analogie istologiche con le lesioni delle pazienti. Un altro elemento a sostegno di un ruolo importante degli estrogeni nella patogenesi della LAM è l'insorgenza di leiomiomi uterini nel 38% delle pazienti (Taveira-daSilva et al., 2011). La crescita dei leiomiomi uterini è fortemente correlata con la presenza di estrogeni; in alcuni casi, insorgono durante la gravidanza e colpiscono quasi esclusivamente le donne in età fertile (Taveira-daSilva et al., 2006; Wallach et al., 2004). Come abbiamo detto precedentemente, le cellule LAM/TSC nel nostro modello sono in grado di migrare a livello uterino, tuttavia, in questa sede non sembrano in grado di causare alterazioni morfologiche. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che per sviluppare e mantenere le caratteristiche di un leiomioma uterino *in vivo* sembra sia necessaria la somministrazione e l'integrazione di estrogeni (Tsuiji et al., 2010). Probabilmente, gli estrogeni endogeni non sono sufficienti a causare una lesione uterina che necessiterebbe di un incremento esogeno dei livelli ormonali. Pur non sviluppando alterazioni morfologiche nell'utero, la presenza delle cellule LAM/TSC suggerisce una correlazione con l'incremento della positività al recettore degli estrogeni e del progesterone. I trattamenti farmacologici con l'anticorpo anti-EGFR o la rapamicina sono efficaci anche a livello uterino nel riportare i valori di espressione dei recettori ormonali a livelli simili al controllo dimostrando la loro capacità d'azione sulle alterazioni causate dalle cellule LAM/TSC. In un recente studio è stato dimostrato che nei leiomiomi uterini delle pazienti LAM è presente un'estesa linfoangiogenesi a livello del miometrio (Hayashi et al., 2011). Nel modello sviluppato in questo studio non si osserva lo stesso quadro patologico, infatti, in nessun gruppo sperimentale sono state individuate alterazioni linfatiche. E' possibile che, pur raggiungendo l'utero, le cellule LAM/TSC necessitino di una stimolazione aggiuntiva per indurre alterazioni sia di tipo morfologico che linfatico.

In conclusione possiamo affermare che grazie alla somministrazione delle cellule LAM/TSC per via endonasale è possibile sviluppare un modello di LAM *in vivo*.

Le cellule LAM/TSC sono in grado di migrare in diversi organi quali i polmoni, i linfonodi e l'utero mostrando buone capacità metastatiche. Inoltre, la loro presenza correla con un aumento della linfangiogenesi nel polmone e nei linfonodi e un aumento dell'espressione dei recettori degli estrogeni e del progesterone nell'utero. L'effetto maggiore della somministrazione delle cellule è stato osservato a livello polmonare dove si instaura la distruzione cistica polmonare, un aumento della proliferazione cellulare e della linfangiogenesi e la formazione di noduli positivi ai recettori ormonali creando un quadro istopatologico molto simile a quello osservato nelle pazienti LAM.

La rapamicina è in grado di contenere i danni indotti dalle cellule somministrate anche se causa effetti collaterali a livello polmonare e perde efficacia in seguito all'interruzione del trattamento, in accordo con i risultati riportati nei trials clinici. E' evidente che, seppur la rapamicina resti il farmaco d'elezione, sia necessario individuare dei nuovi bersagli terapeutici da utilizzare eventualmente in combinazione con la rapamicina stessa. Come riportato dagli studi *in vitro*, l'anticorpo anti-EGFR è efficace e specifico nel bloccare la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule LAM/TSC. *In vivo*, agisce revertendo il danno polmonare, la proliferazione cellulare e la linfangiogenesi senza causare apparenti effetti collaterali e dimostrando buone capacità nell'arrestare l'azione delle cellule LAM/TSC. In base ai dati ottenuti in questo studio possiamo confermare il valore terapeutico dell'anticorpo anti-EGFR sia *in vitro* che *in vivo* sulle cellule tuberina-deficienti e indicare la via Raf/MEK/Erk come efficace bersaglio terapeutico per la LAM e la TSC. La linfangioleiomiomatosi (LAM) è una malattia rara e progressiva che colpisce quasi esclusivamente le donne in età fertile e può insorgere in maniera sporadica o in associazione alla TSC (Taveira-deSilva et al., 2006). Sebbene siano stati individuati i geni responsabili dello sviluppo della malattia, *TSC1* e *TSC2*, ancora oggi sono sconosciuti i meccanismi fisiopatologici che portano all'insorgenza e alla progressione dei sintomi della LAM. La ricerca *in vitro* ha permesso di ottenere buoni risultati e di individuare diversi bersagli molecolari su cui concentrare la ricerca per intervenire terapeuticamente (Kinder et al., 2010). Inoltre, sono stati creati modelli animali che hanno permesso di riprodurre alcune manifestazioni della LAM e della TSC, ma che non hanno sviluppato un quadro istopatologico riconducibile in maniera adeguata alla LAM. I modelli maggiormente utilizzati sono il ratto Eker, caratterizzato da mutazioni spontanee a carico del gene *TSC2* che ha una predisposizione a sviluppare adenomi renali, carcinomi e leiomiomi uterini, e i molti topi *Tsc2^{+/-}* creati in laboratorio che sviluppano tumori renali ed emangiomi (Kobayashi et al., 1995; Kobayashi et al.,

1999; Onda et al., 1999). I modelli animali creati fino ad oggi sono frutto dell'ingegneria genetica o utilizzano cellule isolate dal leiomioma uterino del ratto Eker (cellule ELT3), ma non sono mai state utilizzate cellule umane per indurre la malattia.

In questo studio abbiamo sviluppato un modello di LAM utilizzando cellule umane LAM/TSC isolate dal chilotorace di una paziente affetta da TSC complicata gravemente da un quadro di LAM con coinvolgimento linfatico. Sfruttando le caratteristiche migratorie di queste cellule lo studio ha lo scopo di analizzare le capacità invasive che permettono il raggiungimento degli organi bersaglio e lo sviluppo di un quadro istopatologico che riproduca le manifestazioni della LAM. E' noto che le cellule LAM sono istologicamente benigne e capaci di migrare e metastatizzare in diversi organi (polmoni, linfonodi, utero, rene) (Henske, 2003). In genere, nelle cellule tumorali l'acquisizione di caratteristiche mesenchimali è un aspetto transiente e determinante per la loro capacità migratoria e invasiva. Le cellule utilizzate in questo studio, non solo hanno caratteristiche mesenchimali (positive ai marcatori SNAIL e vimentina), ma, *in vitro*, sono in grado di passare da uno stato in cui sono adese alla petri ad uno in cui si trovano in sospensione in maniera ciclica rimanendo vitali. Questo meccanismo potrebbe essere correlato all'*epithelial-mesenchymal transition*, un processo responsabile della progressione tumorale e della formazione di metastasi (Voulgari et al., 2009).

Le cellule LAM/TSC sono state somministrate in topi nudi per via endonasale allo scopo di favorire la migrazione a livello polmonare. Le cellule sono in grado di raggiungere e invadere i polmoni degli animali e sono individuabili anche dopo 38 settimane dalla somministrazione. La capacità migratoria è stata dimostrata identificando le cellule umane anche a livello linfonodale e uterino. La presenza delle cellule LAM/TSC nel polmone è associata a cambiamenti morfologici e ad un aumento dei vasi linfatici. Infatti, nel polmone, le cellule LAM/TSC, causano distruzione cistica del parenchima con la rottura dei setti interalveolari e l'apertura degli spazi che riducono la superficie utile per gli scambi gassosi. Questo quadro istologico è simile a quello presente nella LAM responsabile dei tipici problemi respiratori delle pazienti. Le cellule caratterizzate dall'assenza del complesso amartina-tuberina hanno un'alterata capacità proliferativa dovuta all'iperattivazione di mTOR (Goncharova et al., 2002). In accordo con questo, le cellule LAM/TSC isolate nel nostro laboratorio hanno un elevato tasso di crescita *in vitro*. Nei polmoni degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC si osserva un aumento delle cellule proliferanti che potrebbe essere alla base della distruzione cistica.

Queste caratteristiche nel modello murino supportano l'ipotesi che le cellule LAM hanno abilità metastatiche, quindi, non solo sono in grado di lasciare la loro sede

primaria, entrare e sopravvivere nel sistema circolatorio linfatico e/o ematico, ma anche di crescere e proliferare nel sito di “metastasi”.

Nel polmone e nei linfonodi si osserva un cospicuo aumento dei vasi linfatici in seguito a somministrazione endonasale delle cellule LAM/TSC. Questo è in accordo con la descrizione delle lesioni LAM delle pazienti nelle quali è presente una forte infiltrazione linfatica dimostrata con i marcatori specifici VEGFR-3, podoplanina e PROX-1 (Kumasaka et al., 2004). Il coinvolgimento delle cellule LAM nelle alterazioni del sistema linfatico è ampiamente supportato sia dai dati clinici che da numerosi studi presenti in letteratura. Tra le manifestazioni cliniche della LAM sono presenti eventi quali chilotorace e linfadenopatie che sono causate dalla disfunzione del sistema linfatico e peggiorano le condizioni cliniche delle pazienti e il decorso della malattia. È stato dimostrato che l'entità del danno a livello polmonare e la severità istologica, indicata con l'LHS (*LAM Histology Score*), correla con l'intensità di espressione di VEGF-C e con il grado di linfangiogenesi (Kumasaka et al., 2004; Matsui et al., 2001; Glasgow et al., 2009). Inoltre, il VEGF-D, un fattore linfangiogenico, è aumentato nel siero delle pazienti LAM rispetto ai soggetti sani. Tale aumento è maggiore nei casi più gravi e quando è presente un coinvolgimento del sistema linfatico (Glasgow et al., 2009). Il VEGF-D, quindi, potrebbe essere considerato un buon marcatore del coinvolgimento linfatico e un indice della severità e dell'aggressività della malattia (Glasgow et al., 2009).

