

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"**



Facoltà di Medicina e Chirurgia

**DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOTECNOLOGIE MEDICHE E MEDICINA MOLECOLARE**

XX CICLO (2003-2007)

**EFFETTI BIOLOGICI DELL'ACIDO VALPROICO SU MELANOMA:
STUDI *IN VITRO* ED *IN VIVO***

Dr.ssa Alessandra Valentini

Docente Guida: Prof. Sergio Bernardini

Coordinatore: Prof. Giorgio Federici

Indice

INTRODUZIONE.....	4
1. LA CELLULA NEOPLASTICA.....	4
2. LE BASI MOLECOLARI DELLA CANCEROGENESI.....	7
3. MELANOMA	10
3.1 Definizione ed eziopatogenesi	10
3.2 Diagnosi del melanoma e stadiazione del tumore.....	14
3.3 Terapia.....	20
4. IL RUOLO DI P16 NEL CICLO CELLULARE	26
4.1 Il ciclo cellulare	26
4.2 p16 nel melanoma	31
5. ACIDO VALPROICO (VPA)	33
5.1 Meccanismo d'azione del VPA.....	35
5.2 L'Acido Valproico e il trattamento del melanoma	43
SCOPO DELLA TESI	45
MATERIALI E METODI.....	46
1. SAGGIO DELL'ATTIVITÀ DELL'ISTONE DEACETILASI	46
2. COLTURE CELLULARI E TEST DI CITOTOSSICITÀ (MTS)	47
3. ASSOCIAZIONE DELL'ACIDO VALPROICO CON <i>CIS</i> -PLATINO ED ETOPOSIDE <i>IN VITRO</i>	49
4. CURVE DI CRESCITA	50
5. ESTRAZIONE DELL'RNA E RT-PCR	50
6. QREAL TIME PCR.....	52
7. WESTERN BLOTTING.....	56
8. ANALISI CITOFLUORIMETRICHE	60
9. IMPIANTO DEL TUMORE <i>IN VIVO</i> , CAPACITÀ TUMORIGENICA E FORMAZIONE DI METASTASI.....	62

10. ANALISI STATISTICA.....	63
RISULTATI E DISCUSSIONE.....	64
RISULTATI.....	64
1. EFFETTI BIOLOGICI E MOLECOLARI DELL'ACIDO VALPROICO IN VITRO	65
2. SENSIBILIZZAZIONE IN VITRO AI CHEMIOTERAPICI INDOTTA DAL VPA.....	744
3. EFFETTI DELL'ASSOCIAZIONE VPA E CIS-PLATINO <i>IN VIVO</i> E VALUTAZIONE DELL'EFFETTO ANTIMETASTATICO.....	76
DISCUSSIONE.....	82
BIBLIOGRAFIA.....	888

Introduzione

1. La cellula neoplastica

I circa 30000 miliardi di cellule di un organismo sano vivono in una comunità complessa e interdipendente, all'interno della quale viene vicendevolmente tenuta sotto controllo la proliferazione. Le cellule di un individuo si riproducono solo quando sono istruite in proposito, questa incessante collaborazione fa in modo che ogni tessuto mantenga le dimensioni e la struttura che sono appropriate ai bisogni dell'organismo.

La cellula neoplastica è per molti versi normale, ma soffre di un “guasto” nel meccanismo che ne regola la proliferazione. A causa di questa anomalia si divide quando non dovrebbe, generando altre cellule con lo stesso difetto di regolazione. La capacità di proliferare in modo incontrollato amplifica la popolazione di cellule neoplastiche, che aumentano di numero nel tempo, secondo una funzione esponenziale.

Durante questa fase della storia naturale del tumore, le cellule possono andare incontro ad ulteriori alterazioni casuali, i cui effetti sono imprevedibili. Se l'effetto è letale, o, comunque, non si traduce in un vantaggio selettivo, la progenie della cellula interessata si perde. Se, invece, sempre in modo casuale, il difetto secondario apporta un vantaggio selettivo nella capacità di proliferare, la progenie emerge nella popolazione tumorale. Questa nuova sottopopolazione si accresce e, col tempo, tende a sostituirsi alla popolazione originale.

Il processo può ripetersi più di una volta con le stesse modalità, cosicché, alla fine, il tumore è costituito da cellule che hanno accumulato una serie di alterazioni successive, ciascuna delle quali ha contribuito ad accrescere la capacità proliferativa della cellula. Il clone di cellule che emerge acquisisce progressivamente delle caratteristiche di malignità più elevate di quelle delle cellule progenitrici (1).

Ciò che contraddistingue, a livello biologico, una massa neoplastica è il grado di differenziazione, la velocità di accrescimento, la capacità invasiva e di formare metastasi (2):

- Differenziazione e anaplasia

La differenziazione si riferisce al grado di somiglianza tra cellule parenchimali neoplastiche e normali, dal punto di vista sia morfologico che funzionale.

I tumori ben differenziati sono pertanto costituiti da cellule che rassomigliano agli elementi maturi del tessuto. I tumori scarsamente differenziati o del tutto indifferenziati sono invece costituiti da cellule immature e non specializzate. La mancanza di differenziazione, o anaplasia, costituisce un carattere distintivo di trasformazione maligna.

- Velocità di accrescimento

La velocità d'accrescimento dei tumori è un parametro estremamente variabile e non prevedibile, generalmente correlato al grado di differenziazione. Alcune forme crescono lentamente nell'arco di diversi anni, la maggior parte si sviluppa

rapidamente e a volte con ritmo irregolare, dipendendo da apporto sanguigno e ormonale.

- Capacità invasiva

Alcuni tumori si accrescono come masse espansive e coesive, che rimangono localizzate nel sito di origine, senza alcuna capacità di infiltrarsi nei tessuti circostanti, avvolte da un rivestimento connettivale.

Altre crescono come delle infiltrazioni progressive, invadendo in maniera aggressiva il tessuto di origine e quelli limitrofi, senza alcuna capsula che ne circoscriva i confini. L'invasività e la capacità di dare metastasi sono le caratteristiche più tipiche che contraddistinguono una neoplasia maligna.

- Metastasi

Le metastasi sono impianti tumorali discontinui rispetto al tumore primario. Un paziente affetto da neoplasia raramente muore per l'espansione locale del tumore primario, ma quasi sempre per la sua disseminazione metastatica. Un tumore maligno ancora localizzato ha infatti una prognosi generalmente favorevole per le attuali possibilità terapeutiche, al contrario di uno che all'atto della diagnosi abbia già originato metastasi.

Acquisire la capacità di migrare in un altro tessuto è quindi un evento chiave nella progressione del cancro. La ricerca biomedica ha compiuto un salto di qualità nel momento in cui è riuscita a scomporre il complesso processo della metastasi in una serie di fenomeni più semplici, ciascuno dei quali rappresenta una diversa interazione tra cellula neoplastica e tessuti dell'ospite (3, 4).

L'evento metastatico infatti presuppone l'adesione ed invasione della membrana basale vascolare, la locomozione attraverso il varco aperto dalla proteolisi nella membrana e nel collagene circostante, la circolazione nei vasi (sanguigni o linfatici), l'arresto in punti determinati del circolo, l'adesione all'endotelio vascolare per ripercorrere a ritroso il cammino precedente, l'attecchimento nel nuovo distretto, stimolando l'angiogenesi per consentire la crescita tumorale e la ricostruzione delle strutture (5).

