



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PALERMO

*Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (BioNeC)*  
*Dottorato di ricerca in Oncobiologia Sperimentale*

*Coordinatore Prof.ssa Renza Vento*

**Valutazione degli effetti del  
dimetilamino-partenolide (DMAPT)  
*in vivo* in xenotrapianti di cellule di carcinoma  
mammario MDA-MB231**

**(SSD BIO/10 - Biochimica)**

Candidato

Dr.ssa Santina Di Bella

Tutor

Prof.ssa Renza Vento

Co-Tutors

Dr.ssa Annalisa Guercio

*(Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia)*

Prof.ssa Marianna Lauricella

Il Coordinatore del Dottorato

Prof.ssa Renza Vento

**Triennio 2011-2013-Ciclo XXIV**

## INDICE

<b>INTRODUZIONE</b>	<b>pag. 1</b>
Il carcinoma mammario	pag. 2
Modelli animali e cellule MDA-MB231	pag. 14
Il Partenolide ed il suo derivato dimetilamino-partenolide (DMAPT)	pag. 20
Obiettivi della tesi	pag. 34
<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>pag. 38</b>
Condizioni di coltura delle cellule MDA-MB231	pag. 39
Composti chimici utilizzati	pag. 40
Vitalità cellulare: test MTT	pag. 41
Misura dei ROS intracellulari	pag. 42
Preparazione degli estratti cellulari e separazione mediante	
SDS-PAGE	pag. 43
Western blotting	pag. 45
Saggio di migrazione cellulare - Scratch wound healing assay	pag. 46
Animali utilizzati per gli esperimenti <i>in vivo</i>	pag. 47
Prove di tumorigenicità <i>in vivo</i>	pag. 48
Prove di efficacia antitumorale del DMAPT	pag. 49
Istologia - Colorazione ematossilina - eosina	pag. 51
Immunoistochimica	pag. 52

<b>RISULTATI</b>	<b>pag. 55</b>
Effetti citotossici del Partenolide e del DMAPT in cellule MDA-MB231 in coltura	pag. 56
Il DMAPT determina produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in cellule MDA-MB231 in coltura	pag. 59
Effetto del trattamento con DMAPT su p65 e JNK fosforilato in cellule MDA-MB231 in coltura	pag. 61
Il DMAPT inibisce la capacità di migrazione delle cellule MDA-MB231 in coltura	pag. 63
Tumorigenicità delle cellule MDA-MB231 in topi immunodepressi	pag. 65
Effetti del DMAPT sulla crescita dei noduli tumorali e sulla sopravvivenza degli animali trattati	pag. 70
Valutazione degli effetti del DMAPT sui noduli tumorali	pag. 73
Effetto del DMAPT sulle metastasi	pag. 76
<b>DISCUSSIONE</b>	<b>pag. 78</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>pag. 89</b>

# **INTRODUZIONE**

## **Il carcinoma mammario**

Il carcinoma della mammella rappresenta la neoplasia più frequente nella donna e la seconda causa di morte dopo il tumore del polmone. Miglioramenti in termini di sopravvivenza sono stati ottenuti grazie a vari programmi di screening. Ogni anno in Italia si registrano circa 35000 nuovi casi e 11000 decessi. L'incidenza della malattia presenta un netto gradiente tra Nord, Centro e Sud con rischi superiori del 40% al Nord. Nel recente quinquennio, l'incidenza ha mostrato un aumento variabile dal 2 al 17% (*Linee guida AIOM, 2013*) a fronte di una netta diminuzione in mortalità grazie agli avanzamenti ottenuti nella diagnosi precoce e nella strategia terapeutica adiuvante. Tuttavia circa il 20-30% delle pazienti con linfonodi negativi ed il 50% di quelle con linfonodi positivi alla diagnosi sviluppa metastasi a distanza, mentre il 7-10% presenta uno stadio avanzato già al momento della diagnosi. Ad eccezione di casi sporadici (2-3%) in cui è stata osservata una sopravvivenza di lunga durata, il tumore mammario metastatico rimane, ad oggi, una malattia non guaribile, con una sopravvivenza media nelle pazienti non precedentemente trattate di 18-24 mesi, variabile in base all'aggressività biologica, alla sede e all'estensione della malattia (*Crossen J. A. et al., 2008; Mauri D. et al., 2008*).

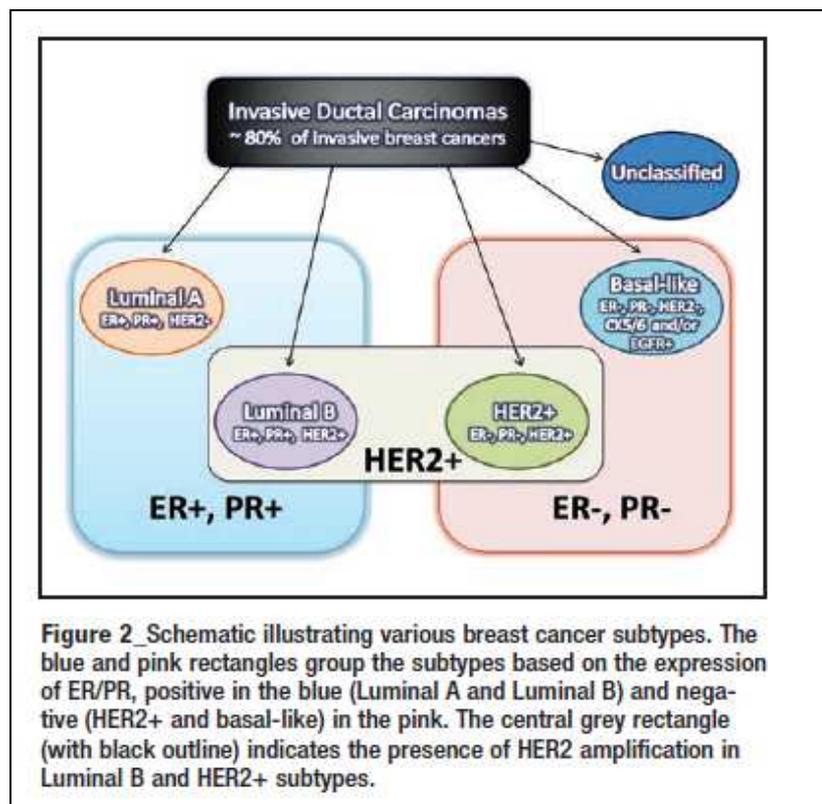
I carcinomi della mammella rappresentano un gruppo molto eterogeneo di neoplasie dal punto di vista morfologico, prognostico e della risposta alla terapia. Essi sono stati in genere definiti e classificati in base a caratteristiche cliniche e patologiche; età, dimensioni del tumore, coinvolgimento di noduli ascellari, invasione angio-linfatica, grado istologico, stato dei recettori ormonali e amplificazione di ERBB2 (noto anche come HER-2/neu).

Per molti anni, le neoplasie della mammella sono state caratterizzate in base alla dimensione del tumore. Tuttavia, questa classificazione si è dimostrata limitante per l'incapacità di definire sottogruppi che condividono aspetti prognostici e terapeutici simili.

In seguito, è stato sviluppato un sistema di classificazione che ha permesso di suddividere il carcinoma mammario in sottogruppi distinti in base all'aspetto istologico del tumore (*Weigelt B. et al., 2008*).

Attualmente il sistema di classificazione più utilizzato si basa su una combinazione di informazioni isto-morfologiche (come sottotipo istologico e grading) e sulla stadiazione TNM che valuta l'estensione del tumore primario (fattore T), l'estensione del coinvolgimento linfonodale (fattore N) e le metastasi a distanza (fattore M) (*Elston E. W. et al., 1993; Sobin L. H. et al., 2009*).

La spiccata eterogeneità del carcinoma mammario è stata confermata dallo studio del profilo dell'espressione genica che ha rivelato, sulla base di esperimenti di DNA microarray, come ogni singolo carcinoma mammario abbia un suo preciso ed unico assetto molecolare (Sorlie T. et al., 2003). Nonostante questa grande variabilità, le neoplasie della mammella si possono ricondurre a cinque principali categorie: luminale A, luminale B, carcinoma mammario HER-2-positivo, *normal-like* e *basal-like* (Figura 1) (Sorlie T. et al., 2001).



Sandhu R. et al. *LabMedicine*. 41: 6364-372. (2010). **Figura 1 della tesi.**

Questi sottotipi sono associati a prognosi e possibilità di trattamento distinte e riflettono i pattern d'espressione genica dei due tipi principali di cellule della mammella adulta: le cellule luminali disposte in un unico strato verso il lume dei lobuli e le cellule mioepiteliali, poste all'esterno a circondare le luminali e che poggiano direttamente sulla membrana basale (*Perou C. M., 2011*).

I carcinomi luminali sono così definiti per l'espressione di citochine luminali come CK8 e CK18; sono positivi ai recettori degli estrogeni (ER) e del progesterone (PR) e rappresentano circa il 70% dei carcinomi invasivi della mammella. I carcinomi luminali possono essere distinti in due sottogruppi rispettivamente: luminali A (caratterizzati da alti livelli di espressione dei recettori estrogenici, bassi livelli di espressione di geni associati alla replicazione, assenza di espressione di HER-2 e basso indice di proliferazione cellulare) e luminali B (caratterizzati da bassi livelli d'espressione dei recettori estrogenici, alti livelli d'espressione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare ed iperespressione di HER-2) (*Perou C. M. et al., 2000; Sorlie T. et al., 2001; Cheang M. C. U. et al., 2009*).

I tumori HER-2 comprendono circa il 10-15% dei carcinomi invasivi; sono rappresentati da neoplasie di alto grado, linfonodo positivi, caratterizzati

dall'espressione di HER-2 e di altri geni come GRB7 e GATA4 (*Sorlie T. et al., 2001*).

I carcinomi *normal-like* comprendono il 5-10% di tutti i carcinomi della mammella ed esprimono geni caratteristici del tessuto adiposo.

I carcinomi basali detti anche basaloidi, *basal-like*, o carcinomi a fenotipo basale, costituiscono il 10-20% dei carcinomi invasivi della mammella e sono caratterizzati dall'espressione di citocheratine CK5, CK6, CK17, presenti nello strato basale/mioepiteliale della ghiandola normale (*Cheang M. C. U. et al., 2008; Rakha E. A. et al., 2008; Choo J. R. et al., 2010*).

Frequentemente i carcinomi basali hanno un assetto sovrapponibile ai carcinomi cosiddetti "tripoli negativi" ovvero negativi ai recettori ER, PR ed HER-2 (*Bauer K. R. et al., 2007*). Le forme di carcinoma triplo negativo presentano caratteristiche comuni: sono più frequenti nelle giovani donne, in quelle di origine africana ed in quelle obese, sono legate ai geni che regolano la suscettibilità all'insorgenza del carcinoma mammario (come BRCA-1 e BRCA-2), sono scarsamente differenziate, altamente maligne e molto aggressive, con una cattiva prognosi e con un'elevata probabilità di sviluppare metastasi a distanza (fegato, sistema nervoso centrale e polmone); presentano alterazioni nell'espressione di proteine, oncogeni ed oncosoppressori coinvolti in diversi pathways che regolano la proliferazione, la crescita cellulare e l'apoptosi (*Bosh A. et al., 2010; Reis-*

*Filho J. S. et al., 2008; Chen J. Q. et al., 2009; de Ruijter T.C. et al., 2011; Dey N. et al., 2012*). Le forme di carcinoma triplo negativo condividono specifiche caratteristiche morfologiche che includono mitosi elevata, necrosi tumorale, risposta linfocitaria stromale ed un elevato rapporto nucleo/citoplasma. Dal punto di vista istologico sono generalmente carcinomi duttali invasivi di grado 3, anche se esistono rare forme metaplastiche e midollari (*Bosh A. et al., 2010*).

Il carcinoma triplo negativo, a causa della mancata espressione dei recettori ER, PR e HER-2, non è sensibile alle terapie mirate contro tali recettori ed a quelle ormonali e nonostante risponda alla chemioterapia presenta, comunque, un'elevata probabilità di recidiva in pazienti con malattia residua (*Rouzier R. et al., 2005; Dent R. et al., 2007; Carey L. A. et al., 2007*).

Le opzioni terapeutiche neoadiuvanti per il trattamento di tali forme tumorali possono essere divise in due gruppi: agenti citotossici e terapie mirate. Gli agenti citotossici determinano il danneggiamento del DNA in tutte le cellule in divisione. Cellule che si dividono velocemente, come le cellule tumorali, sono più sensibili alla terapia citotossica; così anche cellule normali ad alto tasso replicativo, come le cellule del sangue. Questo è il motivo per cui gli agenti citotossici spesso determinano numerosi effetti collaterali negativi. Gli effetti a breve termine degli agenti citotossici sono

maggiori nelle forme di carcinoma mammario triplo negativo piuttosto che in altri sottotipi (*Carey L. A. et al., 2007*). Le pazienti mostrano alti tassi di risposta completa rispetto a pazienti con altre forme di neoplasie mammarie, soprattutto a taxani ed antracicline (*Carey L. A et al., 2007; Hugh J. et al., 2009; Oakman C. et al., 2011*).

Altri agenti citotossici sono quelli contenenti platino, come ad esempio cisplatino e carboplatino (*Tan A. R. et al., 2008*). Questi inducono i loro effetti attraverso lo sviluppo di addotti covalenti con il DNA e determinano il blocco della replicazione cellulare (*Oakman C. et al., 2011*).

Le terapie mirate hanno come target biomolecole che rappresentano una caratteristica specifica della cellula cancerosa come ad esempio un recettore overespresso che determina la selettività del trattamento verso le cellule maligne e la mancata efficacia sulle cellule normali (*Tan A. R. et al., 2008*).

L'Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) è overespresso in circa il 45-70% delle forme di carcinoma mammario triplo negativo; pertanto, l'inibizione di questo target rappresenta un possibile approccio terapeutico. EGFR stimola la replicazione cellulare in modo simile ad HER-2. Se utilizzato come target terapeutico, l'effetto stimolatorio di EGFR potrebbe diminuire e determinare un arresto della crescita tumorale o una regressione del tumore. EGFR può essere il bersaglio di due tipi di agenti:

anticorpi monoclonali e piccole molecole inibitrici delle tirosina chinasi. Cetuximab è un anticorpo monoclonale chimerico capace di inibire il dominio extracellulare di EGFR, bloccando così il legame del ligando e l'internalizzazione del recettore: esso è in fase di sperimentazione nell'ambito del carcinoma triplo negativo metastatico. Gefitinib (Iressa) e l'Erlotinib (Tarceva) inibiscono il dominio tirosina-chinasi dell'EGFR rendendo inattivo il recettore (*Rocha-Lima C. M. et al., 2007; Bayraktar S. et al., 2013*).

Di notevole interesse terapeutico si è rivelato, inoltre, l'impiego dei micro-RNAs (miRNAs), una classe di piccoli RNA non codificanti che regolano l'espressione proteica a livello post-trascrizionale; essi, infatti, interagiscono con gli mRNA e ne determinano l'inibizione della traduzione o la degradazione. In particolare, è stato osservato che la regione non tradotta al 3' dell'mRNA codificante l'EGFR contiene tre putativi siti target del microRNA-7. Studi condotti da Webster hanno dimostrato che l'impiego del microRNA-7 causa il decremento di EGFR in linee cellulari di carcinoma al seno ed al polmone, inducendo l'arresto del ciclo cellulare e la morte cellulare (*Webster R. J. et al., 2009; Rocha-Lima C. M. et al., 2007*).

L'angiogenesi è un meccanismo fondamentale nella crescita tumorale, pertanto, lo sviluppo di farmaci che colpiscono i meccanismi cellulari

coinvolti nella neoangiogenesi è una delle priorità di ricerca. Tra i composti antiangiogenici, Bevacizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato contro il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF). Il targeting e l'inibizione della formazione di vasi sanguigni hanno l'obiettivo di interrompere la creazione dell'ambiente che le cellule tumorali inducono per ricevere ossigeno e sostanze nutritive di cui hanno bisogno per sopravvivere ed interagire tra loro (*Perez E. A. et al., 2010; Bayraktar S. et al., 2013*).

Anche gli inibitori della Poli (ADP-ribosio) polimerasi-1 (PARP1) trovano impiego in diversi trials clinici. La PARP è un enzima che segnala la presenza di danno al DNA e ne facilita la riparazione. L'inibizione di tale enzima durante la fase S del ciclo cellulare induce la formazione di filamenti singoli di DNA interrotti che portano all'arresto della forza di replicazione che a sua volta provoca rotture nel DNA a doppio filamento. Questi cambiamenti possono causare riarrangiamenti dei cromatidi e quindi provocare l'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M ed apoptosi. Tra gli inibitori della PARP, l'Olaparib (AZD2281) e il BSI-201 sembrano possedere una certa efficacia. Sono in corso, inoltre, diversi studi per valutare l'efficacia di combinazioni di composti neoadiuvanti, come l'associazione tra Cisplatino con l'Olaparib e l'associazione del

Carboplatino con il BSI-201 (*Perez E. A. et al., 2010; Bayraktar S. et al., 2013*).

Alcune forme di carcinoma mammario triplo negativo mostrano un'iperattivazione della proteina mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), un target delle chinasi PI3K/PKB, che regola positivamente la progressione del ciclo cellulare. Pertanto, l'inibizione di mTOR mediante macrolidi analoghi alla Rapamicina, come l'Everolimus ed il Temsirolimus, sono oggetto di studio in diversi trials clinici in combinazione con la chemioterapia (*Bayraktar S. et al., 2013*).

Un altro target terapeutico in fase di studio è la tirosin chinasi SRC che è overespressa nel carcinoma mammario. Dasatinib, inibitore di SRC, c-KIT e di altre chinasi, si è mostrato efficace in linee cellulari tumorali derivanti da forme di carcinoma mammario *basal-like* (*Bosch A. et al., 2010*).

Alcuni dati sperimentali hanno anche dimostrato che gli inibitori delle deacetilasi istoniche (HDACi) sono in grado di indurre la riespressione del recettore ER $\alpha$  in linee cellulari tumorali negative per tale recettore. Ad esempio, la Tricostatina A (TSA) determina nella linea cellulare MDA-MB231, che non esprime il recettore  $\alpha$  per gli estrogeni (ER $\alpha$ ), la riespressione dell'mRNA codificante tale recettore e della proteina stessa. Tale effetto risulta più marcato quando il TSA è impiegato in associazione con l'agente demetilante 5-aza-2-deossicitidina. Il recettore ER $\alpha$  è

funzionale, come dimostrato dall'espressione del recettore per il progesterone (PR), un target di ER $\alpha$  (Stearns V. et al., 2007).

Il trattamento delle forme tumorali positive per ER identifica come target proprio tale recettore. In questi casi, le strategie terapeutiche possono prevedere il blocco dell'interazione tra gli estrogeni (E2) ed i propri recettori impiegando antiestrogeni, definiti SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators), l'inibizione dell'enzima aromatasi (responsabile della sintesi degli estrogeni) e l'impiego di specifici antagonisti del recettore ER $\alpha$ , definiti SERDs (Selective Estrogen Receptor Down-Regulators). Inoltre, nelle forme di carcinoma mammario che overesprimono HER-2, viene impiegato il Trastuzumab, noto anche come Herceptin, un anticorpo monoclonale che interagisce con HER-2 e lo inibisce (Orlando L. et al., 2010). Tra i SERMs, il Tamoxifene è stato il primo ad essere individuato ed il più ampiamente studiato; è un agente non steroideo, contenente un gruppo trifeniletile che agisce inibendo competitivamente ER inducendone un cambiamento nella conformazione in grado di reprimere la sua attività trascrizionale. Il Tamoxifene presenta comunque una parziale attività agonista a livello delle ossa e dell'endometrio, sui quali può indurre proliferazione cellulare e aumento del rischio di trasformazione tumorale in seguito a prolungata esposizione. Sono stati sviluppati altri SERMs con minore attività agonista, come il

Raloxifene e altri SERMs di seconda e terza generazione, come il Lasofoxifene e il Bazedoxifene, senza però ottenere buoni risultati a causa dell'insorgenza di meccanismi di resistenza nelle pazienti (*Pickar J. H. et al., 2010*). A causa della parziale attività agonista dei SERMs, la ricerca si è concentrata su nuovi composti che legano e bloccano ER senza effetto agonista. I SERDs agiscono come antagonisti del recettore per gli estrogeni ER $\alpha$ . Fulvestrant (noto come ICI 182,780 o Faslodex) compete con l'estradiolo per il legame ad ER ed agisce inducendo un cambiamento conformazionale di ER impedendone la dimerizzazione e la traslocazione al nucleo e riducendo così la sua capacità di modulare la trascrizione genica. Il complesso Fulvestrant-recettore, inoltre, viene ubiquitinato, avviato al proteasoma e degradato, causando una riduzione dei livelli di ER $\alpha$  (*Long X. et al., 2006*). Tuttavia, Fulvestrant presenta scarsa biodisponibilità e difficoltà di raggiungere in circolo concentrazioni che risultano efficaci (*McDonnel D. et al., 2010*).

La classe degli inibitori dell'enzima aromatasi comprende composti steroidei (Examestano e Formastano) e non steroidei (Letrozolo e Anastrozolo); il loro impiego è però limitato dall'insorgenza di effetti collaterali, come l'osteoporosi (*Brueggemeier R. W. et al., 2005*).

## **Modelli animali e cellule MDA-MB231**

Ogni composto, prima di essere approvato clinicamente, deve essere testato *in vitro* su cellule in coltura ed *in vivo* in modelli animali xenotrapiantati con tumori umani, su cui deve mostrarsi efficace prima di essere valutato in studi clinici di fase precoce e tardiva. Pertanto, uno dei campi d'applicazione più importanti degli animali da laboratorio è quello della valutazione dell'efficacia di agenti chemioterapici (*Hollingshead M. G., 2008; Teicher B. A., 2006; Kerbel R. S., 2003*).