All'interno del parenchima polmonare degli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC è stato osservato un notevole aumento di vasi sanguigni, oltre a quello di vasi linfatici. Nelle pazienti LAM le cellule patologiche prediligono la via linfatica a quella ematogena, migrando sotto forma di *clusters* circondati da cellule endoteliali linfatiche (Kumasaka et al., 2005). Tuttavia, in alcuni casi, nelle lesioni LAM si osserva un aumento anche della vascolarizzazione ematica che spiegherebbe il quadro osservato nel nostro modello. Nel modello precedentemente creato nel nostro laboratorio somministrando cellule isolate da un angiomiolipoma di una paziente affetta da TSC, cellule TSC2^{-/-} ASM, era stata osservata distruzione cistica e linfangiogenesi polmonare, ma non era mai stato riscontrato un incremento della vascolarizzazione ematica. La somministrazione di cellule LAM/TSC isolate da chilotorace per via endonasale sembra, quindi, in grado di causare alterazioni istopatologiche simili a quelle osservate nella LAM e di creare un quadro LAM più completo rispetto alla somministrazione delle cellule TSC2^{-/-} ASM.

La LAM è una malattia spesso fatale e, ad oggi, non esiste ancora una cura. I trattamenti utilizzati sono essenzialmente di supporto per migliorare il decorso clinico della patologia.

La perdita di funzionalità della proteina tuberina e, di conseguenza, del complesso TSC causa la mancata regolazione di mTOR. La rapamicina, inibendo direttamente l'attività di mTOR, è in grado di mimare il complesso TSC, quindi è considerato il farmaco d'elezione per le cellule con mutazioni nei geni *TSC1* e *TSC2*. La rapamicina (Sirolimus) è un farmaco immunosoppressore che agisce arrestando la progressione delle cellule dalla fase G1 alla fase S attraverso l'interazione di proteine come *FK-binding protein* ed mTOR. Questo porta al blocco di numerose cascate del segnale e all'inibizione di citochine che regolano il ciclo cellulare. Recentemente la ricerca di molti gruppi si è focalizzata sull'utilizzo di rapamicina (sirolimus) e del suo derivato (everolimus) nell'individuazione di una terapia per la LAM e la TSC. Sono stati condotti numerosi trials clinici dove il primo goal è stato quello di dimostrare la capacità del sirolimus e dell'everolimus di ridurre le dimensioni degli angiomiolipomi (Bissler et al., 2008; Kinder et al., 2010). Da questi trials è emerso che il trattamento è in grado di ridurre significativamente il volume delle masse tumorali, ma che la sospensione farmacologica è associata all'aumento graduale delle dimensioni delle masse tumorali fino al raggiungimento delle dimensioni iniziali (Bissler et al., 2008). Per prevenire la ricrescita degli angiomiolipomi la somministrazione di rapamicina è stata protratta per periodi più lunghi evidenziando che, per mantenere l'effetto farmacologico, potrebbe essere necessario un trattamento a lungo termine (Davies et al., 2011). Nelle pazienti LAM, la rapamicina stabilizza le funzionalità polmonari e riduce i livelli sierici di VEGF-D suggerendo che l'inibizione della via di mTOR potrebbe costituire un buon bersaglio terapeutico (McCormack et al., 2011; Taveira-daSilva et al., 2011). Tuttavia, quando il trattamento viene interrotto, le funzionalità polmonari vanno incontro ad un declino progressivo (McCormack et al., 2011). Inoltre, il miglioramento delle manifestazioni polmonari non è stato registrato in tutti i trials e la somministrazione di rapamicina in alcune pazienti è associata, a livello respiratorio, a gravi effetti collaterali che richiedono la sospensione del trattamento (Davies et al., 2011; Neurohr et al., 2011). L'efficacia della rapamicina sulle manifestazioni polmonari richiede, quindi, una riflessione adeguata, pur restando al momento l'unica terapia innovativa valutata nelle pazienti affette da LAM. Nelle cellule precedentemente isolate nel nostro laboratorio, *TSC2*^{-/-} e *TSC2*^{-/meth} ASM, e nelle cellule LAM/TSC la rapamicina ha effetti che concordano con quanto riportato nei trials clinici. In assenza di tuberina la rapamicina risulta efficace nella riduzione del tasso di crescita con un effetto prevalentemente citostatico, ma non

citotossico (Lesma et al., 2005; Lesma et al., 2009). Nel modello murino proposto in questo studio il trattamento con rapamicina è in grado di contenere efficacemente la formazione di cisti polmonari, il grado di linfangiogenesi e la proliferazione cellulare nei polmoni e nei linfonodi. Tuttavia, la rapamicina causa aree di estesa emottisi tissutale e ispessimento delle pareti alveolari. Con la sospensione del trattamento farmacologico si assiste alla regressione della tossicità polmonare e, sebbene senza un significativo aumento della percentuale di spazio aereo alveolare, ad un lieve aumento della linfangiogenesi e del numero di cellule proliferanti. La tossicità polmonare della rapamicina, soprattutto la fibrosi focale e l'emorragia alveolare polmonare, sono effetti collaterali riportati in letteratura che migliorano con la sospensione del farmaco (Pham et al., 2004; Vlahkis et al., 2004).

Le cellule muscolari lisce con mutazioni e perdita di eterozigosità del gene *TSC2* (*TSC2*^{-/-} e *TSC2*^{-/meth} ASM), *in vitro*, sono dipendenti dall'EGF per crescere (Lesma et al., 2005; Lesma et al., 2009). L'EGF e il suo recettore promuovono diversi processi responsabili della crescita e della progressione tumorale quali il differenziamento cellulare, la proliferazione, la migrazione, l'angiogenesi e l'apoptosi (Rocha-lima et al., 2007). Gli anticorpi in grado di bloccare l'EGFR sono efficaci nel trattamento di diverse neoplasie tra cui il cancro colon-rettale, il tumore del polmone non a piccole cellule (NSLC) e il carcinoma a cellule squamose della testa e del collo (Vokes et al., 2006). Il blocco del recettore dell'EGF nelle cellule *TSC2*^{-/-} e *TSC2*^{-/meth} ASM causa l'arresto della proliferazione e la progressiva morte cellulare (Lesma et al., 2005; Lesma et al., 2009). Allo stesso modo, le cellule LAM/TSC sono dipendenti dall'EGF per la sopravvivenza e la proliferazione e sono sensibili al blocco del suo recettore. L'effetto dell'anticorpo anti-EGFR persiste anche in seguito alla sospensione del farmaco. Le cellule vanno incontro a morte in pochi giorni dimostrando che l'efficacia dell'anticorpo anti-EGFR sulla sopravvivenza cellulare è dovuto ad un meccanismo specifico per queste cellule. Infatti, l'azione dell'anticorpo anti-EGFR dipende dalla mancanza di tuberina (Lesma et al., 2008; Lesma et al., 2009). Nel modello sviluppato in questo studio l'azione dell'anticorpo anti-EGFR si esplica riducendo significativamente la proliferazione cellulare nel parenchima polmonare e il danno tissutale causato dalla formazione di cisti. Morfologicamente la distruzione cistica è revertita e la settazione alveolare ritorna simile a quella degli animali controllo. L'anticorpo anti-EGFR agisce anche sul grado di linfangiogenesi, infatti, sia nel linfonodo che nei polmoni la densità dei vasi linfatici è fortemente diminuita. Questi dati dimostrano che l'anticorpo anti-EGFR potrebbe risultare utile nel trattamento della LAM sia per migliorare la funzionalità polmonare sia per contenere la linfangiogenesi. Gli effetti del trattamento con anticorpo anti-EGFR

permangono anche 8 settimane dopo la sospensione farmacologica, infatti, non si osservano nè la formazione di cisti polmonari nè un aumento del grado linfangiogenesi. Tuttavia, è presente un incremento della percentuale delle cellule proliferanti. Ulteriori studi dovrebbero essere condotti per comprendere la causa di tale proliferazione.

La LAM è una malattia che colpisce quasi esclusivamente le donne in età fertile. Come per alcune patologie che colpiscono con un'alta incidenza le donne è stato ipotizzato un ruolo degli estrogeni nella patogenesi della LAM (Yu et al., 2009). La LAM, può essere considerata una malattia ormone-dipendente e, sebbene non sia ancora stato chiarito il ruolo degli ormoni nell'evoluzione della patologia, ci sono numerosi elementi a sostegno di quest'ipotesi. In alcuni casi, la gravidanza e l'utilizzo di contraccettivi orali correlano con una maggior frequenza delle complicanze e un declino delle funzionalità polmonari più rapido (Wahedna et al., 1994; Oberstein et al., 2003; Cohen et al., 2008). Inoltre, *in vitro*, la stimolazione estrogenica influenza la sopravvivenza e la disseminazione delle cellule LAM (Yu et al., 2009). Le cellule LAM sono positive ai recettori degli estrogeni e del progesterone ed entrambi i recettori sono espressi negli angiomiolipomi e nei noduli polmonari delle pazienti con localizzazione a livello nucleare ed espressione a intensità variabile (Berger et al., 2000; Tawfik et al., 1996; Logginidou et al., 2000). I noduli sono caratterizzati da *clusters* di cellule LAM organizzate solitamente a nido d'ape (Matsui et al., 2000). In accordo con questi dati, le cellule LAM/TSC utilizzate in questo studio esprimono i recettori estrogenici (78% delle cellule) e progestinici (100% delle cellule). *In vivo*, mantengono questa positività anche dopo aver invaso il polmone. Inoltre, tra gli animali a cui sono state somministrate le cellule LAM/TSC una buona percentuale presenta la formazione di noduli che sono fortemente positivi ai recettori degli estrogeni e del progesterone. All'interno dei noduli sono state individuate cellule umane e cellule positive alla forma fosforilata di S6 (fortemente espressa nelle cellule LAM) dimostrando che la loro formazione è secondaria alla somministrazione delle cellule LAM/TSC. L'espressione dei recettori estrogenici e progestinici nei noduli polmonari dei topi nudi dopo la somministrazione delle cellule LAM/TSC è simile a quello delle cellule presenti nelle lesioni LAM e negli AML (nucleare a intensità variabile) dimostrando la validità del modello murino per le analogie istologiche con le lesioni delle pazienti. Un altro elemento a sostegno di un ruolo importante degli estrogeni nella patogenesi della LAM è l'insorgenza di leiomiomi uterini nel 38% delle pazienti (Taveira-daSilva et al., 2011). La crescita dei leiomiomi uterini è fortemente correlata con la presenza di estrogeni; in alcuni casi, insorgono durante la gravidanza e colpiscono quasi esclusivamente le donne in età fertile (Taveira-daSilva et al., 2006; Wallach et al., 2004). Come abbiamo