2. Le basi molecolari della cancerogenesi

La cancerogenesi è un processo a più stadi, che opera a livello sia genotipico che fenotipico, caratterizzato da anomalie dei normali meccanismi di regolazione e controllo della proliferazione cellulare.

Le fasi distintive nella patogenesi di una neoplasia risiedono principalmente nella trasformazione delle cellule del tessuto, nella loro espansione clonale e nella successiva acquisizione di tutta una serie di caratteristiche biologiche (capacità invasiva, metastasi), che va sotto il nome di progressione tumorale (6).

- *la trasformazione tumorale*

Una cellula somatica si definisce trasformata se è portatrice di un danno genetico non letale (mutazione), provocato o da fattori esterni quali cancerogeni

chimici, fisici e agenti virali (eziologia estrinseca) o da lesioni genetiche ereditarie (eziologia intrinseca) (2).

In ogni caso la mutazione del genoma interessa tre classi specifiche di geni: geni che stimolano la cellula a progredire nel suo ciclo cellulare (oncogeni), geni che inibiscono il ciclo cellulare (onco-soppressori) e geni deputati alla sorveglianza dell'integrità del materiale ereditario, in tal modo collegati alla regolazione della morte programmata o apoptosi (7).

Negli organismi multicellulari il coordinamento dello sviluppo e del differenziamento cellulare è mediato da interazioni dirette tra cellule contigue, a livello di membrana plasmatica, e da fattori di crescita. Questi vengono riconosciuti da specifici recettori che a loro volta attivano meccanismi intracellulari in grado di regolare l'attività proliferativa. Pertanto le molecole che presiedono al controllo del ciclo cellulare si situano a quattro livelli: livello extracellulare, livello di membrana, livello citoplasmatico e livello nucleare (8). Alterazioni quantitative e qualitative delle molecole che mediano questi meccanismi di regolazione sono coinvolte nello sviluppo delle neoplasie.

- espansione clonale e progressione tumorale

Nessuna alterazione genetica può, da sola, essere sufficiente alla trasformazione di una cellula somatica. In tutte le neoplasie descritte a livello molecolare, infatti, è evidente come più di un gene debba essere mutato, per far sì che la cellula perda la capacità di controllo del proprio ciclo cellulare.

L'ipotesi dell'origine del cancro per mutazione genica implica che la massa tumorale derivi dall'espansione clonale di una singola cellula progenitrice che ha subito un danno al DNA, per cui i tumori sono monoclonali. La situazione si mantiene stabile fino al momento in cui la massa iniziale non comincia progressivamente ad assumere un comportamento più aggressivo e ad acquisire un maggiore potenziale di malignità.

Biologicamente questo comportamento è dovuto al progressivo comparire di sottopopolazioni di cellule che differiscono le une dalle altre per particolari attributi fenotipici, quali capacità invasiva, tasso di crescita, abilità nel formare metastasi, sensibilità ad ormoni e a specifici farmaci. Perciò, nonostante l'origine monoclonale, con il tempo i tumori si trasformano in masse eterogenee di cellule trasformate, che evolvono indipendentemente quelle proprietà che più le rendono adatte ad “afferinarsi” nel tessuto e in tutto l'organismo.

Questo processo, che va sotto il nome di progressione tumorale, a livello molecolare è il risultato di mutazioni multiple ed addizionali a quelle responsabili della trasformazione iniziale, le quali si accumulano separatamente nelle differenti cellule. Si ritiene che gli ulteriori danni a carico del DNA abbiano luogo perché la cellula trasformata è geneticamente instabile, particolarmente suscettibile cioè a mutazioni casuali e spontanee durante l'espansione clonale, la quale avviene tra l'altro sempre molto rapidamente, riducendo al minimo la possibilità di controllo del danno subito (9).

3. Melanoma

3.1 Definizione ed eziopatogenesi

Il melanoma è un tumore maligno che insorge principalmente nella pelle e nel 5% dei casi negli occhi. Le lesioni melanocitiche possono originare occasionalmente dall'epitelio interno come quello della mucosa orale, rettale o vaginale. Il melanoma cutaneo presenta la maggiore incidenza e mortalità nelle popolazioni caucasiche e nel mondo si verificano circa 100.000 nuovi casi all'anno, corrispondenti all'1% di tutti i tumori maligni. Attualmente in Italia l'incidenza del tumore aumenta mediamente del 5-7% l'anno, in maniera analoga a quanto riscontrato in popolazioni di origine nordeuropea.

Il melanoma deriva dalla trasformazione maligna dei melanociti, le cellule deputate alla sintesi del pigmento melanina. I melanociti hanno caratteristiche di differenziazione alquanto distinte; in particolare per la formazione del pigmento utilizzano geni melanocita-specifici, sintetizzati in maniera organica rispetto ai cambiamenti nella morfologia cellulare. Sono distribuiti nella pelle, nelle leptomeningi del sistema nervoso centrale, nelle strie vascolari dell'orecchio, nel tratto uveale dell'occhio e nelle altre superfici epiteliali e originano dalle cellule della cresta neurale, che a loro volta si formano dal neuroectoderma.

Le cellule della cresta neurale migrano nella pelle, così come negli altri siti, e qui si differenziano in melanociti (10). Questi si distribuiscono, come cellule rare, lungo lo stato basale dell'epidermide, dove approssimativamente sono

presenti 30-50 cheratinociti che li circondano. Il contatto tra i melanociti e i cheratinociti è permesso da numerosi processi dendritici che si estendono a partire dai melanociti stessi (10).

La melanina prodotta nei melanosomi è trasferita ai cheratinociti attraverso questi stessi processi. La melanina è un polimero che assorbe la luce all'interno di un ampio spettro di lunghezze d'onda e provvede a proteggere i cheratinociti dall'effetto dannoso delle radiazioni UV. E' sintetizzata a partire dai precursori tirosina e dopa, tramite l'enzima tirosinasi, che presenta sia la funzione di idrolasi che di ossidasi (11). Questa glicoproteina di membrana è espressa nei melanosomi, organelli specializzati nella via endocitica attraverso la quale avviene la sintesi e l'assemblaggio della melanina (10,12).

Mutazioni o delezioni di questo enzima sono state riscontrate in varie forme di albinismo (13).

Durante la biosintesi della melanina si formano delle specie reattive dell'ossigeno, come i chinoni, che potrebbero contribuire al processo di carcinogenesi.

Studi genetici nei topi hanno mostrato che la tirosinasi e le proteine ad essa associate determinano il tipo di melanina (bianca-marrone-gialla), che a sua volta definisce il colore della pelle. Nelle persone di pelle bianca i melanociti producono piccoli e pochi melanosomi, che formano aggregati con i cheratinociti. Nelle persone di pelle scura i melanosomi sono invece più grandi e più numerosi e sono distribuiti singolarmente nei cheratinociti.

Generalmente il melanoma tende ad insorgere ad un'età relativamente precoce, rispetto alla maggior parte degli altri tumori solidi. Questo ha suggerito che solo un numero limitato di eventi (cellulari o genetici) è richiesto per la trasformazione a melanoma maligno. I fattori di rischio per il tumore includono la familiarità, l'alta densità di nevi, la loro forma anormale e la pelle chiara. Queste associazioni indicano che i fattori genetici determinano lo sviluppo del melanoma ma che, anche le influenze ambientali, come la luce del sole, possono aumentare il rischio di insorgenza del tumore.