Molte linee cellulari, anche se presentano un'elevata invasività *in vitro*, possono non essere capaci di indurre la formazione di tumori quando impiantate in animali da esperimento; le condizioni ambientali dello stroma animale e le interazioni di quest'ultimo con le cellule umane impiantate, infatti, possono influenzare lo sviluppo e la progressione tumorale (*Jessani N. et al., 2005*).

In seguito agli studi condotti da Rygaard e Povlsen, che osservarono la crescita di un adenocarcinoma del colon umano in topi nudi (*Rygaard J. et al., 1969*), questo ceppo di animali si è dimostrato il più utile per gli xenotrapianti.

I topi nudi sono caratterizzati da aplasia del timo ed assenza di pelo, determinate da una mutazione omozigote a livello del gene *nu* presente sul

cromosoma 11 (*Flanagan S. P., 1966; Byrd L. G., 1993*). L'assenza di timo causa una deficienza del sistema immunitario che si compone quasi interamente di cellule B e di cellule Natural Killer, con riduzione quantitativa e funzionale della popolazione di cellule T. Tali caratteristiche determinano una totale compromissione della funzionalità del sistema immune (*Gershwin M. E., 1977*). Pertanto, l'incapacità al rigetto di tessuto neoplastico allogenico o xenogenico rende il topo nudo un adeguato modello *in vivo* per la ricerca sul cancro.

Numerosi studi hanno riportato che, anche se non tutti i tumori umani possono essere xenotrapiantati con successo, le proprietà istologiche e biochimiche dei tumori che crescono nei topi nudi sono molto simili a quelle delle forme tumorali d'origine (*Giovanella. B. C. et al., 1985*).

I topi nudi rappresentano anche un valido modello per lo studio della biologia delle metastasi (*Price J. E. et al., 1990; Fidler I. J., 1986*).

Le variabili che influenzano la formazione di queste ultime includono le condizioni di salute e di stabulazione degli animali (*Sharkey F. E. et al., 1984; Neulat-Duga I. et al., 1984*), le vie di inoculazione delle cellule tumorali impiegate (*Kozłowski J. M. et al., 1984*) e le proprietà intrinseche delle cellule tumorali inoculate. Molte cellule tumorali umane quando iniettate nel sottocute di topi nudi possono proliferare *in loco* ma la formazione di metastasi da questo sito è rara. Tuttavia, l'impianto di cellule

tumorali umane in siti anatomicamente adeguati (ad esempio in sede ortotopica) permette l'espressione del fenotipo metastatico.

Il vantaggio di un modello di malattia disseminata è quello di riprodurre più fedelmente la patologia umana, incluse le capacità di infiltrazione, migrazione e homing in siti metastatici specifici (*Price J. E. et al., 1990*).

Lo sviluppo di modelli murini di carcinoma mammario, che riproducono tumori primari e metastasi nei tessuti clinicamente rilevanti (linfonodi, polmoni ed ossa), rappresenta una valida opportunità per la valutazione preclinica di nuove strategie terapeutiche rivolte alla cura del carcinoma mammario umano.

Gli attuali modelli di xenotrapianti coinvolgono linee cellulari di carcinoma mammario murino o umano impiantate nel pannicolo adiposo mammario di topi immunodeficienti o iniettate per via sistemica, endovenosa o intracardiaca. Le cellule tumorali impiantate nel tessuto mammario riproducono il tumore ma possono richiedere da settimane a diversi mesi prima che il tumore primario si sviluppi e produca metastasi spontanee a seconda della linea cellulare e del ceppo murino utilizzato.

La linea cellulare MDA-MB231 viene comunemente utilizzata per gli xenotrapianti in modelli animali ed è la più studiata come modello sperimentale delle forme di carcinoma mammario triplo negativo. Queste cellule, derivate da un carcinoma mammario duttale metastatico, mostrano

una crescita preferenziale nel pannicolo adiposo mammario di topi immunocompromessi (*Price J. E. et al., 1990*) sviluppando tumori primari che producono spontaneamente metastasi ai linfonodi e micrometastasi ai polmoni (*Jenkins D. E. et al., 2005*). La linea cellulare MDA-MB231 è stata ricavata da un singolo campione di effusioni pleurali ottenute nel 1973 da una donna di 51 anni a cui era stata praticata una mastectomia radicale destra nel 1969 a causa di un tumore scarsamente differenziato tendente verso la configurazione papillare ed alla formazione tubulare. Questa paziente presentava, inoltre, un carcinoma intraduttale. Nel 1973 comparvero l'effusione pericardiale e l'effusione pleurale sinistra entrambe contenenti cellule compatibili con il tumore primario del seno. L'ooforectomia ed il trattamento sistemico con 5-Fluorouracile risultarono inefficaci come il successivo trattamento combinato con ciclofosfamide, adriamicina e amfotericina. La donna morì nel 1974 (*Cailleau R. et al., 1974*).

Le cellule MDA-MB231 sono una linea di adenocarcinoma mammario umano altamente aggressiva caratterizzata dalla mancata espressione dei recettori ER, PR e HER-2, dall'overespressione del recettore per l'EGF (EGFR) e dalla presenza di una forma mutata di p53, che mostra una sostituzione amminoacidica (G/A) nel codone 280 del gene corrispondente. Sembra che gli elevati livelli del recettore per l'EGF siano determinati

dall'assenza del recettore degli estrogeni ER $\alpha$ . Infatti, l'mRNA dell'EGFR è regolato negativamente dal recettore ER $\alpha$  che interagisce con una sequenza di regolazione negativa di 96 bp localizzata nel primo introne del gene codificante l'EGFR (Zhou Q. et al., 2009).

Nelle cellule MDA-MB231 è stata osservata una iperespressione delle subunità integriniche  $\beta$ 1,  $\beta$ 4,  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ V e  $\alpha$ 6 (Morini M. et al., 2000). E' noto che i recettori integrinici sono responsabili della trasmissione di segnali di proliferazione che favoriscono la crescita e l'invasività (Morini M. et al., 2000; Lichtner R. B. et al., 1998).

Le cellule MDA-MB231 hanno un fenotipo *mesenchymal-like* o *stromal-like* (Lacroix M. et al., 2004); presentano, infatti, molte caratteristiche comuni alle cellule mesenchimali: sono dotate di un'elevata capacità di invadere e attraversare membrane basali e non esprimono marcatori epiteliali ma in contrasto mostrano un alto livello di vimentina.

Durante la progressione tumorale da iperproliferazione atipica a malattia metastatica, le cellule potrebbero subire alterazioni fenotipiche. Questo processo ricorda la cosiddetta "transizione epitelio-mesenchimale" (EMT) che si verifica durante lo sviluppo embrionale a tempi e luoghi precisi.

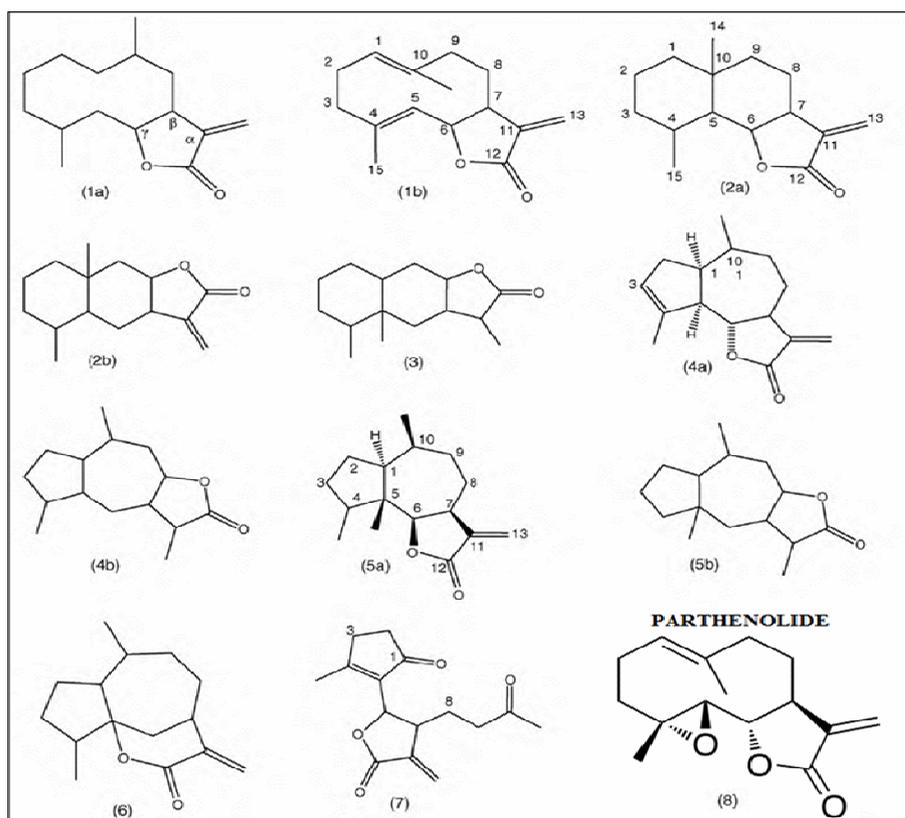
La EMT nelle cellule di carcinoma mammario comporterebbe il silenziamento di geni codificanti markers epiteliali (recettore per gli estrogeni, E-caderina, proteine tight junctions, ecc) ed il guadagno di

aspetti mesenchimali quali una maggiore aggressività ed invasività e l'aumento di marcatori, come la vimentina (*Thiery J. P. et al., 2006; Katz E. et al., 2011; Mendez M. G. et al., 2010*).

## **Il Partenolide ed il suo derivato dimetilamino-partenolide (DMAPT)**

I Sesquiterpeni Lattoni (SL) sono una sottofamiglia dei terpenoidi, composti stabili, incolori, di sapore amaro e con caratteristiche lipofile, estratti dalle *Asteraceae* (Ghantous A. et al., 2010). Essi sono stati ampiamente utilizzati nelle pratiche medicinali tradizionali per il trattamento di stati febbrili, emicrania, disturbi gastrici, mal di denti, artrite reumatoide, irregolarità mestruali ed altri stati infiammatori (Mathema V. B. et al., 2012). I SL sono composti a quindici atomi di carbonio costituiti da 3 unità isopreniche e un gruppo lattonico (un estere ciclico). Tutti i componenti di questa famiglia di composti naturali contengono un anello  $\alpha$ -metilene- $\gamma$ -lattonico fuso in *cis*- o in *trans*- alla posizione C6-C7 o C8-C7 dello scheletro carbossilico e che rappresenta la porzione attiva della molecola (Figura 2) (Ghantous A. et al., 2010).

Questi elementi strutturali reagiscono tramite i gruppi  $\alpha$ -metilene- $\gamma$ -lattoni con i gruppi nucleofili, i più reattivi dei quali sono i gruppi tiolici, come i residui aminoacidici di cisteina presenti nelle proteine e nel glutatione (GSH) intracellulare libero; tali interazioni portano alla riduzione di attività enzimatiche ed interferiscono con il metabolismo del GSH e l'equilibrio redox, essenziale per la sopravvivenza della cellula (Ghantous A. et al., 2010).



**Figura 2: Struttura chimica delle diverse classi di Sesquiterpeni Lattoni e del Partenolide.**

(1a-1b): Isomeri Germacranolidi. (2a-2b): Isomeri Eudesmanolidi. (3): Eremofilanolide. (4a-4b): Isomeri Guaianolidi. (5a-5b): Isomeri Pseudoguaianolidi. (6): Ipocretenolide. (7): Iso-seco-tanapartolide. (8): Partenolide (*Ghantous A. et al., 2010*).

Il Partenolide (PN) è il principale componente dei sesquiterpeni lattoni ed è estratto dall'erba medicinale *Tanacetum parthenium* anche nota come feverfew. Attualmente è utilizzato per la profilassi dell'emicrania ed è presente in commercio con il nome di Tanacet prodotto dalla Ashbury Biologicals (*Curry E. A. III et al., 2004*). Numerosi studi hanno dimostrato che il PN possiede attività antimicrobica, antinfiammatoria ed

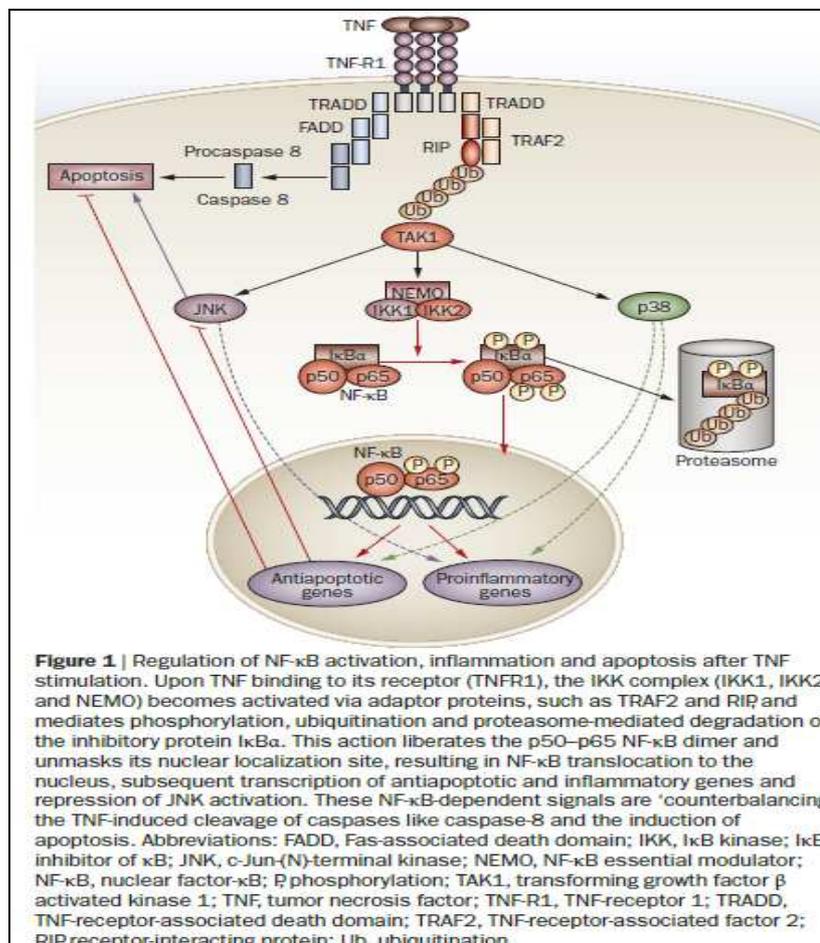
anticancerosa grazie ad un ampio range di segnali intracellulari da esso stimolati (*Mathema V. B. et al., 2012*).

Gli effetti antinfiammatori del PN sono stati correlati all'inibizione della fosfolipasi A2 (*Makheja A. N. et al., 1982*), a cui consegue la riduzione della produzione di prostaglandine a partire dall'acido arachidonico (*Collier H. O. et al., 1980*). Inoltre è stato dimostrato che il PN è in grado di inibire la 5-lipossigenasi (*Sumner H. et al., 1992*), le forme inducibili della ciclossigenasi (*Hwang D. et al., 1996*) e dell'ossido nitrico sintetasi (*Fukuda K. et al., 2000*), contribuendo ulteriormente all'effetto antiflogistico. Il PN svolge la propria attività antinfiammatoria anche mediante l'inibizione della secrezione dei mediatori pro-infiammatori (TNF- $\alpha$  e IL-6) indotti dal lipopolisaccaride (*Sobota R. et al., 2000*).

Tra i target molecolari del PN vi è il fattore di trascrizione NF-kB che, se attivato in seguito a diversi stimoli pro-apoptotici (TNF- $\alpha$ , farmaci citotossici, radiazioni ionizzanti stress ossidativo) (*Kwok B. H. et al., 2001*; *García-Piñeres A. J. et al., 2001*), modula la risposta infiammatoria, l'immunità innata ed acquisita, la proliferazione, il differenziamento, la sopravvivenza e l'apoptosi (*Wu J. T. et al., 2005*; *Pajak B. et al., 2008*).

Tra le subunità che costituiscono il fattore NF-kB vi sono: c-Rel, Rel-A o p65, Rel-B, p50 e p52 (*Li X. et al., 2002*). NF-kB è mantenuto inattivo nel citoplasma grazie alle proteine I $\kappa$ Bs che mascherano la sua sequenza di

localizzazione nucleare. La fosforilazione di IκB, da parte della chinasi IKK (eterodimero costituito da due subunità catalitiche IKKα e IKKβ e dalla subunità regolatrice IKKγ) sul dominio citosolico e la sua successiva ubiquitinazione e degradazione nel proteasoma, determinano l'attivazione di NF-κB che trasloca nel nucleo e, in seguito al legame con il promotore di NF-κB, attiva la trascrizione dei geni da esso controllati (Figura 3).



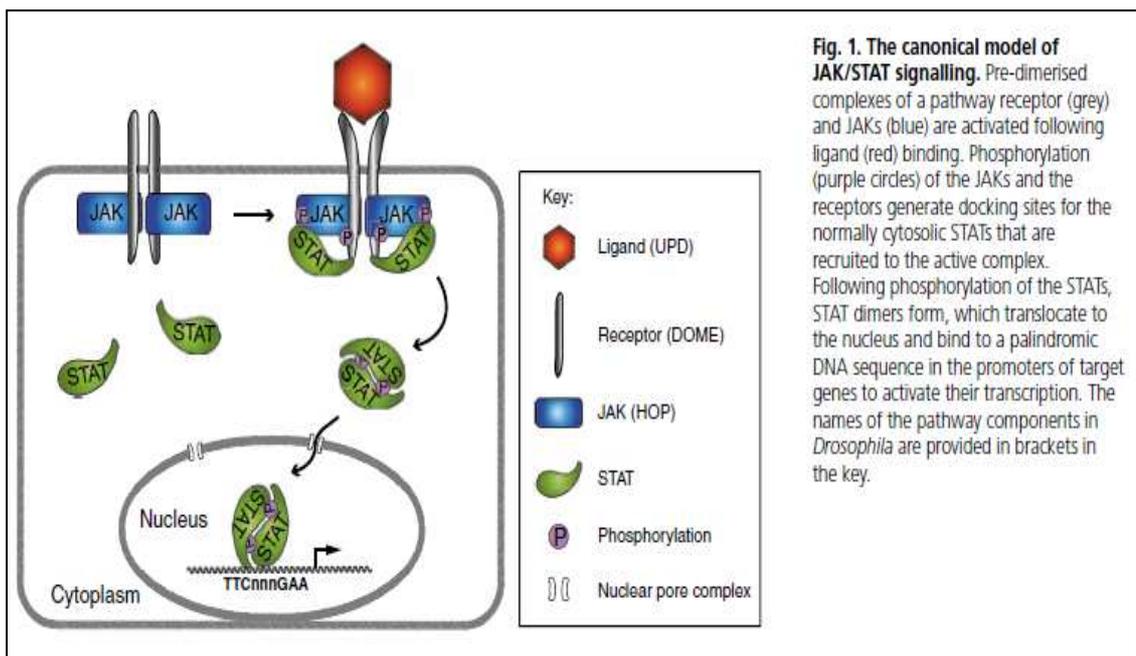
Luedde T. et al. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. 8: 108-118. (2011). **Figura 3 della tesi.**

Tra i target trascrizionali di NF- $\kappa$ B vi sono alcuni fattori antiapoptotici quali quelli che esprimono il fattore 1 associato al recettore per TNF- $\alpha$  (TRAF1), TRAF2, le cIAP, la manganese superossido dismutasi (MnSOD), A20, IEX-1L e due proteine anti-apoptotiche appartenenti alla famiglia di Bcl-2: Bfl1/A1 e Bcl-xL (*Pajak B. et al., 2008*). Tra i target di NF- $\kappa$ B vi sono anche fattori coinvolti nella invasività cellulare come MMP-2 e MMP-9 e nell'angiogenesi come VEGF (*Oka D. et al., 2007; Shibata A. et al., 2002*).

Il PN è in grado di inibire NF- $\kappa$ B sia in modo diretto, inibendo la subunità Rel-A/p65, sia in modo indiretto inibendo IKK. L'inibizione di NF- $\kappa$ B, data la sua implicazione nei meccanismi di sopravvivenza cellulare, rende le cellule suscettibili all'apoptosi e le sensibilizza all'azione di farmaci antitumorali. Alcuni studi suggeriscono che le cellule normali non risentono dell'azione tossica del PN perché l'attività basale di NF- $\kappa$ B in queste cellule è piuttosto bassa o a volte è richiesta per il differenziamento cellulare piuttosto che per l'oncogenesi (*Sarkar F. H. et al., 2008*).

Anche le proteine STATs (signal transducer and activator of transcription) sono target molecolari del PN. Queste sono fattori di trascrizione che mediano diverse funzioni biologiche come la proliferazione cellulare, l'apoptosi, il differenziamento, l'infiammazione e la risposta immune (*Meyer T. et al., 2007*). Attualmente, nei mammiferi sono state identificate

7 STATs (STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b, STAT-6). La stimolazione da parte di citochine o fattori di crescita determina la fosforilazione della tirosina seguita dalla dimerizzazione e la successiva regolazione genica mediante legame diretto a sequenze consenso presenti sul DNA (Figura 4). Diverse tirosina chinasi tra le quali JAK (Janus Kynase), TYK (Tyrosine Kinase), RTK (Receptor Tyrosine Kinases) possono fosforilare STAT.



Arbouzova N. I. et al. *Development*. 133 (14): 2605-2616. (2006). **Figura 4 della tesi.**

Nelle cellule normali la fosforilazione di STAT è transiente, mentre in numerose forme tumorali, quali leucemia, mieloma multiplo (Ferrajoli A. et al., 2006), carcinoma della mammella (Sheen-Chen S. M. et al., 2007),

carcinoma della prostata (*Bromberg J., 2002*), tumore del colon retto (*Corvinus F. M. et al., 2005*), carcinoma epatocellulare (*Carlisi D. et al., 2011*), le proteine STATs (in particolare STAT3) sono persistentemente fosforilate. Ciò può essere dovuto sia alla deregolazione degli effettori positivi della fosforilazione di questi fattori di trascrizione (JAK, TYK) che all'inibizione dei regolatori negativi [soppressori del segnale delle citochine (SOCS), proteine inibitrici di STAT attivato (PIAS), fosfatasi] (*Bromberg J., 2002*).