detto precedentemente, le cellule LAM/TSC nel nostro modello sono in grado di migrare a livello uterino, tuttavia, in questa sede non sembrano in grado di causare alterazioni morfologiche. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che per sviluppare e mantenere le caratteristiche di un leiomioma uterino *in vivo* sembra sia necessaria la somministrazione e l'integrazione di estrogeni (Tsuiji et al., 2010). Probabilmente, gli estrogeni endogeni non sono sufficienti a causare una lesione uterina che necessiterebbe di un incremento esogeno dei livelli ormonali. Pur non sviluppando alterazioni morfologiche nell'utero, la presenza delle cellule LAM/TSC suggerisce una correlazione con l'incremento della positività al recettore degli estrogeni e del progesterone. I trattamenti farmacologici con l'anticorpo anti-EGFR o la rapamicina sono efficaci anche a livello uterino nel riportare i valori di espressione dei recettori ormonali a livelli simili al controllo dimostrando la loro capacità d'azione sulle alterazioni causate dalle cellule LAM/TSC. In un recente studio è stato dimostrato che nei leiomiomi uterini delle pazienti LAM è presente un'estesa linfangiogenesi a livello del miometrio (Hayashi et al., 2011). Nel modello sviluppato in questo studio non si osserva lo stesso quadro patologico, infatti, in nessun gruppo sperimentale sono state individuate alterazioni linfatiche. E' possibile che, pur raggiungendo l'utero, le cellule LAM/TSC necessitino di una stimolazione aggiuntiva per indurre alterazioni sia di tipo morfologico che linfatico.

In conclusione possiamo affermare che grazie alla somministrazione delle cellule LAM/TSC per via endonasale è possibile sviluppare un modello di LAM *in vivo*.

Le cellule LAM/TSC sono in grado di migrare in diversi organi quali i polmoni, i linfonodi e l'utero mostrando buone capacità metastatiche. Inoltre, la loro presenza correla con un aumento della linfangiogenesi nel polmone e nei linfonodi e un aumento dell'espressione dei recettori degli estrogeni e del progesterone nell'utero. L'effetto maggiore della somministrazione delle cellule è stato osservato a livello polmonare dove si instaura la distruzione cistica polmonare, un aumento della proliferazione cellulare e della linfangiogenesi e la formazione di noduli positivi ai recettori ormonali creando un quadro istopatologico molto simile a quello osservato nelle pazienti LAM.

La rapamicina è in grado di contenere i danni indotti dalle cellule somministrate anche se causa effetti collaterali a livello polmonare e perde efficacia in seguito all'interruzione del trattamento, in accordo con i risultati riportati nei trials clinici. E' evidente che, seppur la rapamicina resti il farmaco d'elezione, sia necessario individuare dei nuovi bersagli terapeutici da utilizzare eventualmente in combinazione con la rapamicina stessa. Come riportato dagli studi *in vitro*, l'anticorpo anti-EGFR è efficace e specifico nel bloccare la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule LAM/TSC. *In vivo*, agisce

revertendo il danno polmonare, la proliferazione cellulare e la linfangiogenesi senza causare apparenti effetti collaterali e dimostrando buone capacità nell'arrestare l'azione delle cellule LAM/TSC. In base ai dati ottenuti in questo studio possiamo confermare il valore terapeutico dell'anticorpo anti-EGFR sia *in vitro* che *in vivo* sulle cellule tuberina-deficienti e indicare la via Raf/MEK/Erk come efficace bersaglio terapeutico per la LAM e la TSC.

MATERIALI E METODI

MANTENIMENTO E CONTA DELLE CELLULE

TERRENO TYPE II:

DMEM (Euroclone, Milano, Italia)/Ham-F12 (Euroclone) in rapporto 1:1

2×10^{-7} M Idrocortisone (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)

1.6×10^{-6} M FeSO₄ (Sigma-Aldrich)

10 μ M EGF (Sigma-Aldrich)

15% FBS (Euroclone)

1% Streptomicina/ Penicillina (Euroclone)

0.5% Glutamina 200 mM (Euroclone)

PBS 1X:

137 mM NaCl (Sigma-Aldrich)

2.7 mM KCl (Sigma-Aldrich)

1.47 mM KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich)

8.1 mM NaHPO₄ (Sigma-Aldrich)

TRIPSINA-EDTA 0,05% (Euroclone)

Le cellule LAM/TSC sono state mantenute in coltura in terreno *Type II complete* (costituito da DMEM e HAM-F12 in rapporto 1:1 addizionato con il 15% di siero fetale bovino, 2×10^{-7} M Idrocortisone, 1.6×10^{-6} M FeSO₄, 10 μ M EGF, 1% streptomicina/penicillina, 0.5% lutamina 200 mM). Il terreno di coltura è stato cambiato ogni due o tre giorni. Per effettuare la conta cellulare le cellule sono state staccate dalla petri con Tripsina-EDTA 0,05%, raccolte in una provetta sterile e centrifugate a 400 x g per 10 minuti. Eliminato il surnatante le cellule sono state risospese in 1 ml di terreno di coltura e un piccola aliquota (10 μ l) della sospensione cellulare è stata caricata nella camera di conta di Neubauer. Dopo aver contato le cellule dei 4 campi è stata calcolata la media del conteggio.

SOSPENSIONE FARMACOLOGICA IN VITRO

RAPAMICINA (1ng/ml; Rapamune-Sirolimus, Wyeth Europe, Maidenhead, UK)

ANTICORPO anti-EGFR: (clone 225; 5 μ g/ml; Calbiochem, Darmstadt, Germany)

7×10^4 cellule sono state piastrate e, al terreno di coltura, sono stati aggiunti i trattamenti farmacologici. Le cellule LAM/TSC sono state trattate per 6 giorni con anticorpo anti-EGFR alla concentrazione di 5 $\mu\text{g/ml}$ oppure con rapamicina alla concentrazione di 1 ng/ml. Dopo 6 giorni le cellule sono state contate e il trattamento è stato interrotto. Le cellule sono state contate al giorno 8 e al giorno 12.

MARCATURA DELLE CELLULE CON PKH26

FBS (Euroclone)

PBS 1X

PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit for General Cell Membrane Labeling:
(Sigma-Aldrich)

TERRENO TYPE II

FISIOLOGICA

Quando hanno raggiunto la confluenza le cellule sono state lavate con PBS 1x e incubate a 37° C con tripsina-EDTA 0,05% per pochi minuti, quindi staccate dalla petri spipettandole più volte nel terreno di coltura. Una piccola aliquota (10 μl) della sospensione cellulare è stata caricata nella camera di conta di Neubauer e dopo aver contato le cellule dei 4 campi è stata calcolata la media del conteggio (minimo 400 cellule). Dopo la conta, le cellule sono state centrifugate in terreno privo di siero a 400 x g per 5 minuti e lavate 2 volte in PBS 1x. Il surnatante è stato aspirato lasciando circa 25 μl di PBS 1x nei quali sono state risospese le cellule. Alla sospensione cellulare è stato aggiunto il diluente C in una proporzione di circa 500 μl ogni 500.000 cellule e PHK26 alla concentrazione finale di 4×10^{-6} M incubando per 4 minuti a 37°C e agitando di tanto in tanto per favorire la marcatura. La reazione è stata bloccata aggiungendo una quantità di siero pari al volume della sospensione cellulare per 1 minuto a temperatura ambiente, quindi è stata aggiunto terreno standard. Per eliminare la PKH26 in eccesso le cellule sono state centrifugate a 400 x g per 5 minuti e lavate in PBS 1x per 2-3 volte. Al termine dell'ultima centrifugata, il pellet è stato risospeso in 25 μl di fisiologica.

SOMMINISTRAZIONE DELLE CELLULE LAM/TSC IN TOPI NUDI

CLORALIO IDRATO al 4%: (Fluka – Sigma-Aldrich)

Sono stati utilizzati topi Athymic Nude-Fox1^{nu}, topi nudi atimici di sesso femminile (*Harlan Laboratories Italy S.r.l., Milano*) di 3 settimane di vita con un peso medio di circa 10 g. La stabulazione di ogni animale è avvenuta in gabbie singole in condizioni standard, mantenendo una temperatura di 24° C, umidità al 65%, 14 ore di luce programmata e alimentazione basata su pellet secco e acqua. Gli animali sono stati leggermente anestetizzati con cloralio al 4% per via intramuscolare allo scopo di evitare il riflesso della tosse ed è stata somministrata una sospensione cellulare di 25 µl di soluzione fisiologica contenente circa 250.000 cellule marcate con PKH26 per via endonasale. Lo stato di salute degli animali è stato monitorato giornalmente e il sacrificio è avvenuto con un'iniezione letale di cloralio idrato al 4% 30 settimane o 38 settimane dopo la somministrazione delle cellule. Sono stati prelevati trachea, polmoni, linfonodi e utero. Gli organi sono stati immersi subito in paraformaldeide al 4% e in seguito inclusi in paraffina e OCT (optimal cutting tissue).