Il ruolo dell'esposizione solare nella patogenesi del melanoma è stato focalizzato sulle radiazioni UV che inducono carcinogenesi. Le lunghezze d'onda delle radiazioni UV che colpiscono la terra sono classificate in UVB (da 290 a 320 nm) e UVA (da 320 a 400 nm). Gli UVA penetrano più profondamente degli UVB, danneggiando il tessuto connettivale del derma e portando a invecchiamento della pelle, mentre gli UVB, a dosi tossiche, producono ustioni.

L'induzione della carcinogenesi, ad opera delle radiazioni UV, è probabilmente dovuta alla diretta interazione dei fotoni con il DNA o a meccanismi indiretti che generano molecole reattive (es. chinoni, ROS) in grado di danneggiare il DNA (14).

Studi *in vitro* hanno dimostrato che le radiazioni UV inducono principalmente la formazione di dimeri di pirimidine e altri fotoprodotti e poiché le mutazioni indotte dai raggi UV attaccano specifici nucleotidi, possono essere

evidenziate mediante la tecnica del “fingerprint” (15). Queste mutazioni sono comunemente riscontrate nei geni oncosoppressori come *p53*, nei tumori della pelle non melanocitici, e in *p16* nei melanomi (16).

Studi *in vivo* hanno dimostrato inoltre che i melanociti proliferano molto lentamente e che la loro spinta proliferativa dovuta alle radiazioni UV è determinata dalla produzione di fattori di crescita da parte dei cheratinociti (10).

Segnali co-stimolatori provengono da due differenti recettori tirosin-chinasici come il recettore del fattore di crescita dei fibroblasti (FGFR-Fibroblast Growth Factor Receptor) e il recettore del fattore di crescita delle mastcellule, che sembrano essere necessari per la crescita e il differenziamento dei melanociti.

Una delle caratteristiche delle trasformazioni dei melanociti è che queste cellule acquisiscono la capacità di autoprodurre i fattori di crescita instaurando così un “loop” stimolatorio autocrino (17). Per esempio l’FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor) viene espresso dai melanociti e la produzione dell’FGF, da parte dei cheratinociti, è aumentata di 6 volte in risposta alle radiazioni UV (18). Un evento precoce nella trasformazione dei melanociti sembra essere proprio l’attivazione del gene che codifica per l’FGF, normalmente represso (19). Questo attiva una stimolazione autocrina costitutiva attraverso i recettori dell’FGF (19).

Altri fattori di crescita indotti dalle radiazioni UV includono IL-1, MSH e l’NGF (20). In particolare il recettore dell’MSH è sovra-regolato nei melanociti

esposti alle radiazioni UV. L'NGF prodotto dai cheratinociti in risposta alle radiazioni UV induce piuttosto la chemotassia dei melanociti (21) e ne aumenta la sopravvivenza in assenza di altri fattori di crescita (20).

3.2 Diagnosi del melanoma e stadiazione del tumore

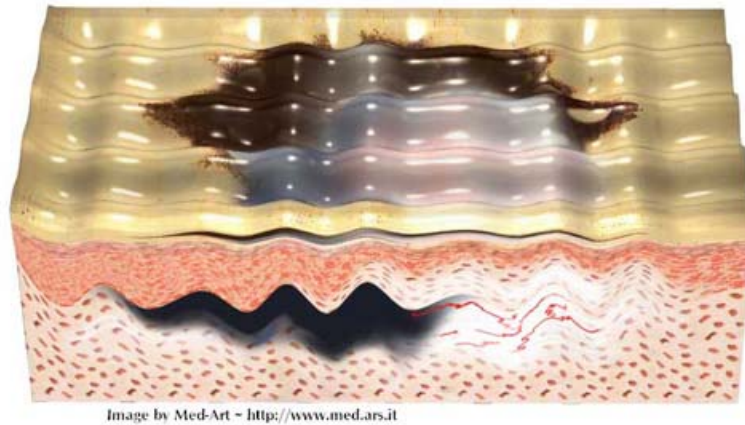
La diagnosi precoce della malattia permette una cura nella maggior parte dei casi. Tuttavia il melanoma ha un'elevata propensione alla metastatizzazione e risulta quindi un tipo di cancro ad elevata malignità. La diagnosi ad uno stadio avanzato del tumore è associata ad una prognosi infausta e ad un'aspettativa di vita di 6-9 mesi dall'accertamento della prima metastasi.

E' molto difficile riconoscere, a questo stadio, quale sia la lesione primaria responsabile dell'insorgenza del melanoma. Quando i melanociti benigni si accumulano in cosiddetti "nidi", sia nell'epidermide che nel derma, la lesione cutanea viene chiamata *mole* o *nevo*. Tipicamente queste lesioni sono pigmentate, con un diametro più piccolo di 6 mm, piatte o leggermente rialzate e di un colore uniforme. Il nevo costituisce la forma benigna del tumore ed è caratterizzato da cellule fusiformi che possono evolvere in: nevi giunzionali, che si accumulano in corrispondenza della giunzione tra derma ed epidermide, in nevi composti, che si accumulano sia nel derma che nell'epidermide o in nevi intradermici, che risultano da una migrazione dei nevi giunzionali nel derma sottostante.

I nevi giunzionali si possono riscontrare sia nell'adolescente che nell'adulto

e infatti la loro scomparsa nell'adulto coincide con la comparsa dei nevi composti e intradermici (22). Sebbene tutte queste lesioni generalmente sono completamente benigne e non evolvono in melanoma, possono andare incontro ad alterazioni dell'adesione cellulare o del controllo della proliferazione. Inoltre una loro elevata densità è considerata come fattore di rischio per l'insorgenza del tumore. Nevi displastici o atipici sono dei potenziali precursori per il melanoma, sebbene questo sia considerato controverso (23). Questi nevi tendono ad avere un diametro maggiore di 6mm con bordi irregolari e asimmetrici ed una variabilità nel colore. I dati in favore di una diretta relazione tra nevi atipici e melanoma provengono dall'osservazione che queste cellule displastiche sono spesso osservate insieme a quelle melomatose. In ogni caso l'associazione tra le due forme cellulari varia tra 1 e il 40% dei casi (22).

La diagnosi clinica del melanoma è basata su caratteristiche morfologiche di una data lesione pigmentata, asimmetrica, con irregolarità del bordo, variazione nel colore e un diametro maggiore di 6 mm. Le lesioni che possiedono solamente una o due di queste caratteristiche possono essere considerate clinicamente nevi displastici, che solo in base ad un'analisi istopatologica, potrebbero essere considerati melanomi. La caratteristica più sospetta di una lesione è il cambiamento nell'aspetto.



Invasione della lesione tumorale nel derma

La diagnosi istologica del melanoma primario è basata sulle caratteristiche citologiche, strutturali e immunoistochimiche (24). Le cellule di melanoma si estendono dallo strato più elevato dell'epidermide fino a quello più basso, invadendo il derma sottostante attraverso la membrana basale. Le cellule epidermiche di melanoma appaiono tipicamente di forma epitelioidi mentre quelle dermiche hanno una morfologia più affusolata. L'immunoistochimica può essere un valido strumento nel verificare l'origine melanocitica di un tumore, dal momento che molte neoplasie cutanee hanno un aspetto affusolato.

Come marker diagnostico viene utilizzata in prima istanza la proteina S100 (proteina legante il calcio) espressa nella maggior parte dei melanomi e in melanociti normali, come anche in cellule di derivazione neuroectodermica. Per questa sua aspecificità non è però ritenuta un marker melanoma-specifico.