E' stato ipotizzato che il PN possa agire mediante un effetto inibitorio delle proteine JAK; l'inibizione di tali chinasi impedisce la fosforilazione di STAT-3 a livello della tirosina 705, prevenendo quindi la sua dimerizzazione e la traslocazione al nucleo (*Sobota R. et al., 2000*).

Nel laboratorio dove ho sviluppato la mia tesi, è stato dimostrato che il PN, attraverso l'inibizione della via di segnalazione JAK/STAT, induce un incremento dell'espressione dei recettori di morte in tre linee cellulari di epatocarcinoma umano, HepG2, Hep3B e SK-Hep1 rendendole così sensibili alla morte per apoptosi indotta da TRAIL, senza manifestare alcun effetto tossico in epatociti umani in coltura (*Carlisi D. et al., 2011*).

In altri sistemi tumorali, l'azione selettiva del PN, rispetto a cellule normali, sembra associata alla sua capacità di indurre morte per apoptosi attraverso induzione di stress ossidativo (*Mathema V. B. et al., 2012*). E'

noto che molti farmaci antitumorali sono induttori dell'apoptosi poiché alterano l'equilibrio redox, riducendo il contenuto di gruppi tiolici intracellulari mediante espulsione o redistribuzione del GSH intracellulare (*Ghibelli I. et al., 1995*). Generalmente le cellule tumorali presentano un più alto grado di stress ossidativo rispetto alle cellule normali (*Mathema V. B. et al., 2012*). Quindi una strategia antitumorale potrebbe essere indirizzata all'induzione di ulteriore stress o alla soppressione dei meccanismi anti-ossidanti naturali di cui la cellula gode, in maniera tale da sensibilizzare le cellule tumorali alla morte a causa di uno stress ossidativo eccessivo, mentre le cellule normali circostanti, adattandosi, possono continuare a mantenere l'omeostasi dello stato redox. Lo squilibrio nello stato redox intracellulare innesca una serie di eventi che portano alla morte cellulare per apoptosi ed alterazione della funzione mitocondriale (*Ghibelli I. et al., 1995*). E' stato dimostrato che il PN induce incremento di ROS nelle cellule di carcinoma prostatico (PC3), attivando la NADPH ossidasi, che determina una cascata di reazioni che coinvolge il pathway di P3K/Akt e FOXO3a, portando alla down-regulation degli enzimi antiossidanti manganese superossido dismutasi e della catalasi (*Sun Y. S. et al., 2010*). Nei laboratori dove ho sviluppato questa tesi è stato dimostrato che il PN stimola un particolare meccanismo di morte caspasi indipendente in cellule di osteosarcoma umano MG63 e in cellule di melanoma SK-MEL-28

(D'Anneo A. *et al.*, 2012). In particolare è stato dimostrato che in queste linee cellulari il PN determina un incremento nella produzione di ROS, a causa dell'attivazione della NADPH ossidasi e della chinasi ERK1/2. Il composto causa, inoltre, una diminuzione nel contenuto di gruppi tiolici e di glutazione, l'inibizione di NF-kB, l'attivazione di JNK. L'aumento della produzione dei ROS insieme all'accumulo di  $Ca^{2+}$  nel mitocondrio, favorisce la dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale, con conseguente fuoriuscita di AIF e sua traslocazione in sede nucleare.

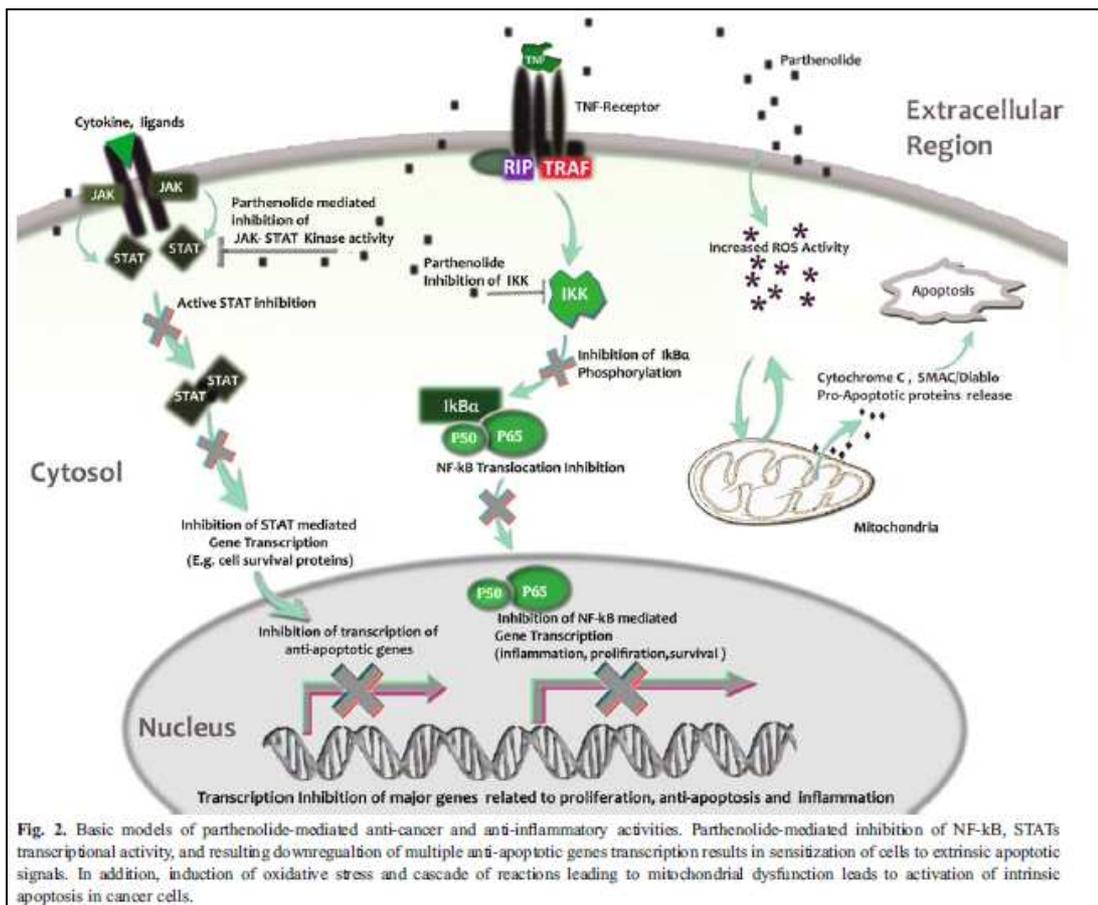
Il PN è in grado di attivare la c-Jun N-terminal Kinase (JNK). Questa chinasi, una volta attivata, mediante fosforilazione su residui di treonina e tirosina, trasloca al nucleo e fosforila fattori di trascrizione come c-Jun. JNK è attivata in risposta allo stress cellulare ed è coinvolta nell'attivazione dell'apoptosi. L'attivazione di JNK da parte del PN può avvenire in modo diretto (interagendo con essa) (Zhang S. *et al.*, 2004) oppure può dipendere dall'inibizione di NF-kB o dalla produzione di specie reattive dell'ossigeno (Varfolomeev E. E. *et al.*, 2004).

Le proprietà antitumorali del PN sono anche state attribuite al suo ruolo di modulatore del codice epigenetico. I meccanismi epigenetici sono frequentemente alterati nelle cellule cancerose e alcuni tumori mostrano modifiche aberranti degli istoni, esprimono elevati livelli di attività della deacetilasi istonica 1 (HDAC1) e sono molto più sensibili all'azione degli

inibitori delle deacetilasi istoniche rispetto alle cellule normali (*Ghantous A. et al., 2010*). Il PN riduce in modo specifico l'espressione della proteina HDAC1 determinandone la degradazione mediata dal proteasoma, senza inibire l'azione delle HDACs di classe I/II (*Gopal Y. N. et al., 2007*). Il PN, ad esempio, attraverso questa inibizione, promuove la trascrizione del gene p21, un inibitore del complesso chinasi ciclino-dipendente, determinando l'arresto del ciclo cellulare (*Ghantous A. et al., 2010*). E' stato anche evidenziato che il ruolo del PN, come rimodellatore del codice epigenetico, si espleta anche sulla metilazione del DNA. Diversi tipi di tumore hanno elevati livelli di DNA metil trasferasi DNMT1 e DNMT3b. Questo determina ipermetilazione delle isole CpG dei promotori di alcuni geni che codificano per tumor suppressors determinando un loro silenziamento in alcune forme tumorali (*Ghantous A. et al., 2010*). Il PN induce ipometilazione del DNA *in vitro* ed *in vivo* inibendo in modo specifico l'attività di DNMT1 grazie al legame covalente tra il suo gruppo  $\alpha$ -metilene- $\gamma$ -lattone e la cys1226 del gruppo tiolico funzionale posto nel sito catalitico dell'enzima (*Liu Z. et al., 2009; Ghantous A. et al., 2010*).

Grazie ai numerosi processi mediante i quali effettua la sua azione anti-cancro (Figura 5), il PN possiede un ampio spettro di attività in cellule: di mieloma multiplo (*Suvannasankha A. et al., 2008*), leucemiche (*Zunino S. J. et al., 2007*), di cancro alla prostata (*Liu J. W. et al. 2010*), al colon retto

(Zhang S. et al., 2004), al seno (Nakshatri H. et al., 2004), al pancreas (Kawasaki B. T. et al., 2009); esso è invece inefficace in cellule normali (Guzman M. L. et al., 2005).



Mathema V. B. et al. *Inflammation*. 35: 560-565. (2012). **Figura 5 della tesi.**

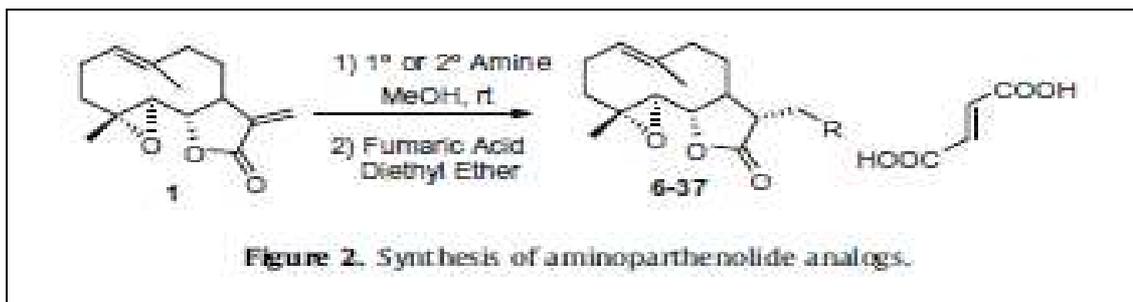
In virtù della bassa citotossicità sulle cellule normali il PN sembra essere un agente ideale per la terapia antitumorale del prossimo futuro.

Di contro, l'attività del PN usato come singolo agente *in vivo* è modesta.

Sweeney e collaboratori hanno dimostrato che in modelli ortotopici di

carcinoma mammario, il PN non induce riduzioni statisticamente significative della crescita tumorale ma riduce le metastasi polmonari ed aumenta la sensibilità al docetaxel (Sweeney C. J. et al., 2005).

Nonostante il PN abbia dimostrato effetti promettenti *in vitro*, l'impiego di questo composto naturale come agente terapeutico è fortemente limitato dalla sua scarsa solubilità (Curry E. A. III et al., 2004). Pertanto, Guzman ed i suoi collaboratori hanno preparato il dimetilammino-partenolide (DMAPT) facendo reagire il PN con la dimetilammina, quindi il composto prodotto è stato convertito nel suo sale fumarato (Figura 6) che ha dimostrato una solubilità in acqua 1000 volte superiore al PN, una maggiore biodisponibilità ed una minore tossicità.



Neelakantan S. et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19 (15): 4346-4349. (2009). **Figura 6 della tesi.**

Il DMAPT così come il PN è capace di determinare in modo efficace morte delle cellule staminali e progenitrici di leucemia mieloide acuta (AML) umana senza esercitare alcun effetto sulle cellule staminali e progenitrici

ematopoietiche (*Guzman M. L. et al., 2007; Neelakantan S. et al., 2009*).

Gli stessi ricercatori hanno anche effettuato studi farmacologici che hanno dimostrato che nei topi una dose di DMAPT di 100 mg/kg somministrata per via orale raggiunge una concentrazione massima di 25  $\mu$ M ed una emivita di 0,63 ore nel siero. La biodisponibilità orale comparata con quella endovenosa è di circa il 70%. Queste caratteristiche rappresentano un significativo miglioramento del composto rispetto al PN che dimostrava una concentrazione massima nel siero di 200 nM alla dose di somministrazione di 40 mg/kg, che rappresenta la dose massima ottenibile data la scarsa solubilità del PN. Negli studi di tossicologia, inoltre, è stato dimostrato che la somministrazione giornaliera di 100 mg/kg di DMAPT ai topi per 10 giorni consecutivi è ben tollerata in quanto non è stata riscontrata alcuna tossicità acuta evidente o cambiamenti nei parametri ematologici (*Guzman M. L. et al., 2007*).

È stato dimostrato che il DMAPT *in vitro* determina morte cellulare attraverso la produzione di ROS e l'inibizione di NF- $\kappa$ B in cellule di cancro della prostata, del polmone e della vescica (*Shanmugam R. et al., 2010; Shanmugam R. et al., 2011*).

L'efficacia del DMAPT è stata dimostrata anche *in vivo* in modelli di xenograft di cellule di carcinoma prostatico androgeni-indipendente in cui determina la riduzione dei volumi tumorali rispetto al controllo. Inoltre,

come agente singolo, mostra una maggiore attività *in vivo* rispetto alla bicalutamide (un anti-androgeno) e al docetaxel, un agente citotossico (*Shanmugam R. et al., 2010*).

Anche in modelli murini di cancro del polmone e della vescica il DMAPT è in grado di indurre riduzione della crescita tumorale ed inibisce il processo metastatico (*Shanmugam R. et al., 2010*). Infine, è stato dimostrato che, sempre in modelli murini di tumore al polmone, il DMAPT incrementa significativamente il ritardo nella crescita tumorale indotta dai raggi X, indicando che la morte cellulare indotta dalle radiazioni è fortemente incrementata dal DMAPT (*Estabrook N. C. et al., 2011*).

## **Obiettivi della tesi**

Nel Laboratorio di Biochimica del Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (oggi STEBICEF) dell'Università di Palermo, dove ho sviluppato tale progetto di ricerca, da tempo si studiano i meccanismi di morte indotti da diversi composti, impiegando come modello sperimentale cellule tumorali umane in coltura. Gli studi riportati in questa tesi sono stati condotti in cellule MDA-MB231, una linea di adenocarcinoma mammario umano, capace di indurre tumore in topi immunodepressi. Questa linea cellulare è la più studiata come modello sperimentale delle forme di carcinoma mammario triplo negativo prive dei recettori degli estrogeni, del progesterone e di HER-2/neu. Queste forme tumorali sono particolarmente aggressive, non rispondono ai trattamenti con agenti endocrini o al trastuzumab e attualmente il loro trattamento prevede la combinazione di terapie chirurgiche, radioterapeutiche e chemioterapeutiche (*Yagata H. et al., 2011*). La chemioterapia standard con antracicline, taxani e agenti del platino determina un alto tasso d'insorgenza di resistenza nei confronti di queste molecole (*Yagata H. et al., 2011; Liedtke C. et al., 2008; Dent R. et al., 2007; Pogoda K. et al., 2013*). Pertanto, oggi la ricerca scientifica è rivolta all'individuazione di

nuovi composti che risultino efficaci per il trattamento di queste forme altamente invasive.

Recentemente, studi condotti in questi laboratori sulle cellule MDA-MB231, *in vitro*, hanno dimostrato che il Partenolide induce morte stimolando stress ossidativo e autofagia (D'Anneo A. *et al.*, 2013). Questi studi hanno analizzato le espressioni molecolari dei pathways coinvolti negli eventi necrotici e autofagici.

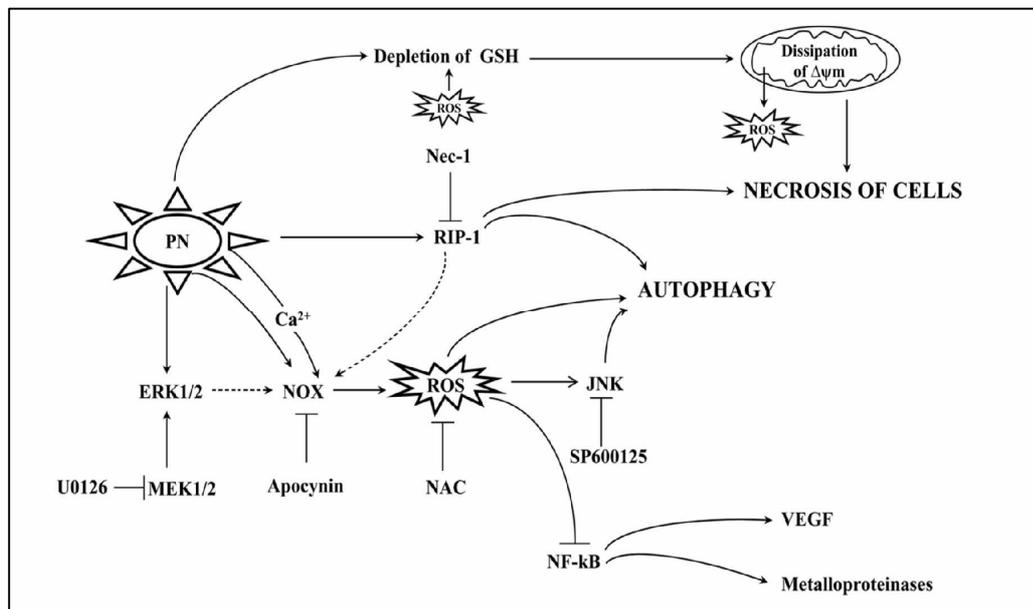
In particolare, è stato osservato che il PN induce decremento della vitalità cellulare in modo dose e tempo dipendente. L'effetto non è contrastato dall'aggiunta di z-VAD-fmk, un inibitore generale delle caspasi, le principali proteasi coinvolte nell'induzione di apoptosi.

I risultati indicano che nelle prime ore di trattamento (1 - 3 h) il PN induce una marcata produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), dipendente dall'attivazione della NADPH ossidasi (NOX). Quest'ultima sembra essere correlata con l'aumento di  $Ca^{2+}$  citosolico e l'attivazione di ERK1/2 e di RIP-1, indotti dal PN.

La produzione di ROS a sua volta determina deplezione di gruppi tiolici e glutatione, attivazione di c-Jun N - terminal kinase (JNK) e un marcato decremento dell'attività di legame al DNA di p65 con la conseguente riduzione di attività di NF-kB. Durante questa prima fase il PN stimola il processo autofagico, come suggerito dalla aumentata espressione di

beclina-1, dalla conversione di LC3-I (microtubule-associated protein light chain 3-I) in LC3-II e dall'aumento del numero di cellule positive alla monodansilcadaverina.

In una seconda fase di trattamento (5 – 20 h) il PN induce produzione di ROS, legata principalmente a dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale. Come conseguenza della compromissione mitocondriale gli eventi necrotici diventano predominanti come suggerito dall'aumento del numero di cellule positive alla colorazione con ioduro di propidio (D'Anneo A. et al., 2013) (Figura 7).



**Figura 7. Meccanismo d'azione del Partenolide in cellule MDA-MB231 in coltura (D'Anneo A. et al. Cell Death and Disease. 4, doi: 10.1038/cddis.2013.415. 2013).**

Sulla base di queste osservazioni, l'obiettivo del mio studio è stato quello di valutare l'efficacia del PN *in vivo* in xenografts di cellule MDA-MB231 inoculate in topi nudi in sede ortotopica. Tuttavia, in considerazione della scarsa solubilità del PN, lo studio *in vivo* è stato condotto impiegando il dimetilamino-partenolide (DMAPT), un analogo del PN dotato di maggiore solubilità e biodisponibilità.

Gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri".

## **MATERIALI E METODI**

## **Condizioni di coltura delle cellule MDA-MB231**

Le MDA-MB231 sono state ottenute dall'Istituto Scientifico Tumori (Genova, Italia) e sono coltivate in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> in presenza di terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), addizionato con siero bovino fetale (FBS) al 10% inattivato al calore (56°C per 30 min), amminoacidi non essenziali (NEA) all'1%, glutammina 2 mM e antibiotico anti-micotico (1%) (miscela di penicillina-streptomina e amfotericina b 0.5%). Le cellule vengono mantenute in incubatore alla temperatura di 37°C in atmosfera umidificata costituita dal 95% di aria e dal 5% di CO<sub>2</sub>. Le cellule MDA-MB231 sono una popolazione cellulare molto eterogenea, che cresce adesa alle fiasche disponendosi in monostrato.

Per studiare gli effetti dei composti, le cellule sono state staccate dal substrato utilizzando una soluzione di tripsina-EDTA (2.5 mg/ml di tripsina e 1 mg/ml di EDTA) e seminate in piastre da 6 pozzetti (2 x 10<sup>5</sup> cellule/2 ml di terreno di coltura) o da 96 pozzetti (8 x 10<sup>3</sup> cellule/200 µl di terreno di coltura in ogni pozzetto). Le cellule sono state quindi poste in incubatore a 37°C *overnight* per favorirne l'adesione al supporto ed in seguito sono state trattate con i composti. Per ogni esperimento sono state condotte delle prove controllo, in cui le cellule sono state incubate in presenza del solo veicolo in cui sono stati solubilizzati i composti esaminati.