TRATTAMENTO FARMACOLOGICO DEGLI ANIMALI

RAPAMICINA diluito 1:1 con DMSO (Rapamune-Sirolimus, Wyeth Europe, Maidenhead, UK)

ANTICORPO anti-EGFR (Erbix, Merck, Darmstadt, Germania)

Dopo 26 settimane dalla somministrazione delle cellule, agli animali sono stati trattati due volte a settimana per quattro settimane consecutive con rapamicina o con anticorpo anti-EGFR per via intraperitoneale. Le concentrazioni dei due farmaci sono state decise tenendo conto delle dosi utilizzate nell'uomo. La rapamicina è stata somministrata alla dose di 4 mg/Kg. L'anticorpo anti-EGFR è stato iniettato alla dose di carico di 400 mg/m² e successivamente alla dose di mantenimento di 250 mg/m². Per calcolare la dose dell'anticorpo anti-EGFR è stata utilizzata la seguente formula $0,20247 \times \text{altezza (m)}^{0,725} \times \text{peso (Kg)}^{0,425}$.

Per valutare l'effetto della sospensione del trattamento, un gruppo di animali è stato sacrificato 8 settimane dopo la fine del trattamento farmacologico (38 settimane).

INCLUSIONE IN PARAFFINA

PARAFOLMALDEIDE 4% (Sigma-Aldrich) in PB 0,1M

PB 0,1 M, pH 7,4:

Soluzione A: 0,1 M NaH₂PO₄ (Merk)

Soluzione B: 0,1 M Na₂HPO₄ (Merk)

ETANOLO 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%(VWR BDH Prolabo, Germania)

TOLUOLO 100% (VWR BDH Prolabo)

POLY-D-LISINA (Serva Electrophoresis, Heidelberg, Germania)

Dopo 24 ore in paraformaldeide al 4% gli organi sono stati immersi in PB 0,1 M per 2 ore e quindi in una scala crescente di alcool (70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%) e toluolo (100%) in agitazione costante a 4° C per permettere la disidratazione, poi in una soluzione di toluolo (100%) e paraffina in rapporto 1:1 a 60° C per 1 ora. Infine, sono stati messi in paraffina liquida a 60°C e lasciati solidificare a 4°C. Le sezioni sono state tagliate al microtomo (Leica DSC1) con uno spessore di 5 µm per i polmoni e 8 µm per la trachea, i linfonodi e l'utero e poste su vetrino precedentemente trattato con poli-D-Lisina.

INCLUSIONE IN OCT

PARAFOLMALDEIDE 4% in PB 0,1M (Sigma-Aldrich)

PB 0,1 M, pH 7,4

OCT (Bio-Optica, Milano, Italia)

SACCAROSIO 25% e 30% (Sigma-Aldrich)

POLY-D-LISINA (Serva Electrophoresis)

Per l'inclusione in OCT, dopo 24 ore in paraformaldeide al 4% gli organi sono stati immersi in PB 0,1 M per 1 ora, successivamente in saccarosio 25% per 3 ore a 4°C e , infine, in saccarosio 30% a 4° C fino a precipitazione. I campioni sono stati quindi asciugati, congelati in ghiaccio secco e inclusi in OCT. Le criosezioni sono state tagliate al criostato (Leica CM 1850) con uno spessore di 8 µm e poste su vetrino precedentemente trattato con poli-D-Lisina.

COLORAZIONE CON EMATOSSILINA-EOSINA

XILOLO 100% (VWR BDH Prolabo)

ETANOLO 100%, 85%, 70% (VWR BDH Prolabo)

PBS 0,01 M

SODIO CITRATO 0,01 M (Sigma-Aldrich)

ACIDO CITRICO 0,01M (Sigma-Aldrich)

EMATOSSILINA di MAYER (Fluka- Sigma-Aldrich)

EOSINA (Sigma-Aldrich)

ECOMOUNT (Biocare Medical, Concord, CA, USA)

Per permettere la penetrazione dei coloranti i tessuti sono stati sparaffinati e reidratati tramite una scala decrescente di alcool: xilolo (100%) per 20' e diverse concentrazioni di alcool (100%, 95% e 70%) per 5 minuti, infine passate in acqua deionizzata. Le sezioni sono state lavate in PBS 0,01 M e immerse in una soluzione costituita da sodio citrato e acido citrico (0.01M) a pH 6 mantenendo una temperatura costante di 95°C per 15 minuti per permettere lo smascheramento antigenico. Dopo i lavaggi in PBS 0,01 M e un ulteriore lavaggio in acqua, le sezioni sono state colorate con ematosilina di Mayer per colorare i nuclei. Successivamente sono stati effettuati dei lavaggi in acqua deionizzata e le sezioni sono state colorate con eosina per 5 secondi al termine del quale sono stati ripetuti i lavaggi in acqua deionizzata. Le sezioni sono state immerse per 10 minuti in una scala crescente di alcool al 95% e 100% allo scopo di permettere la differenziazione dei coloranti, quindi in xilolo (100%) per 10 minuti. Alla fine i campioni sono stati montati con Eco Mount.

Utilizzando le sezioni colorate con ematosilina-eosina è stata effettuata un'analisi quantitativa dei vasi sanguigni all'interno del tessuto polmonare. Sono stati considerati 10 campi per ogni gruppo sperimentale all'interno dei quali è stato contato il numero dei vasi linfatici presenti. Il valore è stato espresso come numero di vasi su campo. E' stata calcolata la significatività dei diversi gruppi tramite t di Student considerando significative le differenze per le quali il valore p era inferiore almeno al 0,05.

ANALISI STEREOLOGICA

Lo spazio aereo alveolare è stato valutato tramite analisi stereologica delle immagini riprese al microscopio ottico con un ingrandimento 40x. Per ogni gruppo sperimentale sono state analizzate 10 immagini su cui è stata posta una griglia con righe orizzontali e verticali distanti 2 cm l'una dalle altre. E' stato contato il numero dei punti d'intersezione che cadono nello spazio alveolare mettendolo in rapporto con il numero dei punti d'intersezione totali della griglia. Il rapporto è stato espresso in percentuale. I dati di ogni gruppo sperimentale sono stati analizzati con il test t di Student considerando significative le differenze per le quali il valore P era inferiore almeno a 0,05.

ESTRAZIONE DNA UMANO DA SEZIONI DI PARAFFINA E REAL-TIME PCR

QIAamp DNA FFE Tissue (Quiagen, Hilden, Germany)

Per identificare le cellule umane somministrate negli animali è stata effettuata una Real-Time PCR utilizzando il saggio Taq Man. Sezioni di polmoni e linfonodi incluse in paraffina sono state tagliate con uno spessore di 10 µm e il DNA genomico è stato estratto con il kit QIAamp DNA FFE Tissue (Quiagen). La Real-Time PCR è stata effettuata utilizzando sonda e primer specifici umani per riconoscere una sequenza LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Element) e una sequenza XIST (X Inactive-Specific Transcript).

IMMUNOISTOCHEMICA

XILOLO 100% (VWR BDH Prolabo)

ETANOLO 100%, 85%, 70% (VWR BDH Prolabo)

TBS 10x, pH 7,4, dil 1:10:

NaCl 1,5 M

Tris 200 mM

SODIO CITRATO 0,1 M + ACIDO CITRICO 0,1M, pH 6 dil. 1:10 (Sigma-Aldrich)

Tris-EDTA 0,1M, pH 9, dil. 1:10:

Tris 100mM (Fluka- Sigma-Aldrich)

EDTA 2 mM (Sigma-aldrich)

Triton 1% (Sigma-Aldrich)

NH₄Cl 0,05 M in PBS 0,01 M (Sigma-Aldrich)

TAMPONE DI BLOCCO DEI SITI ASPECIFICI:

TBS 1X

0.2% Triton (Sigma-Aldrich)

3% BSA (Serva Electrophoresis)

ANTICORPI PRIMARI

anti-fosfo-S6 (Ser235/236) (1:50; Cell Signaling Technology, Beverly, MA)

COX IV (1:350; Cell Signaling Technology)

Ki67 (1:70; DAKO, Glostrup, Denmark)

Estrogen Receptor (1:2500; Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA)

Progesterone Receptor (1:2500; Santa Cruz)

HLA-A, B, C (1:50; BD Bioscience, Le Pont-De-Claix Cedex, Francia)

ANTICORPI SECONDARI

anti-coniglio (Pierce, Rockford, IL USA)

anti-topo (Pierce)

SOLUZIONE AVIDINA-BIOTINA per perossidasi:

(ABC Ultrasensitive Peroxidase Staining kit; Pierce, Rockford, IL USA)

1 % BSA (Serva Electrophoresis)

1% Avidina

1% Biotina

TBS 1x

DAB (3, 3'-diaminobenzidine):

(DAB Substrate kit, Pierce)

DAB 10X

Tris 0,1 M, pH 7.4

SOLUZIONE AVIDINA-BIOTINA per fosfatasi alcalina:

(ABC-AP Vector Laboratories, Burlingame, CA)

0,5% Avidina

1% Biotina

TBS 1x

SUBSTRATE III:

(Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate kit, Vector Laboratories)

2% Soluzione 1

2% Soluzione 2

2% Soluzione 3

TrisHCl 100 mM (Fluka- Sigma-Aldrich)

Background Sniper (Biocare Medical)

Rodent Block M (Biocare Medical)

Mouse on mouse AP- polymer (Biocare Medical)

ECOMOUNT (Biocare Medical)

Le analisi immunoistochimiche sono state effettuate seguendo la classica tecnica con avidina-biotina coniugata con fosfatasi alcalina o con perossidasi utilizzando sezioni in paraffina. Le sezioni sono state sparaffinate e reidratate come descritto precedentemente ed è stato effettuato lo smascheramento antigenico con sodio citrato e acido citrico (0,01M, pH 6, 95° C per 20 min) o con Tris-EDTA buffer (pH 9, 95°C per 20 min). Il blocco dei siti aldeidici è avvenuto tramite incubazione con NH₄Cl per 30

minuti e successivamente l'attività perossidasi endogena è stata bloccata utilizzando una soluzione di H₂O₂ e metanolo (in proporzione 1:9) per 20 minuti. Quindi, le sezioni sono state lavate in TBS 1x e incubate per 2h con tampone di blocco a temperatura ambiente. Successivamente sono stati applicati gli anticorpi primari fosfo-S6 (Ser235/236), COX IV, Ki-67, recettore degli estrogeni (ER), recettore del progesterone (PR). Le sezioni sono state lavate per 3 volte in TBS 1x per 5 minuti e incubate con gli anticorpi secondari (1:100) a temperatura ambiente per 2 ore. L'anticorpo secondario utilizzato è stato anti-coniglio o anti-topo coniugato a biotina. Dopo aver effettuato 3 lavaggi in TBS 1x, i tessuti sono stati incubati per 45 minuti con una soluzione contenente avidina-biotina per amplificare il segnale e la visualizzazione dell'antigene è stata effettuata con Vector Red o DAB che in corrispondenza dell'antigene risultano rispettivamente di colore rosso e marrone. Al termine della colorazione i vetrini sono stati controcolorati con ematossilina di Mayer, disidratati con una scala decrescente di alcool (70%, 95%, 100% di etanolo e xilolo al 100%) e montati con Eco Mount.