Contrariamente HMB-45 viene considerata un marker più selettivo poiché reagisce con un frammento della glicoproteina gp100 di membrana melanosomale, anche se risulta essere sensibile solo per un unico sottotipo di

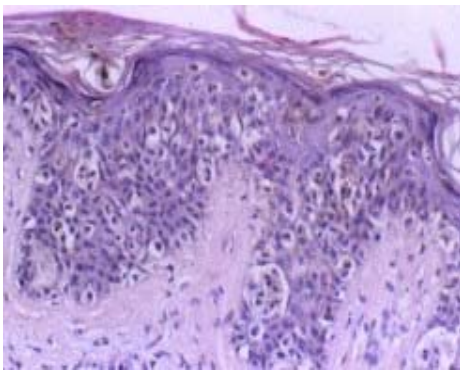
melanoma. Generalmente queste 2 proteine (S100 e HMB-45) vengono utilizzate insieme e spesso associate ad altri markers, come citocheratine e markers leucocitari, per escludere carcinomi o linfomi.

Per pazienti con lesioni di profondità intermedia, tra 1 e 4 mm, si procede con una mappatura del linfonodo sentinella. Quest'ultimo è il primo linfonodo coinvolto nel drenaggio linfatico del territorio cutaneo specifico. Il presupposto teorico è che tale approfondimento diagnostico consente di predire con accuratezza se il melanoma ha metastatizzato o no in quel bacino linfonodale. L'esame prevede l'uso di un colorante o di un radionuclide, iniettato intorno al sito del tumore primario, per identificare il primo linfonodo drenante. Questi linfonodi vengono attentamente esaminati a livello istologico e, se viene evidenziato un melanoma, viene eseguita la dissezione completa del linfonodo positivo (25).

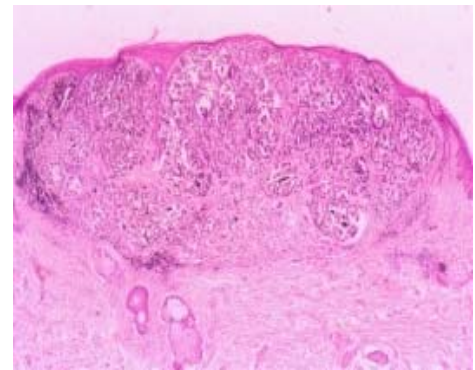
Questa tecnica è stata spesso utilizzata in quei pazienti clinicamente negativi ma con linfonodi positivi al microscopio. In ogni caso l'identificazione di un linfonodo sentinella positivo è correlata con la presenza di altri linfonodi positivi nel 10-20% dei casi (25). Per determinare se i pazienti hanno avuto una remissione dalla malattia, dopo la rimozione chirurgica del linfonodo di interesse, viene eseguita una RT-PCR per i geni melanoma-specifici (es. tirosina idrolasi o MART 1), al fine di individuare eventuali cellule di melanoma residue sia nei linfonodi che nel sangue periferico.

Il melanoma può invadere il derma o rimanere confinato nell'epidermide e

generare lesioni *in situ*. Tra le lesioni invasive vengono distinte una fase a crescita radiale e una a crescita verticale (26). La prima è caratterizzata da una diffusione orizzontale della lesione attraverso l'epidermide con piccoli nidi di cellule dermiche atipiche, limitate alla parte superiore del derma, chiamata strato papillare. La seconda fase è invece caratterizzata da una crescita perpendicolare del tumore, che si insinua nell'epidermide formando grandi nidi cellulari e noduli asimmetrici. Approssimativamente il 70% dei melanomi contiene aree in fase di crescita verticale al momento della diagnosi.



melanoma superficiale



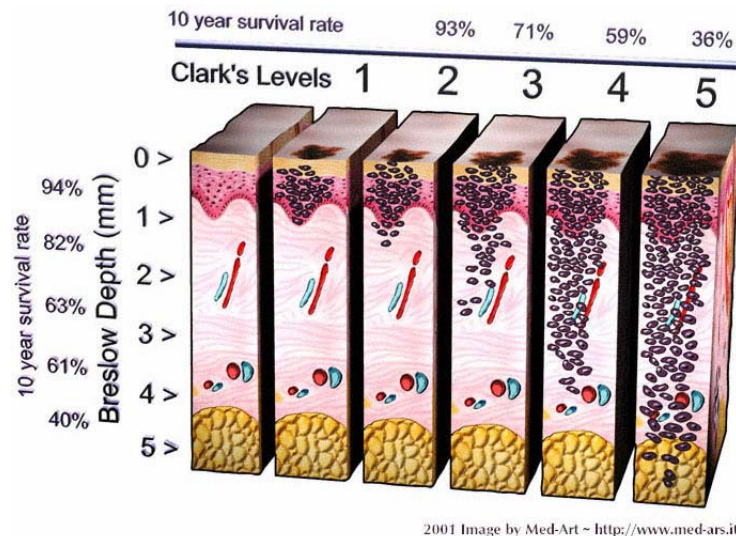
melanoma nodulare

Per descrivere la profondità dell'invasione nella pelle sono adottati due sistemi di classificazione. Il primo, detto metodo di Clark, riflette i differenti strati della pelle (epidermide, i differenti livelli del derma e tessuti sottocutanei) (27).

- 1 Lesione di Clark di I livello: è un melanoma *in situ* confinato all'epidermide;
- 2 Lesione di Clark di II livello: sono presenti piccoli nidi e cellule singole nel

derma papillare e consiste in una fase di crescita radiale;

- 3 Lesione di Clark di III livello: la lesione invade il derma papillare;
- 4 Lesione di Clark di IV livello: la lesione invade il derma in profondità a livello dello strato reticolare;
- 5 Lesione di Clark di V livello: il tumore invade il tessuto sottocutaneo.



classificazione del melanoma

Il sistema più ampiamente utilizzato per descrivere la profondità dell'invasione è, però, quello di Breslow che considera la misura della profondità dell'invasione del melanoma dallo strato granulare dell'epidermide (28).

In entrambi i sistemi, sia quello di Clark che quello di Breslow, l'aumento della profondità dell'invasione è correlata con un incremento di rischio di metastasi. Il rischio è relativo e non assoluto, in quanto melanomi più piccoli di 1 mm (o lesione di Clark II livello) raramente metastatizzeranno.

La distinzione biologica tra la fase di crescita radiale e verticale è

importante e riflette probabilmente la differenza nelle caratteristiche fenotipiche delle cellule (26). I melanomi che mantengono una fase di crescita radiale quasi mai metastatizzeranno lasciando presumere che le cellule di melanoma metastatiche si formano dalla fase di crescita verticale.

Oltre alla profondità dell'invasione vengono utilizzati fattori prognostici aggiuntivi per migliorare l'accuratezza della predizione. Il modello più accurato, basato sugli aspetti patologici della progressione tumorale, comprende 6 variabili (26-29):

- 1 Indice mitotico;
- 2 Presenza di infiltrazioni linfocitarie;
- 3 Spessore del tumore;
- 4 Sito anatomico della lesione;
- 5 Età e sesso del paziente;
- 6 Presenza di regressione istologica.