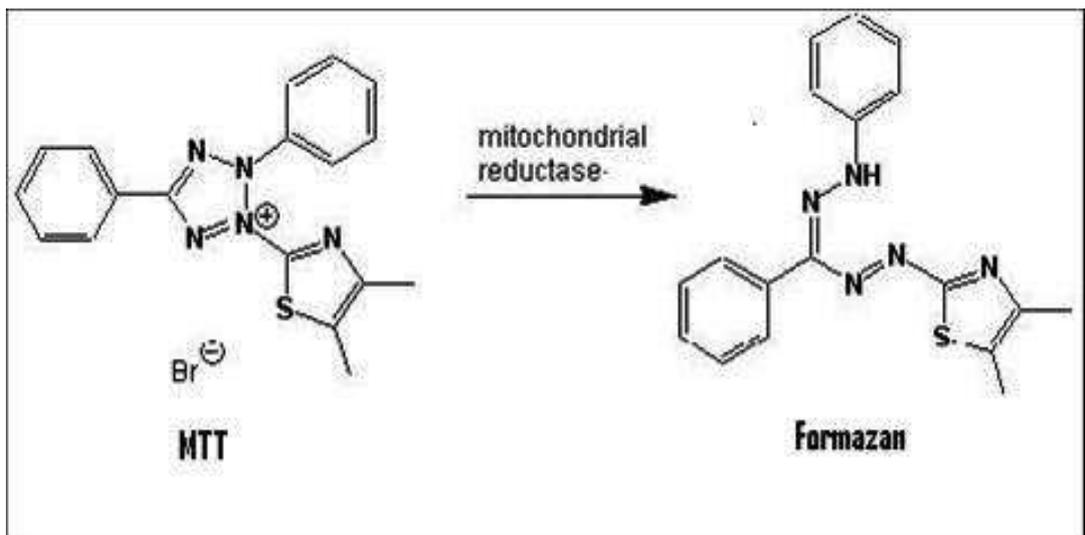
Le cellule destinate all'inoculazione nei topi sono state staccate dal substrato utilizzando una soluzione di tripsina-EDTA (2.5 mg/ml di tripsina e 1 mg/ml di EDTA) e sono state lavate due volte con PBS (Phosphate-Buffered Saline) mediante centrifugazione e risospese in PBS ( $2 \times 10^6$  cellule in 200  $\mu$ l di PBS). Il numero e la vitalità cellulare sono stati determinati colorando un piccolo volume di sospensione cellulare con 0.2% di Trypan blu e mediante l'utilizzo di un emocitometro. Controlli di qualità microbiologici hanno dimostrato l'assenza di batteri, micoplasmi e miceti nelle cellule utilizzate.

### **Composti chimici utilizzati**

Il PN è stato preparato in dimetilsolfossido (DMSO) e il DMAPT in etanolo al 50%; entrambi sono stati diluiti in terreno di coltura alla concentrazione finale 4  $\mu$ M, 8  $\mu$ M, 12  $\mu$ M, 18  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 75  $\mu$ M, 100  $\mu$ M. La concentrazione finale di DMSO impiegata non è mai stata superiore allo 0.04%, concentrazione oltre la quale il DMSO può risultare tossico per le cellule. La soluzione di N-Acetilcisteina (NAC) è stata preparata direttamente in terreno di coltura alla concentrazione 0.2 M, successivamente filtrata per garantire condizioni di sterilità e impiegata alla concentrazione 2 mM.

## Vitalità cellulare: test MTT

La vitalità cellulare è stata accertata mediante il saggio colorimetrico che impiega il colorante di tetrazolio MTT. Quest'ultimo viene ridotto dalle deidrogenasi mitocondriali in formazano (Figura 8), un composto di colore blu-violetto la cui concentrazione risulta direttamente proporzionale al numero di cellule vive ed è misurabile spettrofotometricamente.



**Figura 8. Riduzione dell'MTT in formazano**

(<http://www.biotek.com/resources/articles/quantification-cell-viability-epoch.html>).

Per questi esperimenti le cellule ( $8 \times 10^3$  cellule/pozzetto) sono state seminate in piastre a 96 pozzetti in 200  $\mu$ l di DMEM e trattate con PN o DMAPT. Infine, sono stati aggiunti 20  $\mu$ l di soluzione di MTT (11 mg/ml di PBS) e l'incubazione è stata protratta per altre 2 h.

In seguito la piastra è stata centrifugata a 120 g per 5 min; è stato allontanato il terreno e sono stati aggiunti 100 µl di tampone di lisi (20% sodio dodecil solfato 50% in N, N-dimetilformammide). L'assorbanza del formazano è stata misurata con un lettore di micropiastre (OPSYS MR, Dynex Technologies, Chantilly, VA) a 540 nm con una lunghezza d'onda di riferimento di 630 nm.

### **Misura dei ROS intracellulari**

La produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte delle cellule trattate con diversi composti è stata misurata usando 2',7'-diclorodididrofluorescinadiacetato (H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes, Eugene, OR), una sonda non fluorescente che entra dentro la cellula in virtù delle proprie caratteristiche lipofile, conferite dai gruppi acetilici. H<sub>2</sub>DCFDA viene metabolizzato dalle esterasi cellulari (che rimuovono gruppi acetato) in DCFA che in presenza di specie radicaliche viene ossidato in una molecola (DCF) fluorescente rilevabile mediante citofluorimetria, i cui picchi d'eccitazione ed emissione sono rispettivamente a 480 nm e 525 nm. Cellule seminate in una piastra da 6 pozzetti sono state trattate con DMAPT 15 µM. Successivamente sono state rimosse mediante tripsina dal supporto cui erano adese, lavate con buffer

Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)/Ca/Mg (NaCl 0.137 M, KCl 5.4 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.34 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.44 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.3 mM, MgSO<sub>4</sub> 0.41 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.49 mM, NaHCO<sub>3</sub> 4.2 mM, D-Glucosio 5.56 mM, pH 7.3) ed incubate con 100 µl di H<sub>2</sub>DCFDA 50 µM a 37°C per 30 min.

A seguito dell'incubazione, dopo centrifugazione (120 g per 5 min), le cellule sono state risospese in HBSS ed analizzate adoperando un citofluorimetro FACScan (Beckman Coulter Epics XL) ed i dati sono stati elaborati adoperando il software Expo2. La procedura è stata applicata anche a cellule controllo.

### **Preparazione degli estratti cellulari e separazione mediante SDS-PAGE**

Per preparare gli estratti cellulari le cellule sono state seminate su piastre da 6 pozzetti (2 x 10<sup>5</sup> cellule/2 ml di terreno di coltura). Dopo il trattamento con i composti, le cellule sono state lavate in PBS, staccate dalla piastra adoperando una soluzione di Tripsina-EDTA (2.5 mg/ml di tripsina e 1 mg/ml di EDTA), prelevate e centrifugate a 120 g per 10 min. Successivamente sono state lisate in RIPA buffer (150 µl/10<sup>6</sup> cellule), ed incubate in ghiaccio per 30 min. Il RIPA è un tampone dissociante costituito da NP-40 all'1%, sodio deossicolato allo 0.5% e SDS allo 0.1%.

Prima di effettuare la lisi cellulare al RIPA buffer è stata aggiunta una miscela di inibitori delle proteasi, per evitare la degradazione delle proteine (aprotinina 25 µg/ml, PMSF 1 mM, sodio ortovanadato 10 mM, fluoruro di sodio 10 mM, leupeptina 25 µg/ml e pirofosfato di sodio 0.2 mM). La completa lisi cellulare è stata quindi ottenuta mediante sonicazione (tre cicli di 10 sec, con intervalli di 5 sec) adoperando un'intensità di 10 REV (Soniprep 150). Successivamente è stato dosato il contenuto proteico tramite il metodo di Lowry e sono stati preparati campioni contenenti 60 µg di proteine da sottoporre ad elettroforesi SDS-page. I campioni sono stati quindi trattati con sample buffer 2X (Tris-HCl 50mM, β-mercaptoetanol 100 mM, SDS al 2%, blu di bromofenolo allo 0.1%, glicerolo al 10%, pH finale 6.8) secondo un rapporto di 1:1. Le proteine sono state denaturate per 5 min a 90°C, ed i campioni sono stati caricati nei pozzetti di un gel di poliacrilamide al 10%, accanto ad uno standard costituito da proteine di peso molecolare noto. Infine è stata effettuata una corsa elettroforetica verticale a 150 V per circa 2 h.

## Western blotting

Terminato lo scorrimento elettroforetico, le proteine sono state trasferite su un filtro di nitrocellulosa mediante *elettroblotting* (20 V *overnight*), in presenza di transfer buffer (glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS allo 0.037%, metanolo al 20%). Per controllare l'avvenuto trasferimento e l'uniformità della quantità di proteine caricate nei pozzetti, il filtro è stato colorato con rosso Ponceau, un colorante che lega reversibilmente le proteine. Dopo avere effettuato una serie di lavaggi con TBST (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0.005%, ph 7.5), è stata aggiunta al filtro una soluzione di *blocking* (latte al 1% in TBST), in modo da schermare il filtro e ridurre i legami aspecifici tra le proteine presenti nel filtro e l'anticorpo da impiegare nella successiva fase di *detection*. È stata quindi aggiunta una soluzione contenente l'anticorpo primario specifico (1 µg/ml di TBST) ed il filtro è stato mantenuto in incubazione *overnight*.

Gli anticorpi primari adoperati per identificare p-JNK, p65 e vimentina sono stati forniti da Santa Cruz Biotechnology. Dopo l'incubazione, il filtro è stato sottoposto a tre lavaggi in TBST di 10 minuti ciascuno, ed è stato incubato per 1 h in TBST contenente l'anticorpo secondario (diluizione 1:3000) coniugato con la fosfatasi alcalina (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Le bande sono state evidenziate mediante

l'aggiunta dei substrati della fosfatasi alcalina: BCIP o 5-bromo-4-cloro-indolil fosfato (16.5  $\mu$ l) e NBT o nitroblue di tetrazolio (33  $\mu$ l) in 5 ml di AP buffer, costituito da Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, pH 8.9. La fosfatasi agisce sui substrati causando la formazione di colore blue-viola in corrispondenza della banda in cui è localizzata la proteina bersaglio.

L'omogeneità del contenuto proteico delle singole prove è stata accertata mediante immunoblotting per l'actina.

### **Saggio di migrazione cellulare – Scratch wound healing assay**

Il wound healing è un test sviluppato per la valutazione *in vitro* della capacità di migrazione e proliferazione cellulare.

Le cellule MDA-MB231 ( $2 \times 10^5$  cellule/pozzetto) sono state seminate in piastre a 6 pozzetti. Raggiunto il 100% di confluenza, è stato creato un graffio sul monostrato cellulare raschiandolo con un puntale di pipetta sterile. Il monostrato cellulare è stato dunque lavato con PBS per rimuovere le cellule galleggianti ed è stato aggiunto terreno addizionato con DMAPT 25  $\mu$ M. Nelle prove controllo le cellule sono state incubate in presenza del solo terreno di coltura.

Le immagini (5/campo) della superficie graffiata sono state acquisite (con ingrandimento 100x) usando un microscopio Leica DMR dotato di

fotocamera digitale DC300F subito dopo aver effettuato lo scratch e dopo 4, 8 e 16 h di incubazione con DMAPT. Le immagini del monostrato trattato con DMAPT sono state confrontate con quelle del monostrato controllo per valutare gli effetti del DMAPT sulla capacità delle cellule di ripopolare l'area mancante di cellule e la percentuale dell'area di chiusura è stata calcolata mediante l'utilizzo del software ImageJ.

### **Animali utilizzati per gli esperimenti *in vivo***

Topi atimici nudi (Fox1 nu/nu) femmine di quattro settimane di età sono stati ottenuti da Harlan (Udine, Italia). Gli animali sono stati stabulati in condizioni esenti da organismi patogeni. Prima di svolgere le attività sperimentali è stata data agli animali una settimana di tempo per l'acclimatamento. Questo ha permesso loro di recuperare lo stress del trasporto e di riconoscere il nuovo ambiente con le sue caratteristiche e variabilità. Gli animali sono stati alloggiati in gruppi di massimo 3 per gabbia e cibo ed acqua sono stati forniti *ad libitum*, in un ciclo luce/buio di 12 ore. Gli animali da laboratorio sono stati trattati in conformità con le linee guida nazionali e internazionali attuali (il decreto legislativo italiano 116/92 e la Direttiva della Comunità Europea 86/609 CEE), in conformità alla autorizzazione da parte del Ministero della Salute Italiano.

### **Prove di tumorigenicità *in vivo***

Circa  $2 \times 10^6$  cellule (200  $\mu$ l di sospensione cellulare in PBS) sono state iniettate nel pannicolo adiposo mammario di 5 topi, utilizzando un ago calibro 25. In altri 5 topi sono state iniettate  $2 \times 10^6$  cellule risospese in PBS e matrigel (BD Biosciences) in rapporto 1:1 (200  $\mu$ l di sospensione). Solo matrigel è stato iniettato nei 5 topi del gruppo di controllo. Il peso corporeo degli animali è stato misurato tre volte a settimana. Le dimensioni dei tumori indotti sono state determinate tutti i giorni mediante misurazione con il calibro ed i volumi calcolati con la formula:  $v = \text{lunghezza} \times (\text{larghezza})^2 / 2$ .

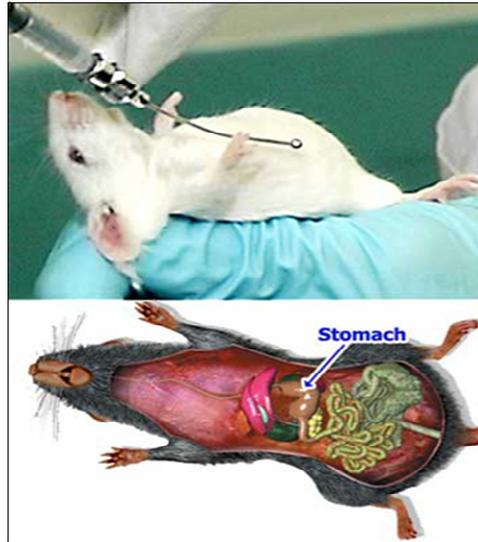
I topi sono stati sacrificati quando il peso del nodulo tumorale ha raggiunto il 10% del peso corporeo normale dell'animale, o quando sono state riscontrate ulcere tumorali o altre condizioni di morbilità, in conformità con le linee guida istituzionali che sono in conformità con le regolamentazioni nazionali (DL 116 GU, Suppl. 40. 18 febbraio, 1992) ed internazionali (ECC direttiva del Consiglio 86/609, GU L358.1, 12 dic 1987). Alla fine dell'esperimento, i topi sono stati sacrificati con eccesso di CO<sub>2</sub>.

Questo studio è stato autorizzato dal Ministero della Salute italiano.

## **Prove di efficacia antitumorale del DMAPT**

Sospensioni di  $2 \times 10^6$  di cellule MDA-MB231 in 200  $\mu$ l di PBS sono state inoculate nel pannicolo adiposo mammario dei topi utilizzando un ago calibro 25. Quando i tumori sono diventati palpabili, i topi sono stati suddivisi in due gruppi di 10 animali ciascuno, distribuendo equamente i volumi dei tumori tra i due gruppi. Un gruppo di topi è stato trattato giornalmente con 50 mg/kg DMAPT (Biomol - Enzo Life Science), preparato in una soluzione al 50% di etanolo in un volume di 100  $\mu$ l, somministrata mediante sonda gastrica (gavage) (Figura 9). Il gruppo di controllo ha ricevuto ogni giorno soltanto il veicolo somministrato mediante sonda gastrica.

Il peso corporeo degli animali è stato misurato tre volte a settimana. Le dimensioni dei noduli tumorali sono state determinate tutti i giorni mediante misurazione con il calibro ed i volumi calcolati con la formula  $v = \text{lunghezza} \times (\text{larghezza})^2 / 2$ .



**Figura 9. Gavage**  
(<http://pics6.this-pic.com/key/gavage%20rat>)

I topi sono stati sacrificati quando il peso del nodulo tumorale ha raggiunto il 10% del peso corporeo normale dell'animale, o quando sono state riscontrate ulcere tumorali o altre condizioni di morbilità, in conformità con le linee guida istituzionali che sono in conformità con le regolamentazioni nazionali (DL 116 GU, Suppl. 40. 18 febbraio, 1992) ed internazionali (ECC direttiva del Consiglio 86/609, GU L358.1, 12 dic 1987). Alla fine dell'esperimento, i topi sono stati sacrificati con eccesso di CO<sub>2</sub>.

Questo studio è stato autorizzato dal Ministero della Salute italiano.

## **Istologia - Colorazione ematossilina - eosina**

Dai preparati di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina si sono ottenute sezioni dello spessore di 4  $\mu\text{m}$  che sono state fissate su appositi vetrini porta-oggetto trattati con silano (3-amminopropil-trieossi-silano) onde evitare il distacco durante la colorazione.

I preparati così ottenuti sono stati asciugati una notte in stufa a 37°C. Si è dunque proceduto alla eliminazione della paraffina (sparaffinatura) mediante trattamento con il solvente xilolo per 20 min. Successivamente il solvente è stato eliminato con l'etanolo facendo percorrere ai vetrini la serie discendente degli alcoli (100°, 95°, 75° e 50°). Dopo un lavaggio in acqua distillata, i vetrini sono stati colorati con l'ematossilina di Harris, immergendoli nel colorante per circa 12 min. Si è proseguito con un lavaggio in acqua di fonte per 5 min, per eliminare il colorante in eccesso, un lavaggio con acqua distillata ed infine alcuni secondi in HCl 1% per farne virare la tonalità verso il viola. Dopo aver ripetuto i lavaggi in acqua di fonte ed in acqua distillata, si è proceduto con la colorazione mediante eosina per circa 40 sec. A questo è seguito la scala ascendente degli alcoli (50°, 75°, 95° e 100°) e la chiarificazione in xilolo. Dopo quest'ultima fase i vetrini sono stati montati in balsamo sintetico (EUKITT, Kartell).

Per studiare le metastasi polmonari, da ciascun polmone sono state ottenute

tre sezioni. Queste sono state esaminate con ingrandimento 50x e le sezioni dei polmoni degli animali trattati con DMAPT sono state confrontate con sezioni ottenute dai polmoni dei topi controllo. L'area relativa di metastasi è stata analizzata mediante l'utilizzo del software NIS-Elements (Nikon Instruments).

### **Immunoistochimica**

Dai preparati di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina si sono ottenute sezioni dello spessore di 4  $\mu\text{m}$  che sono state fissate su appositi vetrini porta-oggetto trattati con silano onde evitare il distacco durante la procedura immunoistochimica. I preparati così ottenuti sono stati asciugati una notte in stufa a 37°C. Si è dunque proceduto alla sparaffinatura mediante trattamento con il solvente xilolo per 20 min. Successivamente il solvente è stato eliminato con l'etanolo facendo percorrere ai vetrini la serie discendente degli alcoli (100°, 95°, 75° e 50°). Dopo un lavaggio in acqua distillata, i vetrini sono stati riscaldati in soluzione di citrato di sodio (pH 6.0) a 96°C per 20 min per il recupero dell'antigene. È stato effettuato un lavaggio in acqua distillata ed è stata bloccata l'attività perossidasi endogena con perossido di idrogeno al 3% in metanolo per 30 min. Dopo aver effettuato 3 lavaggi in PBS, i vetrini sono stati trattati con 1% di

sieroalbumina bovina (BSA) in PBS per 30 min. In seguito, i vetrini sono stati posti ad incubare per una notte a 4°C in presenza di BSA 0.1% con uno dei seguenti anticorpi: anticorpo monoclonale murino anti-p-JNK (1:50), monoclonale murino anti-NF-kB (p65) (1:50), policlonale di coniglio anti-MMP-2 (1:50), monoclonale murino anti-MMP-9 (1:50), monoclonale murino anti-VEGF (1:50), monoclonale murino anti-antigene nucleare umano (1:20). Tutti questi anticorpi sono stati forniti da Santa Cruz Biotechnology, ad eccezione dell'anticorpo anti-VEGF fornito dalla R&D Systems e dell'anticorpo anti-antigene nucleare fornito dalla Lifespan Biosciences.

Dopo aver effettuato 3 lavaggi in PBS, le sezioni sono state incubate per 30 min con l'anticorpo secondario biotinilato anti-mouse, anti-rabbit e anti-goat (DAKO). Le sezioni sono state lavate con PBS ed incubate con la streptavidina coniugata con perossidasi per 1 h, seguita dal cromogeno 3-3' tetrahydrochloride diamminobenzidine per 1 min, e contrastate con ematossilina di Mayer. L'immunoreattività di questi anticorpi è stata accertata mediante il metodo streptavidina-biotina (LSAB; Dako) secondo le istruzioni del produttore. Dopo aver effettuato un lavaggio in acqua di fonte ed i risciacqui in acqua distillata, i vetrini sono stati immersi in una serie ascendente degli alcoli (50°, 75°, 95° e 100°) e chiarificati in xilolo. Dopo quest'ultima fase i vetrini sono stati montati in balsamo sintetico

(EUKITT, Kartell).

Tutte le sezioni immunocolorate sono state analizzate con un ingrandimento 400x (5 campi) con un microscopio ottico Leica DMLB. Le immagini digitali sono state analizzate mediante il programma ImageJ per valutare la percentuale di area positiva agli anticorpi utilizzati nelle analisi di immunoistochimica (*Vrekoussis T. et al., 2009*).

## **RISULTATI**

## **Effetti citotossici del Partenolide e del DMAPT in cellule MDA-MB231 in coltura**

Studi precedentemente condotti presso il laboratorio di Biochimica dove ho sviluppato questa tesi, hanno dimostrato che il Partenolide induce marcati effetti citotossici in cellule MDA-MB231 attraverso un meccanismo che risulta indipendente dall'attivazione delle caspasi e correlato con la produzione di specie reattive dell'ossigeno (*D'Anneo A. et al., 2013*).

Su questa base di conoscenze, sono state condotte alcune analisi per valutare se il DMAPT avesse effetti simili al PN sulle cellule MDA-MB231 in coltura.