Per l'anticorpo HLA-A, B, C sono state utilizzate criosezioni. Le criosezioni sono state lavate in TBS 1x ed è stato fatto il blocco dei siti aspecifici e delle IgG murine tramite incubazione con Background Sniper 20 minuti a T ambiente e successivamente con Rodent Block M per altri 20 minuti a T ambiente. In seguito è stato applicato l'anticorpo primario HLA-A,B,C overnight a 4°C in una cameretta umida. Sono stati fatti dei lavaggi con TBS 1x a cui è seguita l'incubazione con l'anticorpo secondario Mouse on mouse AP- polymer per 20 minuti a T ambiente. La visualizzazione dell'antigene è stata effettuata con Vector Red. Al termine della colorazione le sezioni sono state controcolorate con ematossilina di Mayer e i vetrini montati.

QUANTIFICAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE

La proliferazione cellulare è stata valutata all'interno del tessuto polmonare in seguito a marcatura con l'anticorpo Ki67. È stato quantificato il numero di cellule positive a Ki67 in rapporto al numero totale delle cellule presenti nel campo preso in considerazione. Sono stati valutati almeno 10 campi per ogni gruppo sperimentale e il rapporto tra cellule positive e cellule totali è stato espresso in forma percentuale.

ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA DI PCNA

TRIZol (Invitrogen)

SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis kit (Invitrogen)

Per valutare la proliferazione è stata effettuata l'analisi dell'espressione genica dell'mRNA di PCNA.

L'estrazione dell'RNA è stata effettuata dai polmoni degli animali utilizzando il TRIzol. In seguito all'estrazione, la concentrazione dell'RNA è stata quantificata mediante *NanoDrop® ND-100 (Celbio)* per verificare l'assenza di contaminanti e, successivamente, l'RNA totale è stato retro trascritto a cDNA utilizzando il kit *SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis kit*. E' stata quindi effettuata la Real Time PCR utilizzando il saggio TaqMan

QUANTIFICAZIONE POSITIVITA' AL RECETTORE DEGLI ESTROGENI E DEL PROGESTERONE

L'analisi semiquantitativa dell'immunoreattività al recettore degli estrogeni e del progesterone è stata effettuata contando il numero di cellule positive ai recettori in ogni campo preso in considerazione. Per il conteggio cellulare sono stati osservati 10 campi per ogni gruppo sperimentale e il valore finale è stato espresso come numero di cellule positive su campo. I dati di ogni esperimento sono stati analizzati con il test t di Student considerando significative le differenze per le quali il valore P era inferiore a 0,05

IMMUNOFLUORESCENZA SU CELLULE

CYTOSKELFIX (Cytoskeleton, Denver, CO, USA)

PBS 0,01 M

TAMPONE DI BLOCCO DEI SITI ASPECIFICI:

PBS 0,01 M

0.2% Triton (Sigma-Aldrich)

3% BSA (Serva Electrophoresis)

ANTICORPI PRIMARI

Estrogen Receptor (1:250; Santa Cruz)

Progesterone Receptor (1:250; Santa Cruz)

ANTICORPI SECONDARI

Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) (Molecular probes (Invitrogen, Paisley, UK)

DAPI 2 µg/ml: (Sigma-Aldrich)

FLUOR SAVE (Chemicon, Prodotti Gianni, Milano, Italia)

Le cellule sono state piastrate su vetrini. Dopo qualche giorno è stato aspirato il terreno di coltura e sono stati fatti dei lavaggi in PBS 0,01 M. Il vetrino è stato quindi lasciato asciugare e in seguito le cellule sono state permeabilizzate con Cytoskelfix. Per l'immunofluorescenza le cellule sono state incubate per 2 ore a temperatura ambiente con una soluzione di blocco e successivamente incubate con gli anticorpi che riconoscono il recettore degli estrogeni (1:250) e il recettore del progesterone (1:250) a 4°C o.n. Le cellule sono state lavate per 3 volte in PBS 0,01M per 5 minuti e incubate con l'anticorpo secondario legato a FITC, anti-coniglio (1:200) a temperatura ambiente per 2 ore. Dopo aver effettuato nuovamente dei lavaggi in PBS 0,01 M le cellule sono state incubate con DAPI (2 µg/ml) per 10 minuti a temperatura ambiente ed è stato aggiunto Fluor Save. Una volta asciutti i vetrini sono stati osservati al microscopio confocale (LEICA DMIRE2). La quantificazione della positività ai recettori è stata effettuata contando il numero di cellule positive e cellule negative in rapporto al numero totale delle cellule presenti nei campi presi in considerazione. Il risultato è stato espresso in forma percentuale.

IMMUNOFLUORESCENZA SU TESSUTO

SODIO CITRATO 0,1 M + ACIDO CITRICO 0,1M, pH 6 dil. 1:10 (Sigma-Aldrich)

Tris-EDTA 0,1M, pH 9, dil. 1:10:

Tris 100mM (Sigma-Aldrich)

EDTA 2 mM

Triton 1%

NH₄Cl 0,1M in PBS 0,01M (Sigma-Aldrich)

PBS 0,01M

TAMPONE DI BLOCCO:

PBS 0,01 M

Triton (0.1%) (Sigma-Aldrich)

BSA (1.5%)

ANTICORPI PRIMARI

LYVE-1 (5 mg / ml) (R&D systems, Minneapolis, MN)

PROX-1 (1:70, R&D Systems)

CD31 (PECAM-1, clone MEC13.3)(1:50, BD Pharmingen, Heidelberg, Germania)

ANTICORPI SECONDARI

Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG (H+L) (Molecular probes (Invitrogen,

Paisley, UK)

DAPI 2 µg/ml: (Sigma-Aldrich)

FLUOR-SAVE: (Chemicon)

Le sezioni incluse in paraffina sono state sparaffinate, reidratate ed è stato effettuato lo smascheramento antigenico come descritto precedentemente con sodio citrato e acido citrico (0,01 M, pH 6, 95° C per 20 min) o con Tris-EDTA buffer (pH 9, 95°C per 20 min). Il blocco dei siti aldeidici è avvenuto tramite incubazione con NH₄Cl per 30 minuti e successivamente le sezioni sono state lavate in PBS 0,01M. Quindi, le sezioni sono state incubate per 1h con tampone di blocco a temperatura ambiente e con gli anticorpi primari LYVE-1 (5 mg/ml), PROX1 (1:50) o CD31 (1:50) in una cameretta umida o.n. a 4°C. L'incubazione successiva con l'anticorpo secondario anti-capra o anti ratto coniugato alla fluorescina (1:200) è stata fatta per 1h a temperatura ambiente. Le sezioni sono state lavate in PBS 0,01M e incubate con DAPI (2 µg/ml) per 5 minuti a temperatura ambiente. Il montaggio è stato effettuato con qualche goccia di *Fluor Save* e, una volta asciutti, i vetrini sono stati osservati al confocale (LEICA DMIRE2).

ANALISI DENSITA' DEI VASI LINFATICI (LVD)

Per quantificare la linfangiogenesi all'interno dei polmoni degli animali trattati con le cellule LAM/TSC, le immagini delle sezioni, marcate con LYVE-1, sono state acquisite utilizzando un microscopio a fluorescenza (Leica DM 4000 B) con un ingrandimento 5x. L'analisi quantitativa è stata effettuata grazie al programma ImageJ (NIH- National Institute of Health, Bethesda, MD) utilizzando il plug-in "Lymphatic Vessel Analysis Protocol" (LVAP) sviluppato appositamente per analizzare i vasi linfatici (Abramoff et al., 2004). Dopo aver impostato un "horizontal grid line" pari a 5, cliccando con il mouse su un vaso il programma registra automaticamente la conta e la densità dei vasi linfatici. Il programma calcola la densità dei vasi linfatici come il numero totale delle intersezioni tra una linea della griglia orizzontale e un vaso nell'immagine, dividendo per il numero di linee. Il numero finale viene espresso come eventi/campo.

ANALISI SEMIQUANTITATIVA

Per studiare la linfangiogenesi nei linfonodi degli animali trattati con le cellule LAM/TSC, le immagini delle sezioni, marcate con PROX-1, sono state acquisite utilizzando microscopio confocale con obiettivo ad immersione ed ingrandimento a 40x

con un'apertura numerica di 1.25. La sezione ottica di ciascun campione è stata acquisita alle lunghezze d'onda di 488 nm. L'analisi semiquantitativa dell'immunoreattività all'antigene PROX-1 è stata condotta utilizzando il software Adobe Photoshop per valutare la densità ottica media relativa. I dati di ciascun animale sono stati analizzati utilizzando il test di t Student. Sono state considerate significative le differenze per le quali il valore p era inferiore almeno a 0,05.