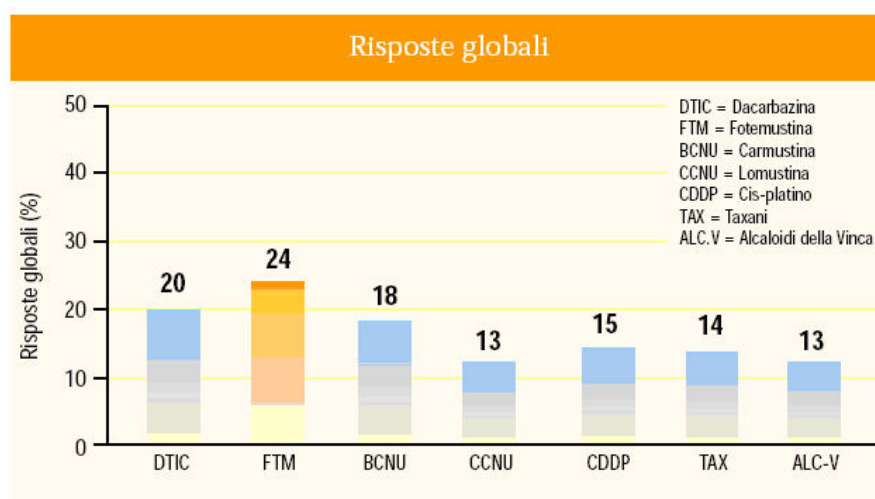
3.3 Terapia

Nel caso di lesioni piccole si prevede un intervento chirurgico che da solo può essere risolutivo. In caso di pazienti in stadio metastatico viene effettuato, come da protocollo clinico, un trattamento sistemico in aggiunta alla chirurgia.

Per il trattamento del melanoma metastatico esistono diverse strategie terapeutiche: dalla monoterapia alla polichemioterapia, dalla bioterapia ai più recenti vaccini. I farmaci ad attività più consolidata, quali la dacarbazina e le

nitrosouree, hanno evidenziato in monoterapia una risposta globale superiore rispetto ad altri chemioterapici quali il cisplatino, il tamoxifen o gli alcaloidi della Vinca (30). Tra le monoterapie più utilizzate nel trattamento del melanoma, la fotemustina risulta la più attiva, con una risposta globale del 24%.

La fotemustina è un agente alchilante altamente lipofilo ed appartenente alla classe delle nitrosouree. È caratterizzata da un elevato coefficiente di penetrazione nelle cellule tumorali: ciò è dovuto alla presenza di un gruppo fosfoalaninico sulla porzione nitrosureidica, che permette al farmaco di essere veicolato più facilmente all'interno delle cellule tumorali. Infatti, le differenze nella permeabilità di membrana, rendono le cellule tumorali più permeabili agli aminoacidi rispetto alle cellule sane. La fotemustina, inoltre, è caratterizzata da un'elevata lipofilia che le permette il passaggio anche attraverso la barriera emato-encefalica (31).



risposte globali in monochemioterapia

La dacarbazina è un analogo strutturale dell'amino-5-imidazol-4-carbossamide, precursore delle basi puriniche. Ha un'attività citostatica non ciclodipendente.

Tre sono le ipotesi formulate sul suo meccanismo d'azione:

- 1 Inibizione della sintesi del DNA (attività antimetabolica);
- 2 Attività alchilante sul DNA già formato (dovuta al diazometano, metabolita della dacarbazina);
- 3 Interazione con i gruppi SH, che vengono così sequestrati ai processi di sintesi proteica cellulare.

La dacarbazina viene somministrata in perfusione venosa o, in alcune localizzazioni tumorali, in infusione arteriosa. La posologia varia a seconda che il prodotto sia utilizzato da solo o in associazione. L'aggiunta di farmaci antimitotici (actinomicina D, bleomicina, carmustina, lomustina, ciclofosfamide, citosina arabinoside, doxorubicina, fluorouracile, metotressato, vinblastina) alla soluzione di dacarbazina non ne modifica la stabilità, nè dà luogo ad interazioni.

Tra gli agenti chemioterapici di maggiore interesse troviamo il Cisplatino.

Il farmaco inibisce la sintesi del DNA attraverso la formazione di legami crociati all'interno dell'elica e tra le eliche del DNA stesso. Anche la sintesi delle proteine e dell'RNA vengono inibite, seppure in misura inferiore. L'effetto citotossico del Cisplatino è causato dal suo legame con tutte le basi del DNA con una preferenza per la posizione N-7 della guanina e dell'adenosina.

Il principale meccanismo d'azione del Cisplatino è l'inibizione della sintesi

del DNA, tuttavia altri meccanismi, quali ad esempio il potenziamento dell'immunogenicità tumorale, potrebbero concorrere a determinare la sua attività antineoplastica. Il Cisplatino ha caratteristiche antitumorali paragonabili a quelle degli agenti alchilanti; possiede inoltre proprietà immunosoppressive, radiosensibilizzanti ed antimicrobiche. L'effetto sul ciclo cellulare da parte del Cisplatino è indiretto attraverso il blocco del ciclo in fase G2, in seguito al danno al DNA (fase S).

Il Cisplatino viene somministrato in dose singola tramite infusione e.v. della durata di 6-8 ore con un dosaggio consigliato di 50-120 mg/m² ogni 3-4 settimane.

Un altro farmaco utilizzato nella terapia del melanoma, anche in associazione ad agenti antitumorali, è l'etoposide: un antineoplastico citostatico derivato della Podofillotossina. L'effetto macromolecolare predominante è il blocco della sintesi del DNA attraverso l'inibizione della Topoisomerasi II.

Il danno indotto dall'etoposide si manifesta a livello biologico nella fase G2 del ciclo cellulare. Si possono evidenziare inoltre due effetti biologici dose-dipendenti: a concentrazioni elevate (pari o superiori a 10 mg/ml), si nota una lisi delle cellule che iniziano la mitosi, a basse concentrazioni (0,3-10 mg/ml) è inibita la profase cellulare.

La necessità di ottenere risultati migliori sia in termini di risposta, ma soprattutto in termini di sopravvivenza, ha portato allo sviluppo di regimi terapeutici di combinazione con diversi farmaci. Inizialmente le principali

associazioni venivano effettuate aggiungendo alla dacarbazina altri chemioterapici che, singolarmente, si erano dimostrati meno attivi (32). Tra i regimi polichemioterapici più utilizzati, il CVD (cisplatino, vindesina, dacarbazina) e il regime Dartmouth (carmustina, dacarbazina, cisplatino e tamoxifen) hanno dato risultati interessanti. Nonostante le risposte antitumorali siano state incoraggianti, la durata di remissione e le risposte complete rimangono rare. Per questo sono stati eseguiti studi di confronto tra la mono e la polichemioterapia, proprio allo scopo di verificare l'effettivo beneficio delle associazioni. I regimi polichemioterapici studiati sono stati numerosi, nessuno, tuttavia, si è dimostrato significativamente più attivo della monoterapia.

Un'altra strategia terapeutica utilizzata in campo oncologico per il trattamento del melanoma metastatico è l'associazione della chemioterapia con l'immunoterapia (in particolare con interferone). I risultati clinici dei principali studi non hanno però evidenziato alcun miglioramento, in termini di risposte e in termini di sopravvivenza, dall'associazione con interferone (33-36).