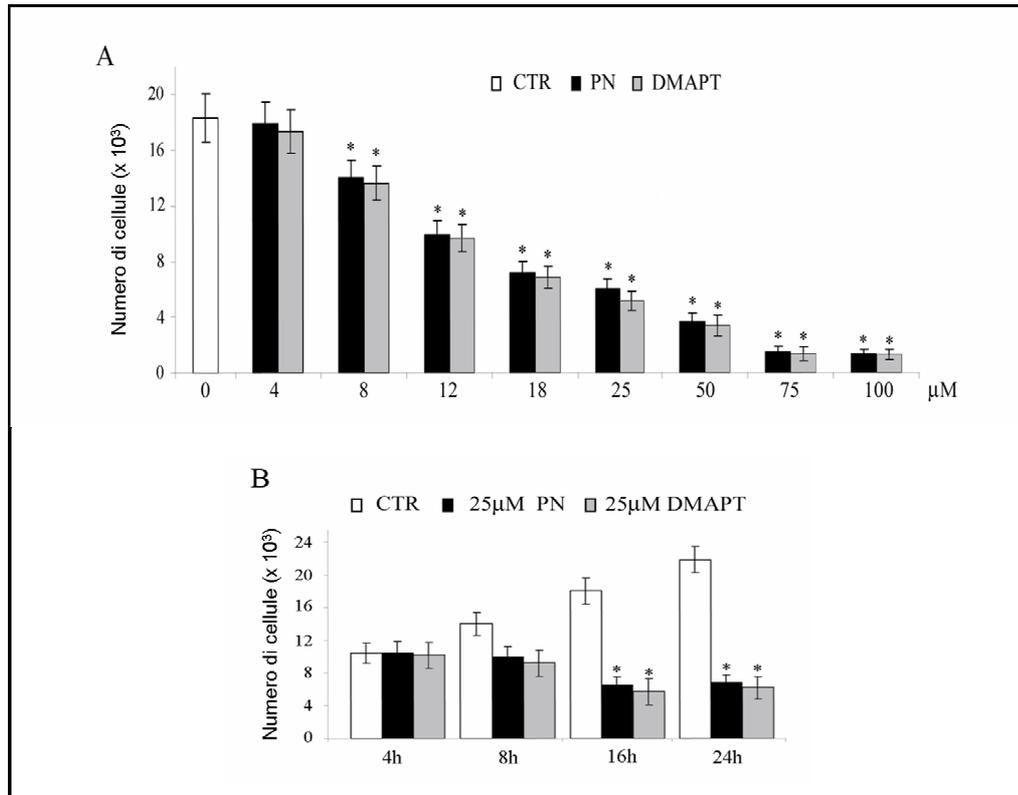
E' stato inizialmente valutato l'effetto esercitato dal DMAPT sulla vitalità cellulare, confrontandolo con l'effetto esercitato dal PN.

La vitalità cellulare è stata valutata mediante il saggio colorimetrico dello MTT che misura l'attività delle deidrogenasi mitocondriali.

Le cellule MDA-MB231, seminate come riportato in Materiali e Metodi, sono state trattate con diverse concentrazioni (4-100  $\mu\text{M}$ ) sia di PN che di DMAPT per 16 h. Come si può notare nella Figura 10 A, il trattamento delle cellule con concentrazioni crescenti dei due composti determina un decremento della vitalità cellulare dose-dipendente. In particolare, impiegando la concentrazione di 25  $\mu\text{M}$  si determina una riduzione della

vitalità del 70% con il DMAPT e del 64% con il PN. Questi dati preliminari suggeriscono che i due sesquiterpeni lattoni esercitano un effetto citotossico simile.

Lo studio della vitalità cellulare, valutata a diversi tempi di trattamento, impiegando la concentrazione 25  $\mu$ M sia di PN che di DMAPT, ha dimostrato che l'effetto è tempo-dipendente (Figura 10 B). Dopo 4 h di incubazione i composti non sembrano modificare la vitalità delle cellule MDA-MB231 rispetto al controllo trattato con il solo veicolo. Dopo 8 h la vitalità cellulare inizia a decrementare riducendosi progressivamente nel tempo fino a raggiungere, dopo 16 h, il 36% con il PN ed il 30% con il DMAPT.



**Figura 10. Effetti citotossici esercitati dal Partenolide e dal DMAPT sulla vitalità cellulare.**

A) Dose dipendenza dell'effetto esercitato da Partenolide e dal DMAPT a 16 h di trattamento. B) Tempo dipendenza dell'effetto esplicato dal Partenolide 25 µM e dal DMAPT 25 µM. La vitalità cellulare è stata valutata mediante saggio colorimetrico MTT come descritto nei Materiali e Metodi. Il controllo è rappresentato dalle cellule trattate nelle stesse condizioni con il solo veicolo. Sull'asse delle x sono riportate, in (A), le diverse concentrazioni del composto, mentre in (B) sono indicate le differenti ore di trattamento; l'asse delle y indica il numero di cellule vitali. I risultati riportati in (A) e (B) sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

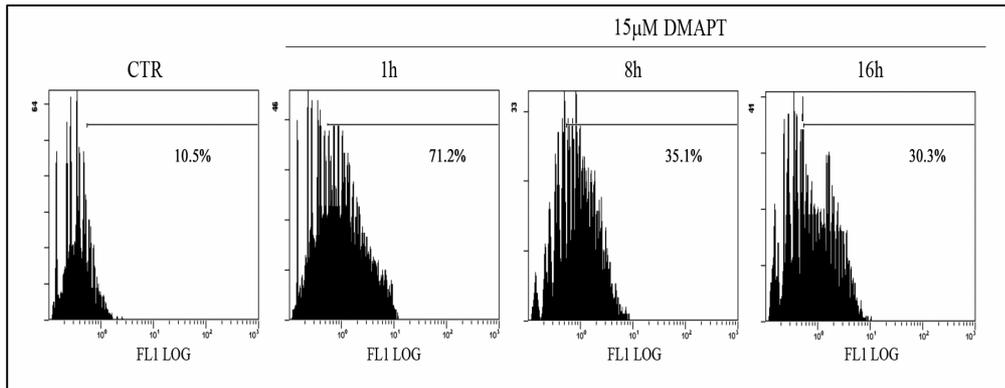
## **Il DMAPT determina produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) in cellule MDA-MB231 in coltura**

Precedenti studi condotti in cellule MDA-MB231 in coltura hanno dimostrato che il Partenolide stimola, già dalle prime ore di trattamento (1-3 h), la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Ciò si accompagna a deplezione di gruppi tiolici e glutazione, attivazione di c-Jun N-terminal kinase (JNK) e down-regulation del fattore nucleare kB (NF-kB). Prolungando il tempo di trattamento (5-20 h) la produzione di ROS favorisce la dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale e la comparsa di eventi necrotici (*D'Anneo A. et al., 2013*).

Alla luce di questi risultati, è stato valutato l'effetto del DMAPT sulla produzione di ROS. A tale scopo sono state condotte analisi citofluorimetriche per valutare la presenza di ROS in cellule trattate per diversi tempi (1, 8 e 16 h) con DMAPT 15  $\mu$ M. Le analisi sono state eseguite (come riportato in Materiali e Metodi) dopo incubazione delle cellule con il fluorocromo H<sub>2</sub>-DCFDA e la produzione di ROS è stata quantificata in base alle variazioni nell'intensità di fluorescenza della diclorofluoresceina (DCF).

Come dimostra la Figura 11, il trattamento con DMAPT 15  $\mu$ M determina una notevole produzione di ROS già dopo 1 h dal trattamento. Questo

effetto diminuisce dopo 8 h e 16 h ma si mantiene per tutto il tempo di esposizione al composto.



**Figura 11. Produzione di ROS ottenuta dopo trattamento delle cellule MDA-MB231 con DMAPT.**

I ROS intracellulari rilevati utilizzando il fluorocromo H2-DCFDA sono stati misurati dal citofluorimetro EPICS XL. Le cellule MDA-MB231 ( $2 \times 10^5$ ) sono state trattate con DMAPT 15  $\mu$ M. In seguito, le cellule sono state raccolte, lavate con HBSS ed incubate con H2-DCFDA 50  $\mu$ M per 30 min a 37°C al buio. Dopo centrifugazione (120 g per 5 min), le cellule sono state risospese in HBSS ed analizzate usando un citofluorimetro con impostazioni di eccitazione e di emissione rispettivamente a 480 e 525 nm.

## **Effetto del trattamento con DMAPT su p65 e JNK fosforilato in cellule MDA-MB231 in coltura**

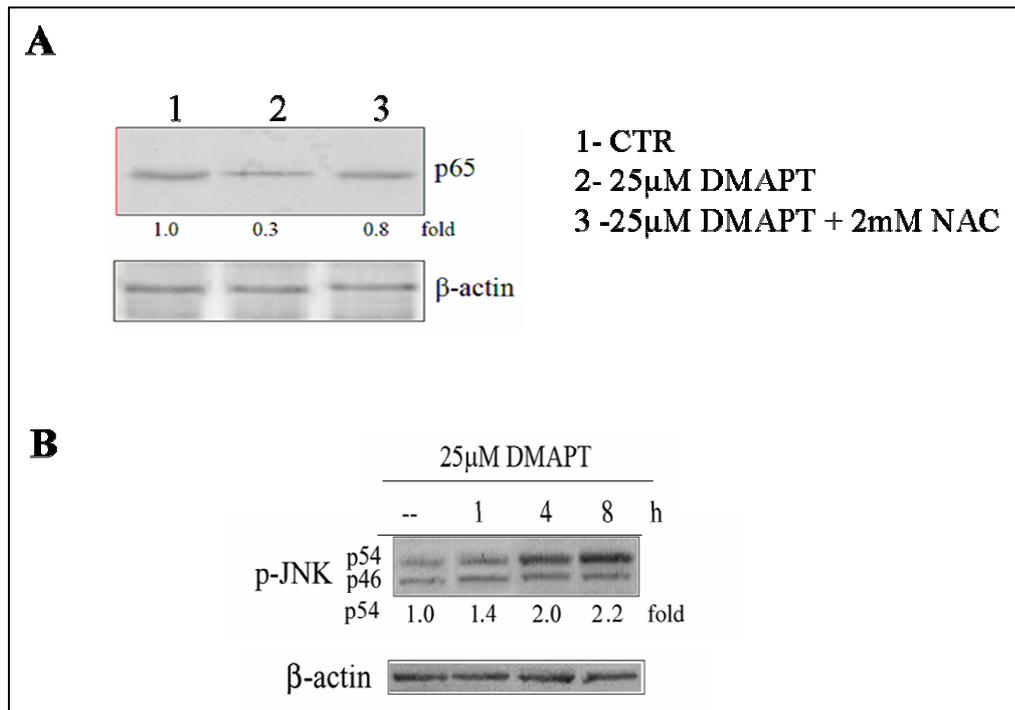
Come riportato nell'introduzione, p65 è una subunità del fattore di trascrizione NF-kB, ubiquitariamente espresso, che regola diverse funzioni vitali per la cellula quali il ciclo cellulare, il differenziamento e la proliferazione. E' stato anche dimostrato che alterazioni dei pathways regolati da NF-kB possono avere un ruolo sia nella crescita tumorale che nei processi di invasività e metastasi (*Baldwin A. S. et al., 2001*).

La Figura 12 A mostra l'effetto del DMAPT su p65 valutato mediante Western blotting. Il trattamento con DMAPT 25  $\mu$ M per 16 h riduce i livelli di p65. L'aggiunta dell'agente antiossidante N-Acetilcisteina (NAC) contrasta parzialmente questo effetto, suggerendo che i ROS generati dal DMAPT contribuiscono alla riduzione dei livelli di p65 (Figura 12 A).

E' stato precedentemente dimostrato (*D'Anneo A. et al., 2013*) che il trattamento delle cellule MDA-MB231 con PN si accompagna a produzione di ROS e all'attivazione di JNK, una proteina attivata mediante fosforilazione in risposta allo stress ossidativo.

Qui è stato valutato l'effetto del DMAPT su JNK fosforilato (p-JNK) mediante analisi di Western blotting. I risultati hanno dimostrato che il DMAPT, come il PN, determina l'incremento di p-JNK; l'effetto è

evidente già dopo 1 h di trattamento ed incrementa dopo 4 e 8 h di esposizione al composto (Figura 12 B).



**Figura 12: Effetti del trattamento con DMAPT su p65 e p-JNK in cellule MDA-MB231.**

A) Le cellule MDA-MB231 sono state trattate con DMAPT 25 µM da solo o in presenza di NAC 2 mM per 16 h. B) Le cellule MDA-MB231 sono state trattate con DMAPT 25 µM per 1, 4 e 8 h. A e B) Al termine del trattamento le cellule sono state lisate e sono state condotte analisi di Western blotting con anticorpi specifici.

L'omogeneità del contenuto proteico delle singole prove è stata accertata mediante immunoblotting per la β-actina.

## **Il DMAPT inibisce la capacità di migrazione delle cellule MDA-MB231 in coltura**

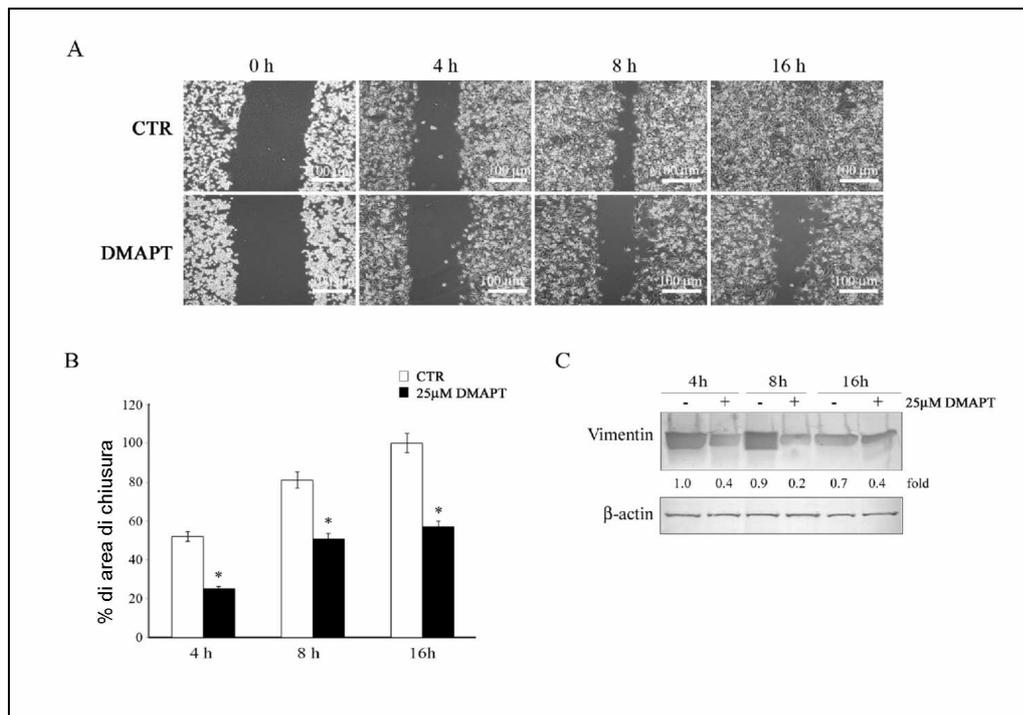
Per studiare l'effetto del DMAPT sulla capacità di migrazione delle cellule MDA-MB231 *in vitro* è stato condotto uno scratch wound healing assay. È stato effettuato, pertanto, un solco lineare in un monostrato di cellule a confluenza e dopo trattamento con DMAPT, è stata valutata nel tempo la capacità delle cellule di migrare nell'area mancante di cellule ripopolandola. La chiusura di quest'area è stata misurata in tempi diversi mediante l'utilizzo di un software e la capacità cellulare di migrare è stata espressa come percentuale dell'area di chiusura.

La Figura 13 (A e B) mostra che, rispetto al controllo, le cellule trattate con DMAPT hanno un significativo ritardo nel ripopolare l'area mancante di cellule. Ciò suggerisce che il composto esercita un effetto antimigratorio sulle cellule MDA-MB231.

È stata anche studiata la capacità del DMAPT di influenzare la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) valutando il suo effetto sull'espressione della vimentina, un marker mesenchimale.

Le analisi di Western blotting hanno dimostrato che le cellule MDA-MB231 esprimono un elevato livello di vimentina che, in seguito al

trattamento con DMAPT, viene ridotto dopo 4 h e 8 h di trattamento del 60% e 78% rispettivamente (Figura 13 C).

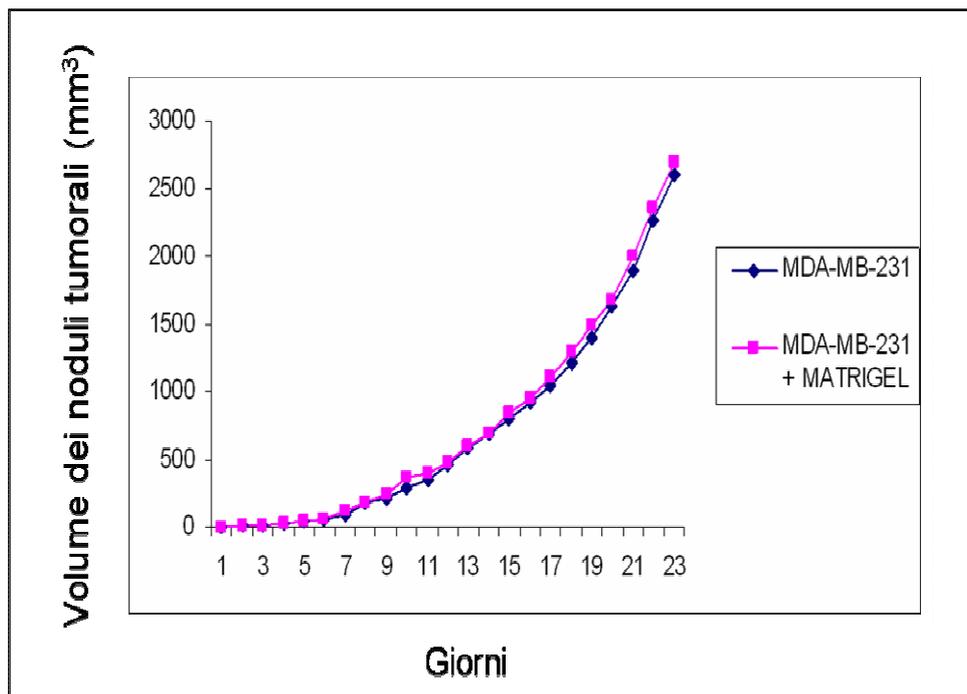


**Figura 13. Il DMAPT inibisce la motilità delle cellule MDA-MB231.**

(A-B) Il monostrato cellulare è stato graffiato con un puntale di pipetta sterile e trattato con DMAPT 25 µM. La motilità cellulare è stata valutata mediante microscopia ottica. (A) Immagini rappresentative della zona graffiata sono state acquisite a 0, 4, 8 e 16 h. Barre di scala, 100 µm. (B) L'istogramma rappresenta la percentuale di chiusura della zona graffiata determinata mediante software ImageJ come descritto in Materiali e Metodi. I dati sono presentati come percentuale di area ripopolata dalle cellule tra 4 e 16 h. (C) Il DMAPT determina una riduzione dell'espressione del marker mesenchimale vimentina. Le cellule sono state trattate per 4, 8 e 16 h con DMAPT 25 µM, sono stati preparati i lisati cellulari e sottoposti a Western blotting come riportato nei Materiali e Metodi. In (A) e (C) i risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. In (B) i valori sono le medie di tre esperimenti indipendenti ± SE \*p < 0.01 rispetto al controllo non trattato.

## **Tumorigenicità delle cellule MDA-MB231 in topi immunodepressi**

Prima di valutare l'efficacia del DMAPT *in vivo* sono state eseguite prove di tumorigenicità *in vivo* delle cellule MDA-MB231 per valutare sia la capacità di tali cellule (inoculate con o senza matrigel) di indurre tumori in topi nudi che l'andamento della crescita dei noduli tumorali e la formazione di metastasi. Per tale motivo,  $2 \times 10^6$  di cellule MDA-MB231 risospese in PBS sono state inoculate nel pannicolo adiposo mammario di 5 topi nudi femmine. Altri 5 topi sono stati inoculati con le cellule ed il matrigel. Un numero uguale di animali, inoculati solo con PBS e matrigel, è stato utilizzato come controllo. I noduli tumorali hanno iniziato a svilupparsi in tutti i topi dopo 8 giorni dall'inoculazione delle cellule. Il volume medio dei noduli tumorali del gruppo di animali inoculati solo con le cellule dopo 7, 14 e 21 giorni ha raggiunto rispettivamente, 100, 685 e 1900 mm<sup>3</sup>. Per il gruppo che ha ricevuto cellule e matrigel, dopo lo stesso numero di giorni, il volume medio dei noduli ha raggiunto rispettivamente, 120, 700, 2000 mm<sup>3</sup>. I dati indicano che l'impiego del matrigel non influenza la crescita tumorale dal momento che i noduli degli animali inoculati con cellule e matrigel hanno raggiunto volumi pressoché simili a quelli dei noduli degli animali inoculati con sole cellule (Figura 14). Negli animali inoculati solo con PBS e matrigel non si sono sviluppati noduli tumorali.