BIBLIOGRAFIA

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, S.J. **Image Processing with ImageJ**. Biophotonics International, volume 11, issue 7, pp. 36-42, 2004.
- Astrinidis A, Henske EP. **Aberrant cellular differentiation and migration in renal and pulmonary tuberous sclerosis complex**. J Child Neurol. 2004 Sep;19(9):710-5.
- Avila NA, Kelly JA, Chu SC, Dwyer AJ, Moss J. **Lymphangioliomyomatosis: abdominopelvic CT and US findings**. Radiology 2000, 216:147–153.
- Avila NA, Bechtle J, Dwyer AJ, Ferrans VJ, Moss J. **Lymphangioliomyomatosis: CT of diurnal variation of lymphangioliomyomas**. Radiology 2001; 221: 415–421.
- Avila NA, Dwyer AJ, Rabel A, Moss J. **Sporadic lymphangioliomyomatosis and tuberous sclerosis complex with lymphangioliomyomatosis: comparison of CT features**. Radiology. 2007 Jan;242(1):277-85.
- Bajorath J. **Molecular organization, structural features, and ligand binding characteristics of CD44, a highly variable cell surface glycoprotein with multiple functions**. Proteins 2000;39:103–11.
- Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, Jones M, Jackson DG. **LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan**. J Cell Biol 1999, 144:789-801.
- Baselga J. **The EGFR as a target for anticancer therapy—focus on cetuximab**. European Journal of Cancer 2001; 37: S16–S22.
- Benvenuto G, Li S, Brown SJ, Braverman R, Vass WC, Cheadle JP, Halley DJ, Sampson JR, Wienecke R, DeClue JE. **The tuberous sclerosis-1 (TSC1) gene product hamartin suppresses cell growth and augments the expression of the TSC2 product tuberin by inhibiting its ubiquitination**. Oncogene 2000, 19: 6306-16.
- Berger, U., A. Khaghani, A. Pomerance, M. H. Yacoub, and R. C. Coombes. **Pulmonary lymphangioliomyomatosis and steroid receptors: an immunocytochemical study**. Am. J. Clin. Pathol. 93:609–614. 1990
- Bissler JJ, Kingswood JC. **Renal angiomyolipomata**. Kidney Intl 2004;66:924–934.
- Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, Elwing JM, Chuck G, Leonard JM, Schmithorst VJ, Laor T, Brody AS, Bean J, Salisbury S, Franz DN. **Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangioliomyomatosis**. N Engl J Med. 2008 Jan 10; 358(2): 140-51.
- Bittmann I, Dose TB, Muller C, Dienemann H, Vogelmeier C, Lohrs U. **Lymphangioliomyomatosis: recurrence after single lung transplantation**. Hum Pathol 1997, 28:1420–1423.
- Bonetti F, Chiodera PL, Pea M, Martignoni G, Bosi F, Zamboni G, Mariuzzi GM. **Transbronchial biopsy in lymphangiomyomatosis of the lung. HMB45 for diagnosis**. American Journal of Pathology 1993, 17 (11); 1092-102
- Buttram VC Jr, Reiter RC. Uterine leiomyomata: etiology, symptomatology, and management. Fertil Steril 1981;36:433– 45.
- Carbonara C, Longa L, Gross E, Borrone C, Garrè MG, Brisigotti M, Migone N. **9q34 loss of heterozygosity in a tuberous sclerosis astrocytoma suggest a growth suppressor-like activity also for the TSC1 gene**. Hum Mol Genet. 1994 Oct; 3(10): 1829-32.
- Carsillo T, Astrinidis A, Henske EP: **Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary**

- lymphangioliomyomatosis.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 May 23;97(11):6085-90.
- Chang L, Kaipainin A, Folkman J. **Lymphangiogenesis. New mechanisms.** Ann NY Acad Sci 2002;979:111–119.
 - Chu SC, Horiba K, Usuki J, Avila NA, Chen CC, Travis WD, Ferrans VJ, Moss J. **Comprehensive evaluation of 35 patients with lymphangioliomyomatosis.** Chest. 1999 Apr;115(4):1041-52.
 - Clements D, Asprey SL, McCulloch TA, Morris TA, Watson SA, Johnson SR. **Analysis of the oestrogen response in an angiomyolipoma derived xenograft model.** Endocr Relat Cancer. 2009 Mar;16(1):59-72.
 - Cohen MM, Freyer AM, Johnson SR. **Pregnancy experiences among women with lymphangioliomyomatosis.** Respir Med. 2009 May;103(5):766-72.
 - Costello LC, Hartman TE, Ryu JH. **High frequency of pulmonary Lymphangioliomyomatosis in women with tuberous sclerosis complex.** Mayo Clin Proc 2000, 75: 591–594.
 - Crino PB, Nathanson KL, Henske EP.: **The Tuberous Sclerosis Complex.** N Engl J Med 2006, 355: 1345-56.
 - Crooks DM, Pacheco-Rodriguez G, DeCastro RM, McCoy JP, Wang JrJA, Kumaki F, Darling T, and Moss J. **Molecular and genetic analysis of disseminated neoplastic cells in lymphangioliomyomatosis.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004, 101: 17462–17467.
 - Davies DM, de Vries PJ, Johnson SR, McCartney DL, Cox JA, Serra AL, Watson PC, Howe CJ, Doyle T, Pointon K, Cross JJ, Tattersfield AE, Kingswood JC, Sampson JR. **Sirolimus therapy for angiomyolipoma in tuberous sclerosis and sporadic lymphangioliomyomatosis: a phase 2 trial.** Clin Cancer Res. 2011 Jun 15;17(12):4071-81.
 - Ferrans VJ, Yu ZX, Nelson WK, Valencia JC, Tatsuguchi A, Avila NA, Riemenschn W, Matsui K, Travis WD, Moss J. **Lymphangioliomyomatosis (LAM): a review of clinical and morphological features.** J Nippon Med Sch. 2000, 67: 311-329.
 - Folkman J. **Angiogenesis inhibitors. A new class of drugs.** Cancer Biol Ther 2003;2: S127–S133.
 - Glasgow CG, Avila NA, Lin JP, Stylianou MP, Moss J. **Serum vascular endothelial growth factor-D levels in patients with lymphangioliomyomatosis reflect lymphatic involvement.** Chest. 2009 May, 135(5): 1293-300.
 - Glassberg MK, Elliot SJ, Fritz J, Catanuto P, Potier M, Donahue R, Stetler-Stevenson W, Karl M. **Activation of the estrogen receptor contributes to the progression of pulmonary lymphangioliomyomatosis via matrix metalloproteinase-induced cell invasiveness.** J Clin Endocrinol Metab. 2008 May;93(5):1625-33.
 - Goncharova EA, Goncharov DA, Eszterhas A, Hunter DS, Glassberg MK, Yeung RS, Walker CL, Noonan D, Kwiatkowski DJ, Chou MM, Panettieri RA, Krymskaya VP. **Tuberin regulates p70 S6 kinase activation and ribosomal protein S6 phosphorylation. A role for the Tsc2 tumor suppressor gene in pulmonary lymphangioliomyomatosis (LAM).** J Biol Chem 2002; 277:30958–30967.
 - Goncharova EA, Goncharov DA, Lim PN, Noonan D, and Krymskaya VP: **Modulation of Cell Migration and Invasiveness by Tumor Suppressor TSC2 in Lymphangioliomyomatosis.** Am J Respir Cell Mol Biol 2006, 34: 473–480.
 - Goncharova EA, Goncharov DA, Spaits M, Noonan DJ, Talovskaya E, Eszterhas A, Krymskaya VP..**Abnormal growth of smooth muscle-like cells in lymphangioliomyomatosis: role for tumor suppressor TSC2.** Am J Respir Cell

- Mol Biol 2006;34:561–72.
- Goncharova A, Krymskaya VP. **Pulmonary Lymphangiomyomatosis (LAM): Progress and Current Challenger.** Journal of Cellular Biochemistry 2008, 103: 369–382.
 - Haddad LA, Smith N, Bowser M, Niida Y, Murthy V, Gonzalez-Agosti C, Ramesh V. **The TSC1 tumor suppressor hamartin interacts with neurofilament-L and possibly functions as a novel integrator of the neuronal cytoskeleton.** J Biol Chem. 2002 Nov 15, 277(46): 44180-6.
 - Hay N and Sonenberg N: **Upstream and downstream of mTOR.** Genes & Dev. 2004, 18: 1926-1945.
 - Hayashi T, Fleming MV, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Moss J, Ferrans VJ, Travis WD. **Immunohistochemical study of matrix metalloproteinase's (MMPs) and their tissue inhibitors (TIMPs) in pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM).** Human Pathol 1997;28: 1071–1078.
 - Hayashi T, Kumasaka T, Mitani K, Terao Y, Watanabe M, Oide T, Nakatani Y, Hebisawa A, Konno R, Takahashi K, Yao T, Seyama K. **Prevalence of uterine and adnexal involvement in pulmonary lymphangiomyomatosis: a clinicopathologic study of 10 patients.** Am J Surg Pathol. 2011 Dec;35(12):1776-85.
 - Henske EP. **Metastasis of benign tumor cells in tuberous sclerosis complex.** Genes Chromosomes Cancer. 2003 Dec;38(4):376-81. Review.
 - Henske EP. **Tuberous sclerososis and the kidney: from mesenchyme to epithelium, and beyond.** Pediatr Nephrol. 2005; 20(7): 854-857.
 - Hirama M, Atsuta R, Mitani K, Kumasaka T, Gunji Y, Sasaki S, Iwase A, Takahashi K, Seyama K. **Lymphangiomyomatosis diagnosed by immunocytochemical and genetic analysis of lymphangiomyomatosis cell clusters found in chylous pleural effusion.** Intern Med. 2007;46(18):1593-6.
 - Hohman DW, Nogrehkar D, Ratnayake S. **Lymphangiomyomatosis: A review.** Eur J Intern Med. 2008 Jul;19(5):319-24.
 - Holmes GL, Stafstrom CE. **Tuberous sclerosis complex and epilepsy: recent developments and future challenges.** Epilepsia 2007, 48(4): 617-30.
 - Hoon V, Thung SN, Kaneko M, Unger PD. **HMB-45 reactivity in renal angiomyolipoma and lymphangiomyomatosis.** Arch Pathol Lab Med 1994, 118:732-734,
 - Inoki K, Zhu T, Guan KL. **TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival.** Cell 2003, 115: 577-90.
 - Issaka RB, Oommen S, Gupta SK, Liu G, Myers JL, Ryu JH, Vlahakis NE. **Vascular endothelial growth factors C and D induces proliferation of lymphangiomyomatosis cells through autocrine crosstalk with endothelium.** Am J Pathol. 2009 Oct;175(4):1410-20.
 - Ji RC. **Lymphatic endothelial cells, lymphangiogenesis, and extracellular matrix.** Lymphat Res Biol 2006;4:83–100.
 - Johnson NC, Dillard ME, Baluk P, McDonald DM, Harvey NL, Frase SL, Oliver G. **Lymphatic endothelial cell identity is reversible and its maintenance requires Prox1 activity.** Genes Dev. 2008 Dec 1;22(23):3282-91.
 - Johnson SR, Tattersfield AE. **Clinical experience of lymphangiomyomatosis in the UK.** Thorax 2000; 55: 1052–1057.
 - Johnson SR, Whale CI, Hubbard RB, Lewis SA, Tattersfield AE. **Survival and disease progression in UK patients with lymphangiomyomatosis.** Thorax. 2004 Sep;59(9):800-3.
 - Johnson SR. **Lymphangiomyomatosis.** Eur Respir J. 2006, 27; 1056-1065.
 - Johnson SR, Cordier JF, Lazor R, Cottin V, Costabel U, Harari S, Reynaud-