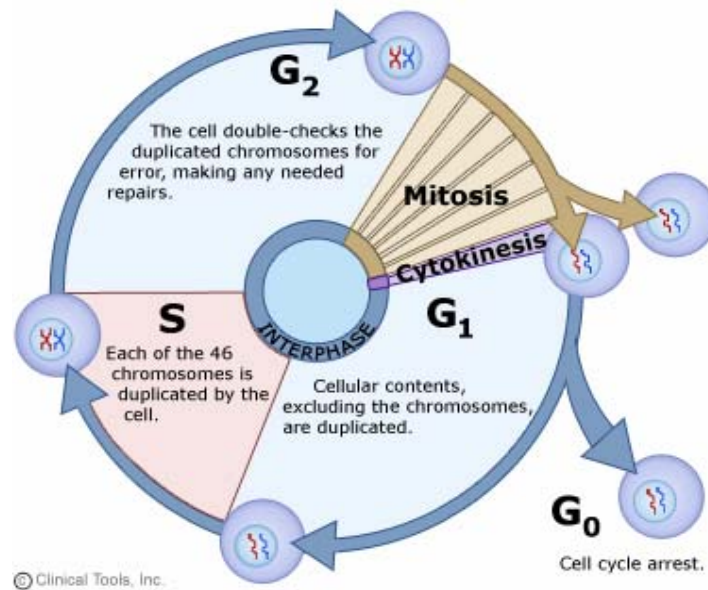
Nel corso degli ultimi anni, lo sviluppo delle conoscenze sulla immunobiologia del melanoma cutaneo, e sul ruolo della risposta immunitaria umorale e cellulo-mediata dell'ospite nell'interazione con le cellule neoplastiche, ha permesso l'applicazione clinica (in fase adiuvante) di nuove e più sofisticate strategie di terapia immunologica, con "vaccini terapeutici" cellulari e/o proteici (37). Tuttavia, la loro applicazione clinica non può prescindere dalla caratterizzazione fenotipica del tumore del singolo paziente, attraverso differenti

metodiche di analisi (es. immunoistochimica, citofluorimetria a flusso, analisi degli acidi nucleici), o dalla disponibilità di quantitativi adeguati di tessuto neoplastico per generare "vaccini" autologhi (37,38).

Indicazioni terapeutiche:

- 1 immunoterapia con peptidi immunogenici di antigeni tumorali melanoma-associati o di differenziazione melanocitaria (MAGE, MART-1, gp100, tirosinasi, etc.);
- 2 immunoterapia passiva con mAb diretti contro antigeni "target" espressi sul tessuto neoplastico;
- 3 immunoterapia attiva specifica con mAb anti-idiotipo;
- 4 preparazione di "vaccini" autologhi (Heat Shock Proteins, cellule APC pulsate con lisato tumorale, etc.).

4. Il ruolo di p16 nel ciclo cellulare



le fasi del ciclo cellulare

4.1 Il ciclo cellulare

Il ciclo cellulare è l'insieme di eventi ordinati che regolano la crescita e la divisione di una cellula in relazione a stimoli esterni. Il ciclo cellulare di una cellula somatica consiste nell'alternanza fra l'interfase e la divisione mitotica.

L'interfase rappresenta il periodo durante il quale non si verificano dei cambiamenti visibili ma la cellula è impegnata nell'attività sintetica e nella riproduzione dei suoi componenti. Il periodo di mitosi è costituito da un intervallo durante il quale si compie in modo visibile il processo di divisione in due cellule figlie. In questa fase, l'organizzazione interna della cellula è costituita dal fuso, il compartimento nucleare è perso e sono visibili i singoli cromosomi.

L'interfase è a sua volta suddivisa in 3 periodi:

- 1 Periodo G1 (gap1), preceduto da un periodo G0 di quiescenza, in cui la cellula appena formatasi, cresce e si prepara alla duplicazione del DNA;
- 2 Periodo S, in cui viene duplicato il patrimonio genetico della cellula;
- 3 Periodo G2 (gap 2), in cui la cellula si prepara alla successiva divisione, mediante l'organizzazione delle strutture che formeranno il fuso mitotico.

La duplicazione del DNA e della stessa cellula, procede in una serie di sequenze precise di eventi che necessitano di fattori di crescita che influenzano l'entrata nella fase G1 del ciclo, superato il quale la cellula procederà nella sua divisione completa.

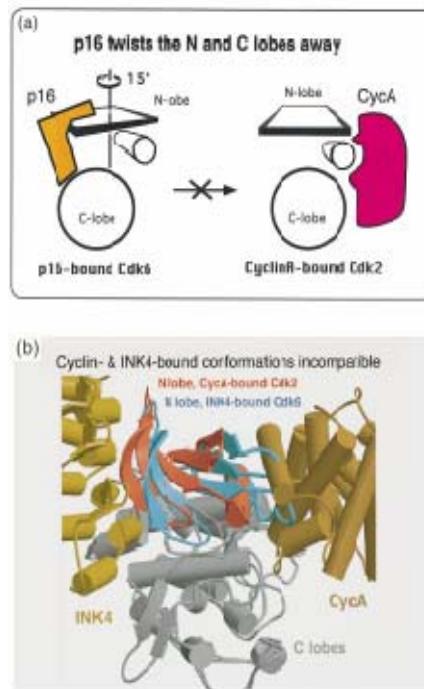
Tutte le fasi del ciclo, e le transizioni da una fase alla successiva, sono controllate da 3 classi di proteine (cdk, CDI e cicline) regolate da modificazioni post-traduzionali tra cui la fosforilazione.

Le fosforilazioni delle proteine, coinvolte nel ciclo cellulare, avvengono ad opera di chinasi (CDK, cyclin-dependent-kinase) che dipendono nella loro attività dal complesso ciclina-cdk nella forma enzimaticamente attiva. Il legame delle cdk con le cicline avviene tramite una diretta interazione della subunità regolatrice (ciclina) e della subunità catalitica (cdk). Le proteine chinasi ciclina-dipendenti costituiscono una famiglia di 10 proteine chinasi Serina/Treonina eterodimeriche (cdk 1-10), costitutivamente espresse nelle cellule. La famiglia delle cicline comprende un gruppo di proteine con omologia di sequenza. Le cicline individuate fino ad oggi sono 8 (A-H) e, grazie alla loro alternanza, la

cellula attraversa le varie fasi del ciclo cellulare. Le cicline infatti, durante il ciclo, subiscono fasi di sintesi e degradazione, predisponendo un meccanismo di regolazione delle cdk. Il legame delle cdk con le cicline e quindi la loro attività viene modulata dalla fosforilazione di un residuo di tirosina che libera il sito attivo della chinasi. L'attività enzimatica dei complessi ciclina-cdk consente di fosforilare gruppi di proteine essenziali per la transizione da una fase all'altra del ciclo, permettendo alla cellula di attraversare i cosiddetti "checkpoints" o punti di controllo, principali nel passaggio G0-G1, G1-S, S-G2.

L'attività del complesso ciclina-cdk viene regolata a sua volta da una famiglia di proteine che, legandosi direttamente alle cdk, ne modula la funzione, inibendola (CKI, cyclin-dependent kinase inhibitors). Questi inibitori sono raggruppati in due principali classi in base alla loro omologia di sequenza: la prima classe comprende *p16*, *p15*, *p18* e *p19* che sono specifici per cdk4 e cdk6, la seconda classe include *p21*, *p27* e *p57* specifici per cdk4 e cdk2.