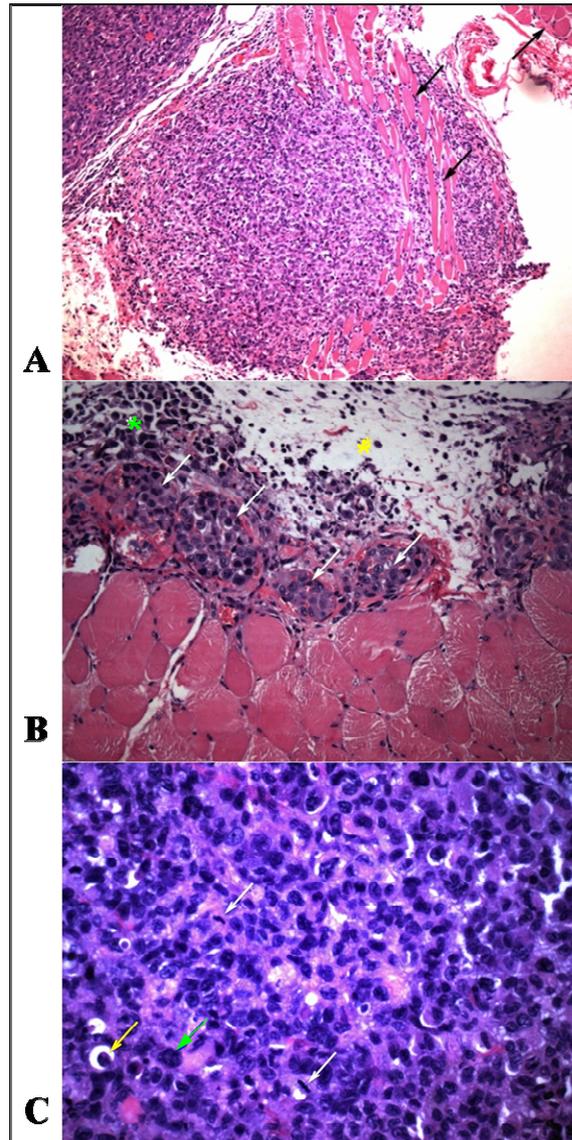


**Figura 14. Prova di tumorigenicità *in vivo* delle cellule MDA-MB231: crescita dei noduli tumorali indotti.**

Cellule MDA-MB231 ( $2 \times 10^6$ ) risospese in PBS sono state inoculate nel pannicolo adiposo mammario di 5 topi nudi femmine e cellule e matrigel sono state inoculate in altri 5 topi. Un numero uguale di animali, inoculati solo con PBS e matrigel, è stato utilizzato come controllo. Sull'asse delle x sono riportati i giorni trascorsi dall'inoculo delle cellule; sull'asse delle y è indicata la media dei volumi dei noduli tumorali (in  $\text{mm}^3$ ).

Come mostra la Figura 15 (A e B), all'analisi istologica i noduli di entrambi i gruppi si presentano con una massa scarsamente delimitata, non incapsulata e riccamente vascolarizzata che invade la muscolatura scheletrica adiacente.

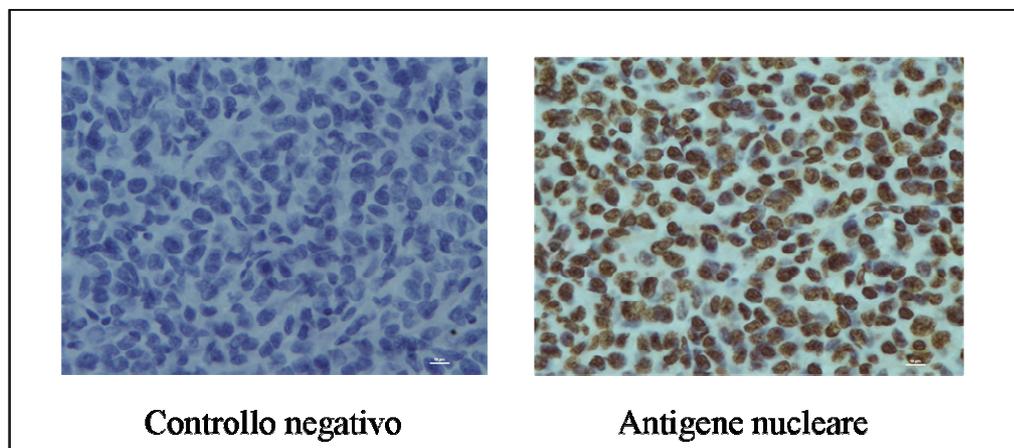
A maggiore ingrandimento si osservano numerose cellule: in mitosi, in apoptosi, multinucleate e multinucleolate; le cellule neoplastiche sono caratterizzate da anisocariosi e anisocitosi marcata (Figura 15 C).



**Figura 15. Analisi istologica dei noduli tumorali indotti dall'inoculo di cellule MDA-MB231 nel pannicolo adiposo mammario di topi nudi.**

A) Una massa scarsamente delimitata e non incapsulata è presente nel tessuto sottocutaneo ed invade la muscolatura scheletrica adiacente (freccie nere). Ingrandimento originale 100x. B) Aggregati di cellule neoplastiche sono visibili all'interno del lume di diverse strutture vascolari adiacenti alla muscolatura scheletrica sottocutanea (freccie bianche). Edema (asterisco giallo) e aggregati di cellule neoplastiche (asterisco verde) sono altresì presenti. Ingrandimento originale 200x. C) La neoplasia è composta da diversi strati di cellule neoplastiche dai contorni citoplasmatici scarsamente definiti e con abbondante citoplasma eosinofilo, nuclei da rotondi ad ovali con nucleoli prominenti. Sono visibili diverse figure mitotiche (freccie bianche), cellule apoptotiche (freccia gialla) e cellule multinucleate (freccia verde). Ingrandimento originale 400x.

Per assicurarsi che il tumore sviluppato fosse di origine umana e non murina sono state condotte analisi di immunoistochimica per valutare la presenza dell'antigene nucleare umano. Questo è risultato espresso in oltre il 90% dei nuclei indicando quindi la prevalenza di cellule di origine umana nel nodulo primario (Figura 16).



**Figura 16. Analisi di immunoistochimica per l'antigene nucleare umano.**

Analisi di immunoistochimica condotte su sezioni di noduli tumorali indotti dall'inoculo di cellule MDA-MB231 nel pannicolo adiposo mammario di topi immunodepressi.

Oltre il 90% delle cellule esprime l'antigene nucleare umano indicando la prevalenza di cellule di origine umana nel nodulo primario. Ingrandimento originale 400x. Barra di scala, 10 micron.

Sono state, inoltre, condotte analisi istologiche su tutti gli organi interni degli animali ed è stata rilevata la presenza di micrometastasi polmonari sia negli animali inoculati con sole cellule che negli animali inoculati con cellule e matrigel.

In considerazione che i risultati ottenuti impiegando il matrigel sono simili a quelli ottenuti senza l'utilizzo del matrigel, si è preferito condurre i successivi esperimenti in assenza di tale composto per riprodurre un sistema più simile a quello che si riscontra nell'uomo.

## **Effetti del DMAPT sulla crescita dei noduli tumorali e sulla sopravvivenza degli animali trattati**

Nei modelli di sviluppo di tumori solidi, il trattamento con composti farmacologici può essere avviato prima dello sviluppo del nodulo tumorale o dopo la comparsa di esso. Se il trattamento è iniziato il giorno dopo o il giorno stesso dell'impianto delle cellule tumorali, l'esperimento consiste in uno studio della inibizione della crescita tumorale. Quando il trattamento è iniziato in seguito alla formazione di un nodulo tumorale (50-200 mm<sup>3</sup>) si valuta il ritardo della crescita del tumore. Entrambe le tipologie di valutazione richiedono che i composti siano somministrati agli animali a dosi non tossiche in modo che la risposta del tumore al trattamento possa essere osservata per un periodo di tempo relativamente lungo (*Teicher B. A., 2006*).

Obiettivo degli esperimenti riportati in questa tesi è stato valutare l'efficacia del DMAPT nel ritardare la crescita di xenotrapianti di carcinoma mammario triplo negativo. A tale scopo, sono state inoculate cellule MDA-MB231 (2 x 10<sup>6</sup> cellule in PBS) nel pannicolo adiposo mammario di topi nudi femmine. Quando i noduli tumorali indotti hanno raggiunto dimensioni palpabili di circa 200 mm<sup>3</sup> i topi sono stati suddivisi, in maniera random, in due gruppi di 10 topi ciascuno. Il gruppo degli

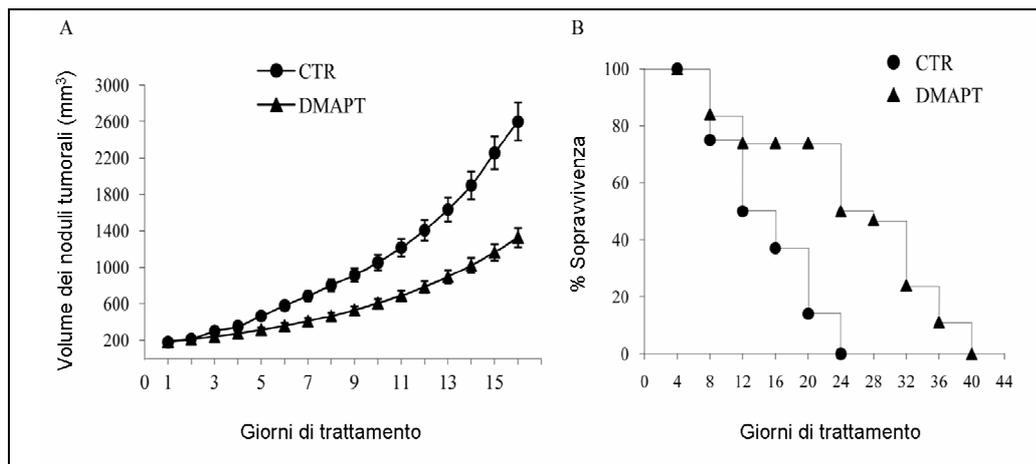
animali trattati ha ricevuto giornalmente DMAPT (50 mg/Kg) solubilizzato in etanolo al 50% mediante gavage. In base a studi precedentemente condotti da Guzman e collaboratori, è stata impiegata una dose di DMAPT considerata non tossica (*Guzman M. L. et al., 2007*). Il gruppo degli animali controllo ha ricevuto giornalmente soltanto etanolo al 50% mediante la stessa via di somministrazione.

Il trattamento con DMAPT ha ritardato notevolmente la crescita dei noduli tumorali degli animali trattati rispetto a quella dei noduli degli animali controllo: si è infatti osservata una riduzione del 40,3% dopo 7 giorni di trattamento e del 48,3% dopo 15 giorni (Figura 17 A).

La somministrazione a lungo termine del DMAPT è stata ben tollerata dagli animali. Non sono stati osservati, infatti, segni di tossicità, quali ad esempio perdita di peso degli animali o evidente tossicità degli organi interni durante l'esame autoptico. In particolare, le analisi istologiche hanno rilevato l'assenza di caratteri anormali in fegato, esofago, reni, milza e stomaco degli animali trattati.

Sono state altresì valutate le percentuali di sopravvivenza (calcolate ogni quattro giorni) degli animali coinvolti nello studio durante tutto il tempo di trattamento con il DMAPT. Le curve ottenute dall'analisi di Kaplan-Meier (*Tripepi G. et al., 2004*) hanno dimostrato che gli animali trattati con DMAPT sopravvivono più a lungo rispetto agli animali controllo. Le curve

di sopravvivenza mostrano, infatti, un significativo incremento del tempo mediano di sopravvivenza dai 12 giorni dei topi controllo ai 28 degli animali trattati (Figura 17 B).



**Figura 17. Effetti del DMAPT su modelli di xenotrapianti di cellule di carcinoma mammario umano MDA-MB231 in topi immunodepressi.**

(A) Effetto del DMAPT sulla crescita del tumore. Dopo 8 giorni dall'inoculo delle cellule, quando i noduli tumorali sono diventati palpabili, i topi ( $n = 10$ ) sono stati trattati giornalmente con DMAPT 50 mg/Kg mediante gavage. Sull'asse delle x sono riportati i giorni di trattamento; sull'asse delle y è indicata la media dei volumi dei noduli tumorali (in  $\text{mm}^3$ ). La progressione della crescita dei noduli tumorali degli animali trattati con DMAPT è stata confrontata con quella dei noduli dei topi controllo trattati con solo veicolo del DMAPT.

(B) Curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier. I topi trattati con DMAPT hanno mostrato una sopravvivenza prolungata rispetto ai topi trattati con il solo veicolo del DMAPT. Sull'asse delle x sono riportati i giorni di trattamento; sull'asse delle y è indicata la percentuale di sopravvivenza degli animali.

## **Valutazione degli effetti del DMAPT sui noduli tumorali**

Sugli xenografts di cellule MDA-MB231 sono state condotte analisi di immunohistochimica per valutare l'effetto esercitato da DMAPT sui tumori primari, sull'invasività e sui relativi fattori espressi dalle cellule tumorali.

Lo sviluppo delle metastasi è caratterizzato dalla diffusione di cellule tumorali dal tumore primario verso organi distanti e rappresenta una delle principali cause di morbidità e mortalità in milioni di pazienti con carcinoma mammario. Il processo di formazione delle metastasi dipende dalla capacità delle cellule tumorali di invadere la membrana basale e migrare nei tessuti adiacenti.

L'invasione tumorale coinvolge alterazioni nella motilità cellulare, nell'adesione cellulare e nella produzione di proteasi extracellulari (*Kleiner D. E. et al., 1999; Friedl P. et al., 2003*). Tra queste ultime, le metalloproteinasi (MMPs) della matrice, un gruppo di enzimi zinco-dipendente ECM-degradanti, svolgono un ruolo critico nella invasione delle cellule tumorali (*Stallings-Mann M. et al, 2007*).

Grazie ad indagini quantitative eseguite mediante un sistema di analisi delle immagini sulle sezioni immunocolorate è stato possibile osservare, nei noduli tumorali di animali trattati con DMAPT, un sensibile decremento dell'espressione di MMP-2 e MMP-9 (rispettivamente 26% e

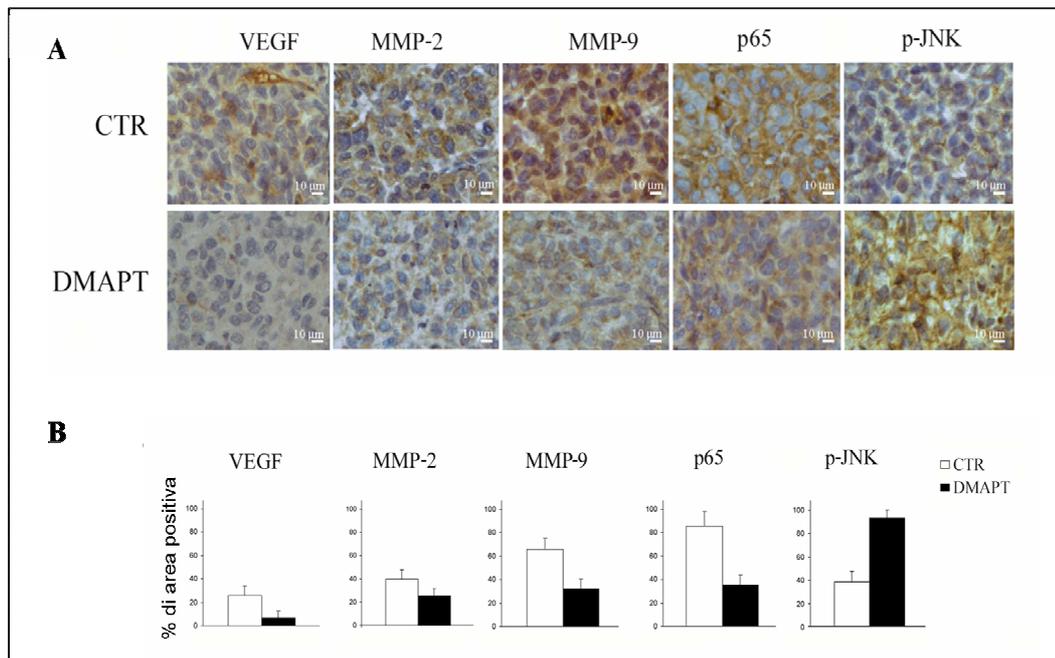
32% di area positiva agli anticorpi anti-MMP2 e anti-MMP-9) rispetto alle sezioni dei noduli degli animali non trattati (rispettivamente 40% e 66% di area positiva agli anticorpi anti-MMP2 e anti-MMP-9) (Figura 18 A e B ). Inoltre, nei noduli degli animali trattati con DMAPT, è stata anche osservata la riduzione dell'espressione di VEGF (7% di area positiva all'anticorpo anti-VEGF rispetto al 26% del controllo) (Figura 18 A e B) un fattore che svolge un ruolo cardine nell'angiogenesi, il processo di crescita di nuovi vasi sanguigni da vasi preesistenti, che rappresenta un requisito essenziale per la proliferazione e diffusione del tumore (*Folkman J., 1971*).

Numerosi studi hanno dimostrato che la capacità di una cellula tumorale di invadere l'ambiente circostante è il risultato di meccanismi di segnalazione cellulari aberranti. La trasduzione del segnale che porta all'invasione tumorale coinvolge fattori diversi: tra questi NF-kB è stato riconosciuto quale importante mediatore della segnalazione pro-invasiva (*Dolcet X. et al., 2005*). NF-kB è target del PN e dati già riportati in questa tesi negli studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che esso è anche coinvolto nel meccanismo d'azione del DMAPT.

In linea con i risultati ottenuti sulle cellule in coltura, nei noduli degli animali trattati con DMAPT, si è osservata una riduzione dell'espressione di p65, subunità del fattore di trascrizione NF-kB di cui sono target

MMP-2, MMP-9 e VEGF. La Figura 18 (A e B) mostra che i noduli degli animali trattati con DMAPT hanno il 35% di area positiva all'anticorpo anti-p65 rispetto ai noduli degli animali controllo che esibiscono lo 85% di area positiva all'anticorpo anti-p65.

Nei noduli degli animali trattati con DMAPT, si è altresì osservato un notevole incremento dell'espressione di p-JNK (99% di area positiva agli anticorpi anti-p-JNK) rispetto al controllo (39% di area positiva agli anticorpi anti-p-JNK) (Figura 18 A e B).



**Figura 18. Analisi di immunoistochimica per VEGF, MMP-2, MMP-9, p65, p-JNK in xenotrapianti di cellule MDA-MB231 in topi immunodepressi.**

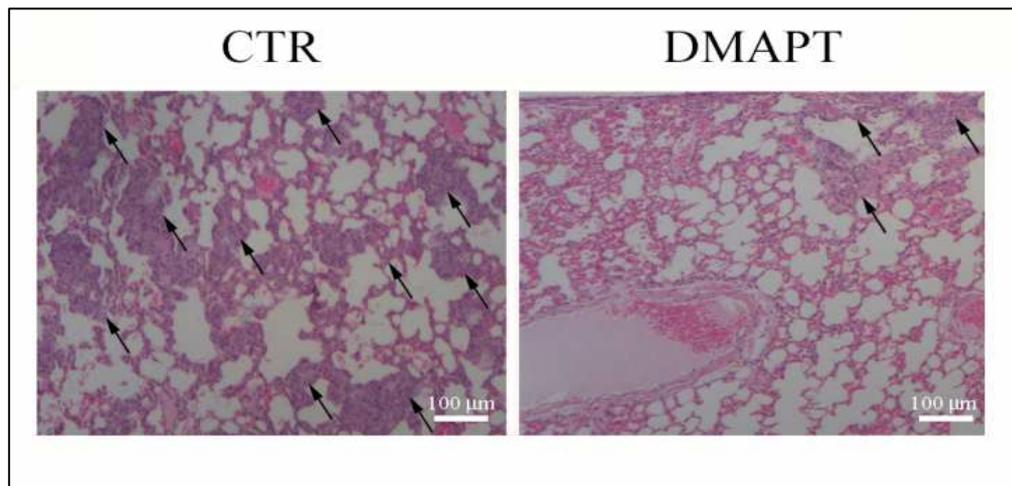
Analisi di immunoistochimica condotte sui noduli tumorali di animali sacrificati dopo 16 giorni dall'inizio del trattamento. Ingrandimento originale 400x. Barra di scala, 10 micron. (B) Dati quantitativi dimostrano che i livelli di VEGF, MMP-2, MMP-9 e p65 diminuiscono dopo il trattamento con DMAPT, mentre incrementa il livello di espressione di p-JNK.

## **Effetto del DMAPT sulle metastasi**

Analisi istologiche sono state condotte, mediante colorazione con ematossilina-eosina, per valutare l'eventuale presenza di metastasi negli organi interni degli animali coinvolti nell'esperimento. Sono state riscontrate metastasi soltanto a livello dei polmoni sia degli animali controllo che degli animali trattati con DMAPT.

Tuttavia la valutazione dell'area relativa di metastasi (calcolata utilizzando un sistema di analisi delle immagini) ha permesso di evidenziare (Figura 19) che la superficie di polmone invasa da cellule cancerose, in topi sacrificati dopo 16 giorni di trattamento, è pari nel controllo al  $17,0 \pm 0,9\%$  mentre nei topi trattati con DMAPT è pari al  $5,7 \pm 0,5\%$ .

I risultati suggeriscono un effetto antimetastatico del DMAPT.



**Figura 19. Metastasi polmonari in animali portatori di xenotrapianti di cellule di carcinoma mammario umano MDA-MB231 non trattati e trattati con DMAPT.**

Analisi istologiche (colorazione ematossilina-eosina) dei polmoni degli animali controllo e trattati con DMAPT per 16 giorni, dimostrano che l'area relativa di metastasi è inferiore nei topi trattati con DMAPT rispetto agli animali non trattati. Le metastasi del polmone sono indicate dalle frecce nere. Barre di scala, 100 micron. I risultati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

## **DISCUSSIONE**

Gli studi riportati in questa tesi si sono proposti di valutare l'efficacia del DMAPT, un analogo solubile del Partenolide, in xenograft di cellule MDA-MB231 in topi immunodepressi. La linea cellulare utilizzata è la più studiata come modello sperimentale di carcinoma mammario umano "triplo negativo", così definito perchè privo dei recettori degli estrogeni, del progesterone e di HER-2/neu.

Queste forme tumorali sono altamente maligne, caratterizzate da un'elevata mortalità e frequente insorgenza di resistenza alle terapie attualmente in uso. E' necessario, pertanto, valutare nuove strategie terapeutiche.