- Gaubert M, Boehler A, Brauner M, Popper H, Bonetti F, Kingswood C; Review Panel of the ERS LAM Task Force. **European Respiratory Society guidelines for the diagnosis and management of lymphangioleiomyomatosis.** *Eur Respir J.* 2010 Jan;35(1):14-26.
- Karbowiczek M, Astrinidis A, Balsara BR, Testa JR, Lium JH, Colby TV, McCormack FX, Henske EP: **Recurrent lymphangioleiomyomatosis after transplantation: genetic analyses reveal a metastatic mechanism.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 167:976–982.
 - Kelly J, Moss J. **Lymphangioleiomyomatosis.** *Am J Med Sci.* 2001 Jan;321(1):17-25.
 - Kenerson HL, Aicher LD, True LD, Yeung RS. **Activated mammalian target of rapamycin pathway in the pathogenesis of tuberous sclerosis complex renal tumors.** *Cancer Res.* 2002 Oct 15;62(20):5645-50.
 - Kenerson H, Dundon TA, Yeung RS. **Effects of rapamycin in the eker rat model of tuberous sclerosis complex.** *Pediatric research* 2005, 57: 67-75.
 - Kinder B, McCormack FX. **Clinical trials for rare lung diseases: lessons from lymphangioleiomyomatosis.** *Lymphat Res Biol.* 2010 Mar;8(1):71-9.
 - Kitaichi M, Nishimura K, Itoh H, Izumi T. **Pulmonary lymphangioleiomyomatosis: a report of 46 patients including a clinicopathologic study of prognostic factors.** *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 527–533.
 - Knudson AG Jr. **Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1971, 68(4): 820-3.
 - Kobayashi T, Hirayama Y, Kobayashi E, Kubo Y, Hino O. **A germline insertion in the tuberous sclerosis (Tsc2) gene gives rise to the Eker rat model of dominantly inherited cancer.** *Nat Genet* 1995, 9:70-74
 - Kobayashi T, Urakami S, Cheadle JP, Aspinwall R, Harris P, Sampson JR, Hino O: **Identification of a leader exon and a core promoter for the rat tuberous sclerosis 2 (Tsc2) gene and structural comparison with the human homolog.** *Mamm Genome* 1997, 8: 554-8.
 - Kobayashi T, Minowa O, Kuno J, Mitani H, Hino O, Noda T. **Renal carcinogenesis, hepatic hemangiomas, and embryonic lethality caused by a germ-line Tsc2 mutation in mice.** *Cancer Res* 1999, 59(6):1206-11.
 - Kobayashi T, Minowa O, Sugitani Y, Takai S, Mitani H, Kobayashi E, Noda T, Hino O. **A germ-line Tsc1 mutation causes tumor development and embryonic lethality that are similar, but not identical to, those caused by Tsc2 mutation in mice.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98(15):8762-7.
 - Krymskaya VP. **Tumour suppressors hamartin and tuberlin: intracellular signaling.** *Cell Signal* 2003, 15(8): 729-39.
 - Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Sato T, Souma S, Kondo T, Hayashi S, Minami M, Uekusa T, Fukuchi Y, Suda K: **Lymphangiogenesis in lymphangioleiomyomatosis.** *Am J Surg Pathol* 2004, 28: 1007-16.
 - Kumasaka T, Seyama K, Mitani K, Souma S, Kashiwagi S, Hebisawa A, Sato T, Kubo H, Gomi K, Shibuya K, et al: **Lymphangiogenesis-mediated shedding of LAM cell clusters as a mechanism for dissemination in lymphangioleiomyomatosis.** *Am J Surg Pathol* 2005;29: 1356–1366.
 - Lamb RF, Roy C, Diefenbach TJ, Vinters HV, Johnson MV, Jay DG, Hall A. **The TSC1 tumor suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho.** *Nat Cell Biol* 2000; 2(5): 281-7.
 - Lesma E, Grande V, Ancona S, Carelli S, Di Giulio AM, Gorio A. **Anti-EGFR antibody efficiently and specifically inhibits human TSC2-/- smooth muscle cell proliferation. Possible treatment options for TSC and LAM.** *PLoS One.* 2008;3(10):e3558.

- Lesma E, Grande V, Carelli S, Brancaccio D, Canevini MP, Alfano RM, Coggi G, Di Giulio AM, Gorio A. **Isolation and growth of smooth muscle-like cells derived from tuberous sclerosis complex-2 human renal angiomyolipoma: epidermal growth factor is the required growth factor.** *Am J Pathol.* 2005 Oct;167(4):1093-103.
- Lesma E, Sirchia SM, Ancona S, Carelli S, Bosari S, Ghelma F, Montanari E, Di Giulio AM, Gorio A. **The methylation of the TSC2 promoter underlies the abnormal growth of TSC2 angiomyolipoma-derived smooth muscle cells.** *Am J Pathol.* 2009 Jun;174(6):2150-9.
- Leung AKC, Robson LM. **Tuberous Sclerosis Complex: A Review.** *J Pediatr Health Care.* 2007; 21, 108-114.
- Logginidou H, Ao X, Russo I, Henske EP. **Frequent estrogen and progesterone receptor immunoreactivity in renal angiomyolipomas from women with pulmonary lymphangiomyomatosis.** *Chest* 2000, 117: 25–30.
- Maheshwar MM, Sandford R, Nellist M, Cheadle JP, Sgotto B, Vaudin M, Sampson JR. **Comparative analysis and genomic structure of the tuberous sclerosis 2 (TSC2) gene in human and pufferfish.** *Hum Mol Genet* 1996, 5:131–137.
- Marhaba R, Zoller M. **CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation.** *J Mol Histol* 2004;35:211–31.
- Matsui K, Tatsuguchi A, Valencia J, Yu Z, Bechtle J, Beasley MB, Avila N, Travis WD, Moss J, Ferrans VJ. **Extrapulmonary lymphangiomyomatosis (LAM): clinicopathologic features in 22 cases.** *Hum Pathol* 2000, 31:1242–1248.
- Matsui K, Beasley MB, Nelson WK, Barnes PM, Bechtle J, Falk R, Ferrans VJ, Moss J, Travis WD. **Prognostic significance of pulmonary lymphangiomyomatosis histologic score.** *Am J Surg Pathol.* 2001 Apr;25(4):479-84.
- Matsumoto Y, Horiba K, Usuki J, Chu SC, Ferrans VJ, Moss J. **Markers of cell proliferation and expression of melanosomal antigen in lymphangiomyomatosis.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999, 21: 327-336.
- McCormack FX, Inoue Y, Moss J, Singer LG, Strange C, Nakata K, Barker AF, Chapman JT, Brantly ML, Stocks JM, Brown KK, Lynch JP 3rd, Goldberg HJ, Young LR, Kinder BW, Downey GP, Sullivan EJ, Colby TV, McKay RT, Cohen MM, Korbee L, Taveira-DaSilva AM, Lee HS, Krischer JP, Trapnell BC; **Efficacy and safety of sirolimus in lymphangiomyomatosis.** National Institutes of Health Rare Lung Diseases Consortium; MILES Trial Group. *N Engl J Med.* 2011 Apr 28;364(17):1595-606.
- Meikle L, Talos DM, Onda H, Pollizzi K, Rotenberg A, Sahin M, Jensen FE, Kwiatkowski DJ. **A mouse model of tuberous sclerosis: neuronal loss of Tsc1 causes dysplastic and ectopic neurons, reduced myelination, seizure activity, and limited survival.** *Neurosci* 2007, 27(21):5546-58.
- Mielgo A, van Driel M, Bloem A, Landmann L, Gunthert U. **A novel antiapoptotic mechanism based on interference of Fas signaling by CD44 variant isoforms.** *Cell Death Differ* 2006;13:465–77.
- Mitani K, Kumasaka T, Takemura H, Hayashi T, Gunji Y, Kunogi M, Akiyoshi T, Takahashi K, Suda K, Seyama K. **Cytologic, immunocytochemical and ultrastructural characterization of lymphangiomyomatosis cell clusters in chylous effusions of patients with lymphangiomyomatosis.** *Acta Cytol.* 2009 Jul-Aug;53(4):402-9.
- Nellist M, van Slegtenhorst MA, Goedbloed M, van den Ouweland AMW, Halley DJJ, van der Sluijs P. **Characterization of the cytosolic tuberin-hamartin complex. tuberin is a cytosolic chaperone for hamartin.** *J Biol Chem* 1999;274: 35647– 52.