Tra questi inibitori un ruolo fondamentale viene svolto da *p16*. Quest'ultimo lega la cdk in una zona opposta rispetto al sito di legame per la ciclina. Il legame con *p16* provoca una distorsione dei domini dell'enzima che, non trovandosi più allineati rispetto all'asse di simmetria verticale, non permettono più alla ciclina di interagire con la cdk.



a) il legame di p16 alla cdk6 ne modifica la struttura

b) impedimento sterico tra il complesso p16-cdk e la ciclina.

La proteina *p16* è stata scoperta nel 1993 (39,40) in cellule trasformate, come un complesso che comprendeva PCNA (antigene nucleare delle cellule proliferanti), ciclina D e la chinasi ciclina-dipendente cdk4.

Successivamente si è chiarito che *p16* è una subunità regolatrice negativa di cdk4 e di cdk6, che controllano la progressione attraverso la fase G1 del ciclo cellulare (41). Le cicline D sono i co-fattori delle chinasi cdk4 e 6 che hanno la funzione di fosforilare la proteina del gene del retinoblastoma (Rb). Una delle attività della proteina, codificata da Rb, è quella di formare complessi con fattori di trascrizione che risultano in tal modo inibiti funzionalmente. La fosforilazione di Rb determina il distacco dei fattori di trascrizione ad esso legati (come E2F). I fattori di trascrizione rilasciati a loro volta consentono l'espressione di geni

necessari alla progressione attraverso G1.

La funzione di *p16*, in quanto inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti, lo configura come gene oncosoppressore poiché, in sua mancanza, viene meno un controllo negativo sulla proliferazione cellulare. Delezioni di *p16* sono state riscontrate in un'alta percentuale di tumori umani di diversa origine istologica, incluso il melanoma, indicando il ruolo fondamentale di *p16* nella trasformazione neoplastica di diversi tessuti (42).

E' evidente che il ciclo cellulare e la morte cellulare sono due fenomeni collegati fra loro proprio per il fatto che, proteine necessarie al primo processo, svolgono un ruolo essenziale anche nel secondo. Infatti la classe degli inibitori delle cdk induce un arresto del ciclo inibendo i complessi ciclina-cdk e attivando di conseguenza la proteina Rb attraverso de-fosforilazione.

L'inattivazione di *p16* e di Rb o la sovra-espressione della ciclina-D caratterizzano la maggior parte delle alterazioni presenti nelle cellule tumorali, associate all'assenza di controllo dei "checkpoints" del ciclo cellulare.

Studi recenti hanno dimostrato che, in cellule trasformate, la sovra-espressione degli inibitori delle cdk (es. *p21*, *p16*) determina l'attivazione di segnali pro-apoptotici nei mitocondri, attraverso il rilascio di citocromo c, depolarizzazione delle membrane mitocondriali e attivazione delle caspasi (43). Inoltre, l'inserimento del gene *p16* in vettori d'espressione adenovirali trasfettati in cellule di melanoma umano, determina un'inibizione della crescita pari al 78% , con una morfologia cellulare chiaramente apoptotica, confermando il

ruolo di *p16* nell'induzione della morte cellulare (44).

4.2 *p16* nel melanoma

p16 indicato anche come INK4A (Inibitore della cdk4), è stato localizzato sulla regione 9p21 grazie alla strategia del clonaggio posizionale (45,46). Sono state riscontrate nel 75% di linee cellulari di melanoma sia delezioni in omozigosi che mutazioni di *p16*. Il gene INK4A produce 2 distinti esoni 1(1a e 1b) che si assemblano allo stesso sito accettore dell'esone 2 ma codificano 2 differenti proteine: *p16* e un secondo prodotto detto p14ARF (dato da un frame di lettura alternativo) (47).

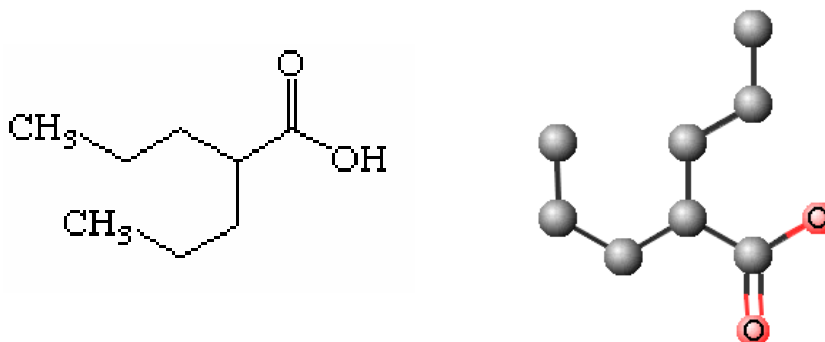
Studi familiari su pazienti affetti da melanoma hanno dimostrato l'importanza di *p16* come regolatore del ciclo cellulare nella tumorigenesi (48,49).

Sui cariotipi del melanoma studiati tra il 1973 e il 1990 la più comune alterazione riscontrata è a carico della regione cromosomiale 1p11-p22 (83%), associata ad una progressione tardiva del tumore. Un'altra comune aberrazione viene riscontrata sulla regione 9p24-q12, associata in questo caso ad una progressione precoce (48). I primi a riportare studi di linkage, che associano delezioni sulla regione 9p21 alla familiarità del melanoma, sono stati Cannon-Albright nel 1992 (50). Studi incentrati sull'analisi di *p16* nel melanoma familiare hanno dimostrato la presenza di mutazioni sulla regione 9p21, nella linea germinale di parenti selezionati (51). Ulteriori osservazioni hanno

evidenziato che l'accumulo di mutazioni di *p16* nella linea germinale sono associate a fenotipi di molteplici melanomi primari (52,53). Dato che solo nel 20% dei casi di melanoma familiare sono state riscontrate mutazioni su tale locus genico, sembra che anche altri geni siano responsabili dell'aumento di suscettibilità nello sviluppo del tumore, nella maggior parte delle famiglie. Altri studi, che miravano a determinare la frequenza delle alterazioni di *p16* in sporadici melanomi, utilizzando tumori primari, hanno riscontrato frequenze intorno al 28% (54,55). Oltre alle delezioni in omozigosi e alle mutazioni puntiformi, anche la metilazione delle isole di CpG, localizzate sul promotore di *p16*, risulta essere un frequente meccanismo di trasformazione neoplastica riscontrabile nel 20 % dei tumori analizzati (56).

5. Acido Valproico (VPA)

L'Acido Valproico (valproato) è un acido grasso a catena ramificata a 8 atomi di carbonio.



struttura chimica dell'acido valproico (VPA)

Nella forma di valproato di sodio viene utilizzato come farmaco nel trattamento di alcune forme di epilessia, in caso di disordini bipolari ed emicranie sin dal 1960. Solo negli ultimi anni è emersa la sua attività come agente antineoplastico. Infatti nel 1997 Cinatl J. et al. dimostrarono che l'Acido Valproico inibiva la proliferazione e induceva differenziamento, in cellule tumorali primitive neuroectodermali, *in vivo*.

L'effetto antiproliferativo del VPA su cellule di neuroblastoma di ratto 2A e di glioma di ratto C6 (57) risultò reversibile e non attribuibile ad una citotossicità, in quanto la sua attività antiproliferativa si esplicava con un blocco del ciclo cellulare nella fase G1 (58). Quindi 30 anni dopo la scoperta dei suoi effetti antiepilettici, si iniziarono ad esplorare anche i suoi effetti antitumorali ipotizzando che agenti differenzianti, con attività antiproliferativa, potessero costituire il trattamento della leucemia promielocitica, così come di tumori solidi quali il tumore del colon, della mammella e dei tumori di origine ectodermica

(59,60).