Su queste cellule, nel Laboratorio di Biochimica del Dipartimento di Biomedicina Sperimentale e Neuroscienze Cliniche (oggi STEBICEF), dove ho sviluppato questa tesi, precedentemente è stato studiato il meccanismo di azione del PN *in vitro* (D'Anneo A. et al., 2013). E' stato dimostrato che nelle prime ore di trattamento il PN esercita un effetto citotossico inducendo la produzione ROS che si accompagna a deplezione dei gruppi tiolici e del glutathione, ad attivazione di p-JNK e down-regulation di NF-kB. Durante questa fase il PN stimola anche il processo autofagico. Prolungando il trattamento, la produzione dei ROS favorisce la dissipazione del potenziale di membrana mitocondriale e la comparsa di eventi necrotici.

Nonostante il PN abbia dimostrato effetti promettenti *in vitro*, l'impiego di questo composto naturale come agente terapeutico è fortemente limitato dalla sua scarsa solubilità. Pertanto, per gli studi *in vivo* è stato impiegato il dimetilamino-partenolide (DMAPT), analogo del PN dotato di maggiore solubilità, maggiore biodisponibilità e minore tossicità (*Guzman M. L. et al., 2007*).

Le evidenze sperimentali qui riportate dimostrano che il DMAPT, in modo simile al PN, è in grado di indurre effetti citotossici sulle cellule MDA-MB231 in coltura in maniera dose e tempo dipendente. Analisi di citofluorimetria condotte mediante impiego del fluorocromo H2-DCFDA hanno dimostrato che l'effetto citotossico osservato è correlato all'induzione di stress ossidativo.

Analisi di Western blotting hanno dimostrato, inoltre, che il DMAPT determina una riduzione del livello di p65, uno dei componenti di NF-kB. L'osservazione che l'aggiunta di N-Acetilcisteina alle cellule incubate con DMAPT contrasta questo effetto suggerisce che esso dipenda dalla produzione di ROS. Inoltre, il DMAPT induce *in vitro* un incremento della forma fosforilata attiva di JNK analogamente a quanto dimostrato impiegando il PN (*D'Anneo A. et al., 2013*).

La progressione maligna dei tumori è caratterizzata, oltre che dalla proliferazione cellulare, da migrazione ed invasività, eventi che

rappresentano validi bersagli per l'azione di farmaci antitumorali. Studi sulla migrazione e proliferazione cellulare *in vitro*, valutate mediante il saggio del wound healing, hanno dimostrato che la capacità di ripopolare la zona mancante di cellule è fortemente ostacolata nelle cellule trattate con DMAPT, che hanno mostrato un significativo ritardo della migrazione nell'area vuota rispetto al controllo. Ciò ha suggerito che il DMAPT determina un effetto antimigratorio sulle cellule MDA-MB231.

E' stata anche valutata la capacità del DMAPT di influenzare la transizione epitelio-mesenchimale (EMT). Il termine EMT definisce una serie di eventi attraverso i quali le cellule epiteliali perdono molte delle loro caratteristiche epiteliali e acquisiscono un fenotipo mesenchimale (*Thiery J. P. et al., 2006*). La EMT è un processo dinamico, finemente regolato, importante nell'embriogenesi o nell'organogenesi, che gioca un ruolo chiave anche in alcuni eventi patologici, quali l'insorgenza e la progressione di molti carcinomi (*Lee J. M. et al., 2006*). Le cellule epiteliali che compongono gli epiteli semplici presentano caratteristiche fenotipiche e morfo-funzionali ben definite: si organizzano a formare lamine continue (nelle quali diversi dispositivi giunzionali garantiscono l'adesività fra le cellule stesse), sono polarizzate e scarsamente mobili. Le cellule mesenchimali, al contrario, non si organizzano a formare strutture laminari e fra di loro non si instaurano dispositivi giunzionali stabili ma solo localizzati punti di

adesione focale. Le cellule mesenchimali hanno una forma fusata o stellata, e sono dotate di elevata mobilità (*Thiery J. P. et al., 2006*) che ne permette la migrazione nell'interstizio circostante mediante diversi meccanismi basati sull'emissione di filopodi e pseudopodi (*Friedl P., 2004*). Durante la EMT le cellule epiteliali perdono il loro fenotipo per acquisire quello di cellule mesenchimali; esse si riorganizzano perdendo alcuni marcatori del loro fenotipo epiteliale e ne esprimono altri caratteristici del fenotipo mesenchimale acquisito. La vimentina è una proteina del citoscheletro appartenente alla famiglia dei filamenti intermedi espressa nelle cellule di origine mesenchimale; la rapida induzione di vimentina è stata frequentemente osservata durante la EMT (*Katz E. et al., 2011; Mendez M. G. et al., 2010*). L'espressione di questa può essere predittiva della ricorrenza e del potenziale invasivo delle cellule di tumore della prostata (*Zhang Q. et al., 2009*) e può essere utilizzata per determinare l'origine (basale vs luminale) delle cellule di carcinoma mammario metastatico (*Hugo H. et al., 2007; Gilles C. et al., 1999*).

Qui è stato dimostrato mediante analisi di Western blotting che le cellule MDA-MB231, dotate di fenotipo *mesenchymal-like* (*Lacroix M. et al., 2004*), esprimono un elevato livello di vimentina. Il trattamento con DMAPT determina una notevole riduzione del livello di vimentina, suggerendo che il composto contrasta l'EMT.

Questi primi risultati ottenuti *in vitro*, nel complesso, hanno suggerito che il DMAPT, agendo in cellule MDA-MB231 in modo simile al PN, è in grado sia di esercitare effetti citotossici che di inibire la capacità invasiva delle cellule, caratteristica cruciale per la diffusione e la crescita del tumore.

Nella prima fase degli studi *in vivo*, per valutare l'efficacia del DMAPT, è stata valutata la tumorigenicità delle cellule MDA-MB231. A tale scopo le cellule sono state inoculate in sede ortotopica in topi immunodepressi e sono state valutate la capacità di indurre tumore, la crescita tumorale e la capacità di formare metastasi. In questa fase è stata anche valutata la capacità permissiva del matrigel su questi eventi. I noduli tumorali si sono sviluppati in tutti gli animali già dopo 8 giorni dall'inoculo delle cellule e la presenza del matrigel non ha influenzato lo sviluppo del tumore primario e delle metastasi; pertanto si è stabilito di non impiegare questo composto nelle successive prove di efficacia del DMAPT. Il tumore primario indotto si è presentato privo di capsula, scarsamente delimitato, riccamente vascolarizzato e capace di invadere la muscolatura adiacente al punto di inoculo.

Quando cellule cancerose umane vengono inoculate in topi immunodepressi, le cellule che compongono i noduli tumorali devono adeguatamente rappresentare gli stessi tumori umani. Può accadere, infatti, che le cellule impiantate *in vivo* inducano lo sviluppo di cellule murine

trasformate che possono acquisire un fenotipo maligno e comporre in parte o totalmente il nodulo indotto (*Pathak S. et al., 1998*).

Da valutazioni di immunistochemica per l'antigene nucleare umano è risultato evidente che la massa tumorale indotta inoculando MDA-MB231 è composta da cellule di origine umana; essa rappresenta quindi un valido modello sperimentale.

In tutti gli animali in cui sono state inoculate le cellule è stata rilevata la presenza di micrometastasi nei polmoni.

Sulla base di questi risultati sono stati sviluppati gli esperimenti al fine di valutare l'efficacia *in vivo* del DMAPT ed in particolare la sua capacità di ritardare la crescita tumorale. A tale scopo, sono state inoculate cellule MDA-MB231 nel pannicolo adiposo mammario di topi immunodepressi ed il trattamento con il composto ha avuto luogo in seguito alla formazione di noduli tumorali palpabili, impiegando una dose di DMAPT considerata non tossica in base a studi precedentemente condotti da Guzman e collaboratori (*Guzman M. L. et al., 2007*).

Il trattamento con il DMAPT è risultato efficace nel ridurre la crescita dei noduli tumorali rispetto ai volumi raggiunti dai noduli degli animali controllo (trattati con il solo veicolo del DMAPT). La somministrazione del composto è risultata, inoltre, ben tollerata dagli animali che non hanno mostrato segni di tossicità, come confermato dalle analisi istologiche

effettuate *post mortem*. I topi trattati con DMAPT, inoltre, hanno raggiunto percentuali di sopravvivenza sensibilmente superiori a quelle degli animali controllo, come dimostrato dalla formulazione delle curve di Kaplan Meier. Sono state condotte analisi di immunoistochimica su sezioni di noduli tumorali degli animali coinvolti nell'esperimento per valutare l'effetto del DMAPT su alcuni fattori correlati alla morte delle cellule e alle capacità invasive.

Durante l'invasione tumorale, la digestione ed il rimodellamento della matrice extracellulare dei tessuti circostanti il tumore gioca un ruolo chiave. Numerosi studi hanno messo in evidenza la correlazione esistente tra elevati livelli di metalloproteasi (MMPs) ed aggressività tumorale in numerosi carcinomi umani quali il carcinoma ovarico, del colon, del seno, del polmone, del pancreas, della prostata, e del rene (*McCawley L. J. et al., 2000; Catania J. M. et al., 2007*). Le MMPs favoriscono l'invasività tumorale degradando le proteine della matrice extracellulare, attivando sistemi a cascata di trasduzione del segnale e solubilizzando i fattori di crescita che inducono i legami all'interno della matrice stessa. Fra le MMPs, le gelatinasi MMP-2 ed MMP-9 sono le proteasi maggiormente coinvolte, in quanto in grado di degradare il collagene di tipo IV delle membrane basali. In particolare, la MMP-2 è stata indicata quale uno dei principali mediatori dell'invasività tumorale, risulta up-regolata in tumori

altamente maligni ed inoltre la sua espressione è stata correlata al grado di invasività del tumore stesso (*McCawley L. J. et al., 2000*). Le MMP-2 e 9, inoltre, sono importanti marcatori di EMT. Esse sono prodotte dai fibroblasti e risultano up-regolate, favorendo la degradazione delle membrane basali.

Analisi di immunistochemica eseguite su sezioni di noduli tumorali hanno dimostrato che il trattamento con DMAPT riduce sensibilmente l'espressione di MMP-2 e MMP-9 rispetto ai noduli degli animali non trattati. Inoltre, è stata riscontrata una ridotta espressione anche di VEGF, un fattore di crescita coinvolto nel processo di vasculogenesi. Analogamente a quanto avviene per i tessuti sani, anche per i tumori solidi l'accrescimento e la sopravvivenza dipendono dalla presenza di un'estesa rete di vasi sanguigni ed inoltre, la capacità del tumore di formare metastasi dipende in grande misura dallo sviluppo di una propria vascolarizzazione. L'angiogenesi è quindi essenziale per la progressione maligna dei tumori solidi. IL VEGF svolge un ruolo cruciale nello switch angiogenico e di conseguenza, nell'accrescimento della maggior parte dei tumori primari e nella successiva formazione di metastasi (*Jain R. K., 2002*).

In accordo con quanto dimostrato *in vitro*, nelle cellule MDA-MB231 xenotrapiantate *in vivo* si è osservata la riduzione dell'espressione di p65 in seguito al trattamento con DMAPT. Questa proteina è una subunità di NF-

kB, un noto target del PN, che comprende una famiglia di fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione di una grande varietà di risposte biologiche. NF-kB regola l'espressione di geni coinvolti in molti processi che svolgono un ruolo chiave nello sviluppo e nella progressione del cancro quali la proliferazione, la migrazione e l'angiogenesi (tra cui anche MMP-2, MMP-9 e VEGF). L'attivazione aberrante o costitutiva di NF-kB è stata rilevata in molti tumori umani, pertanto, esso rappresenta un interessante bersaglio terapeutico (*Dolcet X. et al., 2005*). In particolare in cellule di carcinoma mammario privo di recettori degli estrogeni sono frequentemente rilevati elevati livelli di NF-kB (*Nakshatri H. et al., 1997*). Infine, in linea con i risultati ottenuti *in vitro*, nei noduli tumorali degli animali trattati con DMAPT rispetto ai noduli degli animali controllo si è osservato un notevole incremento dell'espressione di p-JNK; una proteina attivata in risposta allo stress ossidativo che è stato dimostrato mediare l'azione citotossica del PN in cellule MDA-MB231 in coltura (*D'Anneo A. et al., 2013*).

L'impiego del DMAPT *in vivo* è stato efficace anche nel ridurre le metastasi polmonari; infatti, benché queste si siano sviluppate in tutti gli animali coinvolti nello studio, è risultata evidente una sensibile diminuzione dell'area relativa di metastasi negli animali trattati rispetto agli animali controllo.

Complessivamente i dati prodotti in questo studio sugli effetti del DMAPT in una linea cellulare di adenocarcinoma mammario umano, costituiscono un'incoraggiante evidenza del possibile impiego del composto nel prossimo futuro nella terapia di questa forma tumorale. Ulteriori studi saranno necessari per chiarire la modalità attraverso cui vengono attivati i meccanismi di morte *in vivo*. L'efficacia del PN *in vivo*, inoltre, potrebbe essere migliorata utilizzando il sale fumarato del DMAPT che presenta una buona solubilità in acqua. Infine, un'altra strategia per migliorare l'attività citotossica di PN su cellule di carcinoma mammario potrebbe consistere nella sua combinazione con altri composti in grado di sensibilizzare le cellule all'azione PN. In particolare, presso il laboratorio dove ho sviluppato questa tesi sono in corso studi *in vitro* di combinazione del PN con il SAHA, un inibitore delle deacetilasi istoniche. Studi preliminari hanno dimostrato che il pretrattamento delle cellule MDA-MB231 con SAHA sensibilizza all'azione citotossica di basse dosi di PN. Studi sono in corso per dimostrare i meccanismi alla base di tale interazione.

## **BIBLIOGRAFIA**

- 1) Arbouzova N. I., Zeidler M. P. *JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions*. *Development*. 133 (14): 2605-2616. (2006).
- 2) Baldwin A. S. *Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB*. *The Journal of Clinical Investigation*. 107: 241-246. (2001).
- 3) Bayraktar S., Glück S. *Molecularly targeted therapies for metastatic triple-negative breast cancer*. *Breast Cancer Research and Treatment*. 138 (1): 21-35. (2013).
- 4) Bauer K. R., Brown M., Cress R. D., Parise C. A., Caggiano V. *Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER-2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry*. *Cancer*. 109: 1721-1728. (2007).
- 5) Bosch A., Eroles P., Zaragosa R., Vina J. R., Lluch A. *Triple-negative breast cancer: Molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research*. *Cancer Treatment Reviews*. 36: 206-215. (2010).
- 6) Bromberg J. *Stat proteins and oncogenesis*. *Journal of Clinical Investigation*. 109: 1139-1142. (2002).

- 7) Brueggemeier R. W., Hackett J. C., Diaz-Cruz E. S. *Aromatase Inhibitors in the Treatment of Breast Cancer*. *Endocrine Reviews*. 26 (3): 331-345. (2005).
- 8) Byrd L. G. *Regional localization of the nu mutation on chromosome 11*. *Immunogenetics*. 37: 157-159. (1993).
- 9) Cailleau R., Young R., Olivé M., Reeves W. J. *Breast tumor cell lines from pleural effusions*. *Journal of the National Cancer Institute*. 53: 661-666. (1974).
- 10) Carey L. A., Dees E. C., Sawyer L., Gatti L., Moore D T., Collichio F., Ollila D. W., Sartor C. I., Graham M. L., Perou C. M. *The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes*. *Clinical Cancer Research*. 13: 2329-2334. (2007).
- 11) Carlisi D., D'Anneo A., Angileri L., Lauricella M., Emanuele S., Santulli A., Vento R., Tesoriere G. *Parthenolide sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL by inducing the expression of death receptors through inhibition of STAT3 activation*. *Journal of Cellular Physiology*. 226: 1632-1641. (2011).
- 12) Catania J. M., Chen G., Parrish A. R. *Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies*. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 292 (3): 905-911. (2007).

- 13) Cheang M. C. U., Chia S. K., Voduc D., Gao D., Leung S., Snider J., Watson M., Davies S., Bernard P. S., Parker J. S., Perou C. M., Ellis M. J., Nielsen T. O. *HER-2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. Journal of the National Cancer Institute. 101 (10): 736-750. (2009).
- 14) Cheang M. C. U., Voduc D., Bajdik C., Leung S., McKinney S., Chia S. K., Perou C. M., Nielsen T. O. *Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype*. Clinical Cancer Research. 14 (5): 1368-1376. (2008).
- 15) Chen J. Q., Russo J. *ER $\alpha$ -negative and triple negative breast cancer: Molecular features and potential therapeutic approaches*. Biochimica et Biophysica Acta, 1796: 162-175. (2009).
- 16) Choo J. R., Nielsen T. O. *Biomarkers for Basal-like Breast Cancer*. Cancer. 2: 1040-1065. (2010).
- 17) Cnossen J., Stemmler H. J., Lässig D., Heinemann V. *Long term survival with metastatic breast cancer (MBC): results of a retrospective, single-centre analysis from 2000-2005*. Journal of Clinical Oncology. 26: 1128. (2008).
- 18) Collier H. O., Butt N. M., McDonald-Gibson W. J., Saeed S. A. *Extract of feverfew inhibits prostaglandin biosynthesis*. Lancet. 316: 922-923. (1980).
- 19) Corvinus F. M., Orth C., Moriggl R., Tsareva S. A., Wagner S., Pfitzner E. B., Baus D., Kaufmann R., Huber L. A., Zatloukal K., Beug H.,

- Ohlschläger P., Schütz A., Halbhuber K. J., Friedrich K. *Persistent STAT3 activation in colon cancer is associated with enhanced cell proliferation and tumor growth.* Neoplasia. 7 (6): 545-555. (2005).
- 20) Curry E. A. III, Murry D. J., Yoder C., Fife K., Armstrong V., Nakshatri H., O'Connell M., Sweeney C. J. *Phase I dose escalation trial of feverfew with standardized doses of parthenolide in patients with cancer.* Investigational New Drugs. 22: 299-305. (2004).
- 21) D'Anneo A., Carlisi D., Lauricella M., Emanuele S., Di Fiore R., Vento R., Tesoriere G. *Parthenolide induces Caspace-independent and AIF-mediated cell death in human osteosarcoma and melanoma cells.* Journal of Cellular Physiology. 228 (5): 952-967. (2012).
- 22) D'Anneo A., Carlisi D., Lauricella M., Puleio R., Martinez R., Di Bella S., Di Marco P., Emanuele S., Di Fiore R., Guercio A., Vento R., Tesoriere G. *Parthenolide generates reactive oxygen species and autophagy in MDA-MB231 cells. A soluble parthenolide analogue inhibits tumour growth and metastasis in a xenograft model of breast cancer.* Cell Death and Disease. 4:e891. doi: 10.1038/cddis.2013.415. (2013).
- 23) de Ruijter T. C., Veeck J., de Hoon J. P., van Engeland M., Tjan-Heijnen V. C. *Characteristics of triple-negative breast cancer.* Journal of Cancer Research and Clinical Oncology. 137 (2): 183-192. (2011).

- 24) Dey N., Smith B. R., Leyland-Jones B. *Targeting basal-like breast cancers*. *Current Drug Targets*. 13: 1510-1524. (2012).
- 25) Dent R., Trudeau M., Pritchard K. I., Hanna W. M., Kahn H. K., Sawka C. A., Lickley L. A., Rawlinson E., Sun P., Narod S. A. *Triple negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence*. *Clinical Cancer Research*. 13: 4429-4434. (2007).
- 26) Dolcet X., Llobet D., Pallares J., Matias-Guiu X. *NF- $\kappa$ B in development and progression of human cancer*. *Virchows Archives*. 446 (5): 475-482. (2005).
- 27) Elston E. W., Ellis I. O. *Method for grading breast cancer*. *Journal of Clinical Pathology*. 46: 189-190. (1993).
- 28) Estabrook N. C., Chin-Sinex H., Borgmann A. J., Dhaemers R. M., Shapiro R. H., Gilley D., Huda N., Crooks P., Sweeney C., Mendonca M. S. *Inhibition of NF- $\kappa$ B and DNA double-strand break repair by DMAPT sensitizes non-small-cell lung cancers to X-rays*. *Free Radical Biology & Medicine*. 51 (12): 2249-2258. (2011).
- 29) Ferrajoli A., Faderl S., Ravandi F., Estrov Z. *The JAK-STAT pathway: a therapeutic target in hematological malignancies*. *Current Cancer Drug Targets*. 6 (8): 671-679. (2006).

- 30) Fidler I. J. *The rationale and methods for the use of nude mice to study the biology and therapy of human cancer metastasis*. *Cancer Metastasis*. 5: 29-49. (1986).
- 31) Flanagan S. P. *'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse*. *Genetics Research*. 8: 295-309. (1966).
- 32) Folkman J. *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. *The New England Journal of Medicine*. 285 (21): 1182-1186. (1971).
- 33) Friedl P. *Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration*. *Current Opinion in Cell Biology*. 16 (1): 14-23. (2004).
- 34) Friedl P., Wolf K. *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. *Nature Reviews Cancer*. 3 (5): 362-374. (2003).
- 35) Fukuda K., Hibiya Y., Mutoh M., Ohno Y., Yamashita K., Akao S., Fujiwara H. *Inhibition by parthenolide of phorbol ester-induced transcriptional activation of inducible nitric oxide synthase gene in a human monocyte cell line THP-1*. *Biochemical Pharmacology*. 60: 595-600. (2000).
- 36) García-Piñeres A. J., Castro V., Mora G., Schmidt T. J., Strunck E., Pahl H. L., Merfort I. *Cysteine 38 in p65/NF-kappaB plays a crucial role in DNA binding inhibition by sesquiterpene lactones*. *The Journal of Biological Chemistry*. 276: 39713-39720. (2001).
- 37) Gershwin M. E. *American Journal of Pathology*. 89 (3): 809-812. (1977).