- Neurohr C, Hoffmann AL, Huppmann P, Herrera VA, Ihle F, Leuschner S, von Wulffen W, Meis T, Baezner C, Leuchte H, Baumgartner R, Zimmermann G, Behr J. **Is sirolimus a therapeutic option for patients with progressive pulmonary lymphangiomyomatosis?** *Respir Res.* 2011 May 21;12:66
- Nine JS, Yousem SA, Paradis IL, Keenan R, Griffith BP. **Lymphangiomyomatosis: recurrence after lung transplantation.** *J Heart Lung Transplant* 1994, 13:714–719.
- O'Brien JD, Lium JH, Parosa JF, Deyoung BR, Wick MR, Trulock EP. **Lymphangiomyomatosis recurrence in the allograft after single-lung transplantation.** *Am J Respir Crit Care Med* 1995, 151:2033–2036.
- Oberstein EM, Fleming LE, Gomez-Marin O, Glassberg MK. **Pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM): examining oral contraceptive pills and the onset of disease.** *J Womens Health (Larchmt)* 2003, 12:81–85.
- Onda H, Lueck A, Marks PW, Warren HB, Kwiatkowski DJ. **TSC2^{+/-} mice develop tumors in multiple sites which express gelsolin and are influenced by genetic background.** *J Clin Invest* 1999, 104: 687-95.
- Pacheco-Rodriguez G, Steagall WK, Crooks DM, Stevens LA, Hashimoto H, Li S, Wang JA, Darling TN, Moss J. **TSC2 loss in lymphangiomyomatosis cells correlated with expression of CD44v6, a molecular determinant of metastasis.** *Cancer Res.* 2007 Nov 1, 67(21): 10573-81.
- Pacheco-Rodriguez G, Kumaki F, Steagall WK, Zhang Y, Ikeda Y, Lin JP, Billings EM, Moss J. **Chemokine-enhanced chemotaxis of lymphangiomyomatosis cells with mutations in the tumor suppressor TSC2 gene.** *J Immunol.* 2009 Feb 1, 182(3):1270-7.
- Petrova TV, Mäkinen T, Mäkelä TP, Saarela J, Virtanen I, Ferrell RE, Finegold DN, Kerjaschki D, Ylä-Herttuala S, Alitalo K. **Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor.** *EMBO J.* 2002 Sep 2;21(17):4593-9.
- Pham PT, Pham PC, Danovitch GM, Ross DJ, Gritsch HA, Kendrick EA, Singer J, Shah T, Wilkinson AH. **Sirolimus-associated pulmonary toxicity.** *Transplantation.* 2004 Apr 27;77(8):1215-20.
- Plank TL, Yeung RS, Henske EP. **Hamartin, the product of the tuberous sclerosis 1 (TSC1) gene, interacts with tuberlin and appears to be localized to cytoplasmic vesicles.** *Cancer Res* 1998, 58: 4766–4770.
- Pollizzi K, Malinowska-Kolodziej I, Stumm M, Lane H, Kwiatkowski D. **Equivalent benefit of mTORC1 blockade and combined PI3K-mTOR blockade in a mouse model of tuberous sclerosis.** *Mol Cancer.* 2009 Jun 15; 8: 38.
- Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. **CD44: from adhesion molecules to signalling regulators.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:33–45.
- Roach ES, Sparagana SP: **Diagnosis of tuberous sclerosis complex.** *Journal of Child Neurology* 2004, 19: 643-649.
- Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, and Singal R. **EGFR Targeting of Solid Tumors.** *Cancer Control* July 2007, 14(3); 295-304.
- Ryu JH, Moss J, Beck GJ, et al. **The NHLBI Lymphangiomyomatosis Registry: Characteristics of 230 patients at enrollment.** *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:105–111.
- Sato T, Seyama K, Fujii H, Maruyama H, Setoguchi Y, Iwakami S, Fukuchi Y, Hino O: **Mutation analysis of the TSC1 and TSC2 genes in Japanese patients with pulmonary lymphangiomyomatosis.** *J Hum Genet* 2002, 47:20–28.
- Schiavina M, Contini P, Fabiani A, Cinelli F, Di Scioscio V, Zompatori M, Campidelli C, Pileri SA. **Efficacy of hormonal manipulation in lymphangiomyomatosis. A 20-year-experience in 36 patients.** *Sarcoidosis*

- Vasc Diffuse Lung Dis. 2007 Mar;24(1):39-50.
- Seaman DM, Meyer CA, Gilman MD, McCormack FX. **Diffuse cystic lung disease at high-resolution CT.** AJR Am J Roentgenol. 2011 Jun;196(6):1305-11.
 - Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. **Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress.** Mol Cell 2010; 40:310-22.
 - Seyama K, Kumasaka T, Souma S, Sato T, Kurihara M, Mitani K, Tominaga S, Fukuchi Y: **Vascular endothelial growth factor-D is increased in serum of patients with lymphangiomyomatosis.** Lymphat Res Bio 2006, 4: 143-52.
 - Seyama K, Kumasaka T, Kurihara M, Mitani K, Sato T. **Lymphangiomyomatosis: a disease involving the lymphatic system.** Lymphat Res Biol. 2010 Mar;8(1):21-31.
 - Smolarek TA, Wessner LL, McCormack FX, Mylet JC, Menon AG, Henske EP. **Evidence that lymphangiomyomatosis is caused by TSC2 mutations: chromosome 16p13 loss of heterozygosity in angiomyolipomas and lymph nodes from women with lymphangiomyomatosis.** Am J Hum Genet 1998, 62:810–815
 - Sooriakumaran P, Gibbs P, Coughlin G, Attard V, Elmslie F, Kingswood C, Taylor J, Corbishley C, Patel U, Anderson C. **Angiomyolipomata: Challenges, solutions, and future prospects based on over 100 cases treated.** BJU Int. 2009 Jun 2. 101-106
 - Sweeney, SM. **Pediatric dermatologic surgery: A surgical approach to the cutaneous features of tuberous sclerosis complex.** Advances in Dermatology 2004, 20: 117-135.
 - Taveira-DaSilva AM, Steagall WK, Moss J: **Lymphangiomyomatosis.** Cancer Control 2006, 13: 276-85.
 - Taveira-daSilva A, Pacheco-Rodriguez G, Moss J. **The natural history of lymphangiomyomatosis: markers of severity, rate of progression and prognosis.** Lymphat Res Biol. 2010, 8 (1); 9-19.
 - Taveira-DaSilva AM, Hathaway O, Stylianou M, Moss J. **Changes in lung function and chyloous effusions in patients with lymphangiomyomatosis treated with sirolimus.** Ann Intern Med. 2011 Jun 21;154(12):797-805, W-292-3.
 - Taveira-DaSilva AM, Rabel A, Gochuico BR, Avila NA, Moss J. **Prevalence of uterine leiomyomas in lymphangiomyomatosis.** Fertil Steril. 2011 Sep;96(3):711-714.e1
 - Tawfik O, Austenfeld M, Persons D. **Multicentric renal angiomyolipoma associated with pulmonary lymphangiomyomatosis: case report, with histologic, immunohistochemical, and DNA content analyses.** Urology. 1996 Sep;48(3):476-80.
 - Taylor JR, Ryu J, Colby TV, Raffin TA. **Lymphangiomyomatosis. Clinical course in 32 patients.** N Engl J Med 1990; 323: 1254–1260.
 - Tsuiji K, Takeda T, Li B, Kondo A, Ito M, Yaegashi N. **Establishment of a novel xenograft model for human uterine leiomyoma in immunodeficient mice.** Tohoku J Exp Med. 2010;222(1):55-61.
 - Uhlmann EJ, Wong M, Baldwin RL, Bajenaru ML, Onda H, Kwiatkowski DJ, Ya K, Gutmann DH. **Astrocyte-specific TSC1 conditional knockout mice exhibit abnormal neuronal organization and seizures.** Ann Neurol 2002, 52(3):285-96.
 - Urban T, Lazor R, Lacronique J, Murriss M, Labrune S, Valeyre D, Cordier JF. **Pulmonary lymphangiomyomatosis. A study of 69 patients.** Groupe d'Etudes et de Recherche sur les Maladies "Orphelines" Pulmonaires (GERM"O" P). Medicine (Baltimore) 1999; 78: 321–337.
 - Van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, Cheadle JP, Snell RG, van den Ouweland AMW, Reuser AJJ, Sampson JR, Halley DJJ, and van der Sluijs P.

- Interaction between hamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products.** Hum. Mol. Genet 1998, 7: 1053–1057.
- Vokes EE, Chu E. **Anti-EGFR therapies: clinical experience in colorectal, lung, and head and neck cancers.** Oncology 2006, 20:15-25.
 - Voulgari A, Pintzas A. **Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic.** Biochim Biophys Acta. 2009 Dec;1796(2):75-90.
 - Wahedna I, Cooper S, Williams J, Paterson IC, Britton JR, Tattersfield AE. **Relation of pulmonary lymphangio-leiomyomatosis to use of the oral contraceptive pill and fertility in the UK: a national case control study.** Thorax 1994, 49:910–914.
 - Walker CL, Hunter D, Everitt JI: **Uterine leiomyoma in the Eker rat: a unique model for important diseases of woman.** Genes, Chromosomes Cancer 2003, 38: 349-56.
 - Wallach EE, Vlahos NF. **Uterine myomas: an overview of development, clinical features, and management.** Obstet Gynecol. 2004 Aug;104(2):393-406. Review
 - Wigle JT, Oliver G. **Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system.** Cell. 1999 Sep 17;98(6):769-78.
 - Vlahakis NE, Rickman OB, Morgenthaler T. **Sirolimus-associated diffuse alveolar hemorrhage.** Mayo Clin Proc 2004, 79: 541-545
 - Young LR, Inoue Y, McCormack FX. **Diagnostic potential of serum VEGF-D for lymphangiomyomatosis.** N Engl J Med. 2008 Jan 10;358(2):199-200.
 - Yu J, Astrinidis A, Henske EP. **Chromosome 16 loss of heterozygosity in tuberous sclerosis and sporadic lymphangiomyomatosis.** Am J Respir Crit Care Med 2001, 164: 1537–1540.
 - Yu JJ, Robb VA, Morrison TA, Ariazi EA, Karbowniczek M, Astrinidis A, Wang C, Hernandez-Cuebas L, Seeholzer LF, Nicolas E, Hensley H, Jordan VC, Walker CL, Henske EP. **Estrogen promotes the survival and pulmonary metastasis of tuberlin-null cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Feb 24; 106(8): 2635-40.