- 38) Ghantous A., Gali-Muhtasib H., Vuorela H., Saliba N. A., Darwiche N.  
*What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials?* Drug  
Discovery Today. 15: 668-678. (2010).
- 39) Ghibelli I., Coppola S., Rotilio G., Lafavia E., Maresca V., Ciriolo M. R.  
*Non-oxidative loss of glutathione in apoptosis via GSH extrusion.*  
Biochemical and Biophysical Research Communications. 216: 313-320.  
(1995).
- 40) Gilles C., Polette M., Zahm J. M., Tournier J. M., Volders L., Foidart J.  
M., Birembaut P. *Vimentin contributes to human mammary epithelial cell  
migration.* Journal of Cell Science. 112: 4615-4625. (1999).
- 41) Giovanella. B. C., Fogh J. *The nude mouse in cancer research.* Cancer  
Research. 44: 69-120. (1985).
- 42) Gopal Y. N., Arora T. S., Van Dyke M. W. *Parthenolide specifically  
depletes histone deacetylase 1 protein and induces cell death through  
ataxia telangiectasia mutated.* Chemistry & Biology. 14 (7): 813-823.  
(2007).
- 43) Guzman M. L., Rossi R. M., Neelakantan S., Li X., Corbett C. A.,  
Hassane D. C., Becker M. W., Bennet J. M., Sullivan E., Lachowicz J. L.,  
Vaughan A., Sweeney C. J., Matthews W., Carroll M., Liesveld J. L.,  
Crooks P. A., Jordan C. T. *An orally bioavailable parthenolide analog*

- selectively eradicates acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells.* Blood. 110: 4427-4435. (2007).
- 44) Guzman M. L., Rossi R. M., Karnischky L., Li X., Peterson D. R., Howard D. S., Jordan C. T. *The sesquiterpene lactone parthenolide induces apoptosis of human acute myelogenous leukemia stem and progenitor cells.* Blood. 105: 4163-4169. (2005).
- 45) Hollingshead M. G. *Antitumor efficacy testing in rodents.* Journal of the National Cancer Institute. 100: 1500-1510. (2008).
- 46) Hugh J., Hanson J., Cheang M. C., Nielsen T. O., Perou C. M., Dumontet C., Reed J., Krajewska M., Treilleux I., Rupin M., Magherini E., Mackey J., Martin M., Vogel C. *Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial.* Journal of Clinical Oncology. 27: 1168-1176. (2009).
- 47) Hugo H., Ackland M. L., Blick T., Lawrence M. G., Clements J. A., Williams E. D., Thompson E. W. *Epithelial–mesenchymal and mesenchymal–epithelial transitions in carcinoma progression.* Journal of Cellular Physiology. 213: 374-383. (2007).
- 48) Hwang D., Fischer N. H., Jang B. C., Tak H., Kim J. K., Lee W. *Inhibition of the expression of inducible cyclooxygenase and proinflammatory cytokines by sesquiterpene lactones in macrophages*

- correlates with the inhibition of MAP kinases.* Biochemical and Biophysical Research Communications. 226: 810-818. (1996).
- 49) Jain R. K. *Tumour angiogenesis and accessibility: role of Vascular Endothelial Growth Factor.* Seminars in Oncology. 29: 3-9. (2002).
- 50) Jenkins D. E., Hornig Y. S., Oei Y., Dusich J., Purchio T. *Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice.* Breast Cancer Research. 7: 444-454. (2005).
- 51) Jessani N., Niessen S., Mueller B. M., Cravatt B. F. *Breast cancer cell lines grown in vivo: what goes in isn't always the same as what comes out.* Cell Cycle. 4 (2): 253-5. (2005).
- 52) Katz E., Dubois-Marshall S., Sims A. H., Gautier P., Caldwell H., Meehan R. R., Harrison D. J. *An in vitro model that recapitulates the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human breast cancer.* PLoS One. 6(2):e17083. doi: 10.1371. (2011).
- 53) Kawasaki B. T., Hurt E. M., Kalathur M., Duhagon M. A., Milner J. A., Kim Y. S., Farrar W. L. *Effects of sesquiterpene lactone parthenolide on prostate tumor-initiating cells: an integrated molecular profiling approach.* Prostate. 69: 827-837. (2009).

- 54) Kerbel R. S. *Human tumor xenografts as predictive preclinical models for anticancer drug activity in humans: better than commonly perceived-but they can be improved.* *Cancer Biology & Therapy.* 2 (4): 134-139. (2003).
- 55) Kleiner D. E., Stetler-Stevenson W. G. *Matrix metalloproteinases and metastasis.* *Cancer Chemotherapy and Pharmacology.* 43: 42-51. (1999).
- 56) Kozlowski J. M., Fidler I. J., Campbell D. E., Xu Z. L., Kaign M. E., Hart I. R. *Metastatic behavior of human tumor cell lines grown in the nude mouse.* *Cancer Research.* 44: 3522-3529. (1984).
- 57) Kwok B. H., Koh B., Ndubuisi M. I., Elofsson M., Crews C. M. *The anti-inflammatory natural product parthenolide from the medicinal herb Feverfew directly binds to and inhibits IkappaB kinase.* *Chemistry & Biology.* 8: 759-766. (2001).
- 58) Lacroix M., Leclercq G. *Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumors: an update.* *Breast Cancer Research and Treatment.* 83: 249-289. (2004).
- 59) Lee J. M., Dedhar S., Kalluri R., Thompson E. W. *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease.* *The Journal of Cell Biology.* 172 (7): 973-81. (2006).
- 60) Li X., Stark G. R. *NFkappaB-dependent signaling pathways.* *Experimental Hematology.* 30: 285-296. (2002).

- 61) Lichtner R. B., Howlett A. R., Lerch M., Xuan J. A., Brink J., Webster B. L., Schneider M. R. *Negative cooperativity between  $\alpha3\beta1$  and  $\alpha2\beta1$  integrins in human mammary carcinoma MDA MB 231 cells*. *Experimental Cell Research*. 240: 368-376. (1998).
- 62) Liedtke C., Mazouni C., Hess K. R., André F., Tordai A., Mejia J. A., Symmans W. F., Gonzalez-Angulo A. M., Hennessy B., Green M., Cristofanilli M., Hortobagyi G. N., Pusztai L. *Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple negative breast cancer*. *Journal of Clinical Oncology*. 26: 1275-1281. (2008).
- 63) Linee Guida AIOM: *Neoplasie della mammella*. (2013).
- 64) Liu J. W., Cai M. X., Xin Y., Wu Q. S., Ma J., Yang P., Xie H. Y., Huang D. S. *Parthenolide induces proliferation inhibition and apoptosis of pancreatic cancer cells in vitro*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 29 (1): 108. (2010).
- 65) Liu Z., Liu S., Xie Z., Pavlovicz R. E., Wu J., Chen P., Aimiwu J., Pang J., Bhasin D., Neviani P., Fuchs J. R., Plass C., Li P. K., Li C., Huang T. H., Wu L. C., Rush L., Wang H., Perrotti D., Marcucci G., Chan K. K. *Modulation of DNA methylation by a sesquiterpene lactone parthenolide*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 329: 505-514. (2009).

- 66) Long X., Nephew K. P. *Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent interacting proteins mediate immobilization and degradation of estrogen receptor- $\alpha$* . The Journal of Biological Chemistry. 281 (14): 9607-9615. (2006).
- 67) Luedde T. Schwabe R. F. *NF- $\kappa$ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma*. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology. 8: 108-118. (2011).
- 68) Makheja A. N, Bailey J. M. *A platelet phospholipase inhibitor from the medicinal herb feverfew (Tanacetum parthenium)*. Prostaglandins Leukotrienes and Medicine. 8: 653-660. (1982).
- 69) Mathema V. B., Koh Y. S., Thakuri B. C., Sillanpaa M. *Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities*. Inflammation. 35: 560-565. (2012).
- 70) Mauri D., Polyzos N. P., Salanti G., Pavlidis N., Ioannidis J. P. *Multiple-treatments meta-analysis of chemotherapy and targeted therapies in advanced breast cancer*. Journal of the National Cancer Institute. 100: 1780-1791 (2008).
- 71) McCawley L. J., Matrisian L. M. *Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression*. Molecular Medicine Today. 6 (4): 149-156. (2000).
- 72) McDonnell D., Wardell S. E. *The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of ER modulators: implications of new drug*

- discovery in breast cancer*. *Current Opinion in Pharmacology*. 10: 1-9. (2010).
- 73) Mendez M. G., Kojima S., Goldman R. D. *Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition*. *FASEB Journal*. 24 (6): 1838-1851. (2010).
- 74) Meyer T., Vinkemeier U. *STAT nuclear translocation: potential for pharmacological intervention*. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*. 11: 1355-1365. (2007).
- 75) Morini M., Mottolose M., Ferrari N., Ghiorzo F., Buglioni S., Mortarini R., Noonan D. M., Natali P. G., Albini A. *The  $\alpha3\beta1$  integrin is associated with mammary carcinoma cell metastasis, invasion, and gelatinase B (MMP-9) activity*. *International Journal of Cancer*. 87: 336-342. (2000).
- 76) Nakshatri H., Rice S. E., Bhat-Nakshatri P. *Antitumor agent parthenolide reverses resistance of breast cancer cells to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand through sustained activation of c-Jun N-terminal kinase*. *Oncogene*. 23: 7330-7344. (2004).
- 77) Nakshatri H., Bhat-Nakshatri P., Martin D. A., Goulet R. J. Jr., Sledge G. W. Jr. *Constitutive activation of NF-kappaB during progression of breast cancer to hormone-independent growth*. *Molecular and Cellular Biology*. 17 (7): 3629-3639. (1997).

- 78) Neelakantan S., Nasim S., Guzman M. L., Jordan C. T., Crooks P. A. *Aminoparthenolides as novel anti-leukemic agents: Discovery of the NF-kappaB inhibitor, DMAPT (LC-1)*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19 (15): 4346-4349. (2009).
- 79) Neulat-Duga I., Sheppel A., Marty C., Lacroux F., Pourrai J., Careriviere P., Delsol G. *Metastases of human tumor xenografts in nude mice*. *Invasion Metastasis*. 4: 209-224. (1984).
- 80) Oakman C., Moretti E., Galardi F., Biagioni C., Santarpia L., Biganzoli L., Di Leo A. *Adjuvant systemic treatment for individual patients with triple negative breast cancer*. *Breast*. 20 (3): 135-141. (2011).
- 81) Oka D., Nishimura K., Shiba M., Nakai Y., Arai Y., Nakayama M., Takayama H., Inoue H., Okuyama A., Nonomura N. *Sesquiterpene lactone parthenolide suppresses tumor growth in a xenograft model of renal cell carcinoma by inhibiting the activation of NF-kappaB*. *International Journal of Cancer*. 120: 2576-2581. (2007).
- 82) Orlando L., Schiavonea P., Fedele P., Calvania N., Nacci A., Rizzo P., Marino A., D'Amico M., Sponziello F., Mazzonia E., Cinefra M., Fazio N., Maiello E., Silvestris N., Colucci G., Cinieri S. *Molecularly targeted endocrine therapies for breast cancer*. *Cancer Treatment Reviews*. 36 (3): 67-71. (2010).

- 83) Pajak B., Gajkowska B. Orzechowski A. *Molecular basis of parthenolide-dependent proapoptotic activity in cancer cells*. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 46: 129-135. (2008).
- 84) Pathak S., Nemeth M. A., Multani A. S. *Human tumor xenografts in nude mice are not always of human origin*. *Cancer*. 83 (9): 1891-1893. (1998).
- 85) Perez E. A., Moreno-Aspitia A., Aubrey Thompson E., Andorfer C. A. *Adjuvant therapy of triple negative breast cancer*. *Breast Cancer Research and Treatment*. 120: 285-291. (2010).
- 86) Perou C. M., Sørli T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Rees C. A., Pollack J. R., Ross D. T., Johnsen H., Akslen L. A., Fluge O., Pergamenschikov A., Williams C., Zhu S. X., Lønning P. E., Børresen-Dale A. L., Brown P. O., Botstein D. *Molecular portraits of human breast tumors*. *Nature*. 406: 747-752. (2000).
- 87) Perou C. M. *Molecular stratification of triple-negative breast cancer*. *Oncologist*. 16 (1): 61-70. (2011).
- 88) Pickar J. H., MacNeil T., Ohleth K. *SERMs: Progress and future perspectives*. *Maturita*. 67: 129-138. (2010).
- 89) Pogoda K., Niwińska A., Murawska M., Pieńkowski T. *Analysis of pattern, time and risk factors influencing recurrence in triple-negative breast cancer patients*. *Medical Oncology*. 30: 388. (2013).

- 90) Price J. E., Dan Zhang R. *Studies of human breast cancer metastasis using nude mice*. *Cancer and Metastasis Reviews*. 8 (4): 285-297. (1990).
- 91) Price J. E., Polyzos A., Dan Zhang R., Daniels L. M. *Tumorigenicity and metastasis of human breast carcinoma cell lines in nude mice*. *Cancer Research*. 50: 717-721. (1990).
- 92) Rakha E. A. Reis-Filho J. S., Ellis I. O. *Basal-like breast cancer: a critical review*. *Journal of Clinical Oncology*. 26: 2568-2581. (2008).
- 93) Reis-Filho J. S., Tutt A. N. J. *Triple negative tumours: a critical review*. *Histopathology*. 52: 108-118. (2008).
- 94) Rocha-Lima C. M., Soares H. P., Raez L. E., Singal R. *EGFR targeting of solid tumors*. *Cancer Control*. 14: 295-304. (2007).
- 95) Rouzier R., Perou C. M., Symmans W. F., Ibrahim N., Cristofanilli M., Anderson K., Hess K. R., Stec J., Ayers M., Wagner P., Morandi P., Fan C., Rabiul I., Ross J S., Hortobagyi G. N., Pusztai L. *Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy*. *Clinical Cancer Research*. 11: 5678-5685. (2005).
- 96) Rygaard J., Povlsen C. *Hetero transplantation of a human malignant tumor to nude mice*. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*. 77: 758-760. (1969).
- 97) Sandhu R., Parker J. S., Jones W. D., Livasy C. A., Coleman W. B. *Microarray-Based Gene Expression Profiling for Molecular Classification*

- of Breast Cancer and Identification of New Targets for Therapy.* LabMedicine. 41: 6364-372. (2010).
- 98) Sarkar F. H., Li Y. *NF- $\kappa$ B: a potential target for cancer chemoprevention and therapy.* Frontiers in Bioscience. 13: 2950-2959. (2008).
- 99) Shanmugam R., Kusumanchi P., Appaiah H., Cheng L., Crooks P., Neelakantan S., Peat T., Klaunig J., Matthews W., Nakshatri H., Sweeney C. J. *A water soluble parthenolide analog suppresses in vivo tumor growth of two tobacco-associated cancers, lung and bladder cancer, by targeting NF- $\kappa$ B and generating reactive oxygen species.* International Journal of Cancer. 128: 2481-2494. (2011).
- 100) Shanmugam R., Kusumanchi P., Cheng L., Crooks P., Neelakantan S., Matthews W., Nakshatri H., Sweeney C. J. *A water-soluble parthenolide analogue suppresses in vivo prostate cancer growth by targeting NF $\kappa$ B and generating reactive oxygen species.* The Prostate. 70: 1074-1086. (2010).
- 101) Sharkey F. E., Fogh J. *Considerations in the use of nude mice for cancer research.* Cancer Metastasis Review. 3: 341-360. (1984).
- 102) Sheen-Chen S. M., Huang C. C., Tang R. P., Yang C. H., Chou F. F., Eng H. L. *Signal transducer and activator of transcription 1 in breast cancer: analysis with tissue microarray.* Anticancer Research. 27: 2481-2486. (2007).

- 103) Shibata A., Nagaya T., Imai T., Funahashi H., Nakao A., Seo H. *Inhibition of NF-kappaB activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells.* Breast Cancer Research Treatment. 73: 237-243. (2002).
- 104) Sobin L. H., Gospodarowicz M. K., Wittekind C. H. *UICC: TNM classification of malignant tumors.* Wiley-Blackwell, Oxford. (2009).
- 105) Sobota R., Szwed M., Kasza A., Bugno M., Kordula T. *Parthenolide inhibits activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) induced by cytokines of the IL-6 family.* Biochemical and Biophysical Research Communications. 267: 329-333. (2000).
- 106) Sorlie T., Perou C. M., Tibshirani R., Aas T., Geisler S., Johnsen H., Hastie T., Eisen M. B., van de Rijn M., Jeffrey S. S., Thorsen T., Quist H., Matese J. C., Brown P. O., Botstein D., Eystein Lønning P., Børresen-Dale A. L. *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.* Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 98: 10869-10874. (2001).
- 107) Sorlie T., Tibshirani R., Parker J., Hastie T., Marron J. S., Nobel A., Deng S., Johnsen H., Pesich R., Geisler S., Demeter J., Perou C. M., Lønning P. E., Brown P. O., Børresen-Dale A. L., Botstein D. *Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data*

- sets. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 100: 8418-8423. (2003).
- 108) Stallings-Mann M., Radisky D. *Matrix metalloproteinase-induced malignancy in mammary epithelial cells*. Cells Tissues Organs. 185 (1-3): 104-110. (2007).
- 109) Stearns V, Zhou Q, Davidson N. *Epigenetic Regulation as a New Target for Breast Cancer Therapy*. Cancer Investigation. 25: 659-665. (2007).
- 110) Sumner H., Salan U., Knight D. W., Hoult J. R. *Inhibition of 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase in leukocytes by feverfew. Involvement of sesquiterpene lactones and other components*. Biochemical Pharmacology. 43: 2313-2320. (1992).
- 111) Sun Y. St., Clair D. K., Xu Y., Crooks P. A., St Clair W. H. *A NADPH oxidase-dependent redox signaling pathway mediates the selective radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells*. Cancer Research. 70: 2880-2890. (2010).
- 112) Suvannasankha A., Crean C. D., Shanmugam R., Faraq S. S., Abonour R., Boswell H. S., Nakshatri H. *Antimyeloma effects of a sesquiterpene lactone parthenolide*. Clinical Cancer Research. 14: 1814-1822. (2008).
- 113) Sweeney C. J., Mehrotra S., Sadaria M. R., Kumar S., Shortle N. H., Roman Y., Sheridan C., Campbell R. A., Murry D. J., Badve S., Nakshatri

- H. *The sesquiterpene lactone parthenolide in combination with docetaxel reduces metastasis and improves survival in a xenograft model of breast cancer*. *Molecular Cancer Therapy*. 4 (6): 1004-1012. (2005).
- 114) Tan A. R., Swain S. M. *Therapeutic strategies for triple-negative breast cancer*. *Cancer Journal*. 14: 343-351. (2008).
- 115) Teicher B. A. *Tumor models for efficacy determination*. *Molecular Cancer Therapy*. 5 (10): 2435-2443. (2006).
- 116) Thiery J. P., Sleeman J. P. *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 7 (2): 131-142. (2006).
- 117) Tripepi G., Catalano F. *L'analisi di sopravvivenza con il metodo di Kaplan Meier*. *Giornale Italiano di Nefrologia*. 6: 540-546. (2004).
- 118) Varfolomeev E. E., Ashkenazi A. *Tumor necrosis factor: an apoptosis *JuNKie*?* *Cell*. 116: 491-497. (2004).
- 119) Vrekoussis T., Chaniotis V., Navrozoglou I., Dousias V., Pavlakis K., Stathopoulos E. N., Zoras O. *Image analysis of breast cancer immunohistochemistry-stained sections using ImageJ: an RGB-based model*. *Anticancer Research*. 29: 4995-4998. (2009).
- 120) Webster R. J., Giles K. M., Price K. J., Zhang P. M., Mattick J. S., Leedman P. J. *Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor signaling*

- in human cancer cells by microRNA-7*. The Journal of Biological Chemistry. 284 (9): 5731-5741. (2009).
- 121) Weigelt B., Horlings H. M., Kreike B., Hayes M. M., Hauptmann M., Wessels L. F., de Jong D., Van de Vijver M. J., Van't Veer L. J., Peterse J. L. *Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types*. The Journal of Pathology. 216: 141-150. (2008).
- 122) Wu J. T., Kral J. T. *The NF- $\kappa$ B signaling system, a molecular target in breast cancer therapy*. Journal of Surgical Research. 123: 158-169. (2005).
- 123) Yagata H., Kajiura Y., Yamauchi H. *Current strategy for triple-negative breast cancer: appropriate combination of surgery, radiation, and chemotherapy*. Breast Cancer. 18: 165-173. (2011).
- 124) Zhang Q., Helfand B. T., Jang T. L., Zhu L. J., Chen L., Yang X. J., Kozlowski J., Smith N., Kundu S. D., Yang G., Raji A. A., Javonovic B., Pins M., Lindholm P., Guo Y., Catalona W. J., Lee C. *Nuclear factor- $\kappa$ B-mediated transforming growth factor- $\beta$ -induced expression of vimentin is an independent predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy*. Clinical Cancer Research. 15. 3557-3567. (2009).
- 125) Zhang S., Lin Z. N., Yang C. F., Shi X., Ong C. N., Shen H. M. *Suppressed NF- $\kappa$ B and sustained JNK activation contribute to the*

- sensitization effect of parthenolide to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in human cancer cells.* Carcinogenesis. 25: 1-9. (2004).
- 126) Zhang S., Ong C. N., Shen H. M. *Critical roles of intracellular thiols and calcium in parthenolide-induced apoptosis in human colorectal cancer cells.* Cancer Letters. 208: 143-153. (2004).
- 127) Zhou Q., Shaw P. G., Davidson N. E. *Inhibition of histone deacetylase suppresses EGF signaling pathways by destabilizing EGFR mRNA in ER-negative human breast cancer cells.* Breast Cancer Research and Treatment. 117: 443-451. (2009).
- 128) Zunino S. J., Ducore J. M., Storms D. H. *Parthenolide induces significant apoptosis and production of reactive oxygen species in high-risk pre-B leukemia cells.* Cancer Letters. 254: 119-127. (2007).