Studi *in vivo* su topi immunodepressi (nu/nu), in cui era stata impiantata una linea di neuroblastoma umano, hanno dimostrato che, il trattamento con 400 o 200 mg/Kg/giorno di VPA, determinava una riduzione della massa tumorale (rispettivamente 4 - 2 volte), confrontata con i gruppi di controllo. L'esame istologico delle porzioni rimanenti dei tumori degli animali trattati rivelava, inoltre, un processo di differenziamento (61).

Ulteriori studi con il VPA hanno dimostrato l'induzione di differenziamento anche di cellule di teratocarcinoma F9 con caratteristiche alterazioni morfologiche. Altri autori riportano, per di più, che il farmaco è capace di indurre il differenziamento di cellule progenitrici ematopoietiche trasformate in blasti leucemici, provenienti da pazienti con leucemia mieloide acuta (62). Il VPA è capace inoltre di inibire la proliferazione di linee cellulari di carcinoma del colon, della mammella e del carcinoma prostatico.

L'Acido Valproico, rispetto ad altri agenti farmacologici noti per la loro capacità differenziante (fenilbutirrato, fenilacetato), presenta più vantaggi, in quanto se ne conosce già la sua farmacologia e tossicità, essendo utilizzato nella pratica clinica da molti anni. L'analisi delle cinetiche di accumulo del VPA in pazienti con disturbi bipolari ha dimostrato che il livello stabile della concentrazione di VPA nel siero varia da 50 a 100 mg/ml (63,64).

Ulteriore vantaggio è che il VPA presenta una emivita 3-4 volte più lunga rispetto ad altri agenti differenzianti, quali appunto il fenilbutirrato o il

fenilacetato (65,66).

L'induzione del differenziamento e dell'effetto citostatico del VPA, in cellule tumorali, dipende principalmente dal tempo di esposizione e dalla concentrazione del farmaco (67,68).

Si è visto che le terapie che inducono differenziamento presentano un ridotto profilo di tossicità e sono efficaci, quindi, nel rallentamento della progressione tumorale. L'Acido Valproico, dunque, potrebbe rappresentare una ideale alternativa alla chemioterapia convenzionale, per pazienti con tumori di stadio avanzato; potrebbe essere usato come agente differenziante a bassa tossicità, essere somministrato come agente chemioterapico, anche nel controllo della malattia minima residua, o infine, come adiuvante nella terapia all'esordio del tumore.

5.1 Meccanismo d'azione del VPA

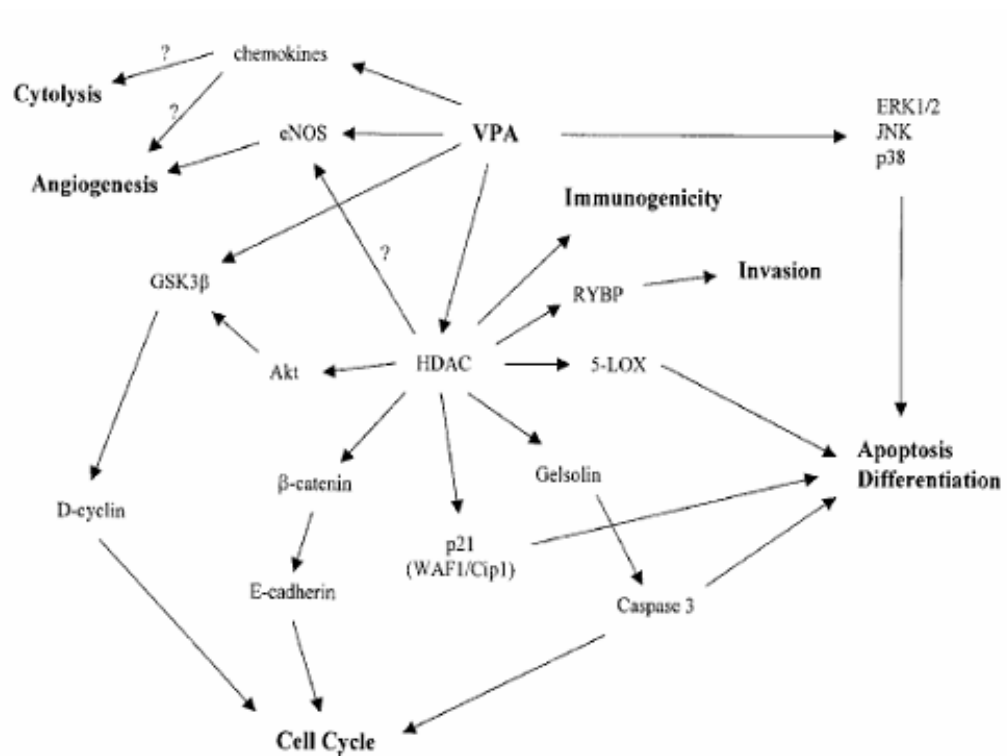
I processi di proliferazione e progressione tumorale, differenziamento e apoptosi, sono controllati da un numero di protein-chinasi che trasmettono all'interno del nucleo della cellula stimoli extracellulari. Il pathway delle MAPK maggiormente noto comporta l'attivazione di piccole proteine ad attività GTPasica come RAS, mediata da recettori tirosin-chinasi (RTK). Ras si associa e attiva la protein chinasi Raf che a sua volta fosforila e attiva alcune MAPKK tra cui MEK1 e MEK2 che, fosforilando ERK1 ed ERK2, le attivano. Queste a loro volta fosforilano altre protein chinasi, come Rsk2, la cui attivazione è

associata alla fosforilazione del fattore trascrizionale CREB (cAMP-response element binding protein).

Mediante altre MAPKK, Ras può agire anche su JNK e p38, la cui cascata del segnale ha come target il fattore nucleare kB (NFkB) o la proteina attivante AP-1.

Negli ultimi anni, studi *in vitro* su culture di glioma di ratto C6 e su cellule di neuroblastoma umano SH-SY5Y, hanno evidenziato che il trattamento con VPA aumenta il grado di transattivazione e il legame al DNA del fattore di trascrizione AP-1 (69,70), parallelamente alla fosforilazione di ERK, modulatore a monte di AP-1, ma non agisce attraverso la via di JNK e p-38, né ha effetto sull'attività di legame al DNA di CREB (69,71). Nelle stesse cellule SH-SY5Y il VPA aumenta i livelli e il grado di fosforilazione di c-jun (costituente di AP-1) in seguito all'attivazione di ERK. L'espressione e la fosforilazione di c-jun, prodotta dal pathway di ERK, è richiesta per dirigere il differenziamento cellulare. In questo modo il VPA aumenta l'espressione di geni regolati dalla via di ERK/AP-1 tra cui la proteina associata alla crescita-43 (GAP-43) e Bcl-2 (68,72), entrambe coinvolte nella progressione del tumore e nel differenziamento.

Per quanto riguarda, invece, il processo apoptotico il trattamento con VPA non influisce significativamente sui livelli della molecola pro-apoptotica Bax, mentre agirebbe sui livelli della controparte anti-apoptotica Bcl-2 (73).



schema illustrativo del meccanismo d'azione dell'acido valproico Abbreviazioni: 5-LOX, 5-lipoxygenase; eNOS, endothelial nitric-oxidase synthase; ERK, extracellular-regulated kinase; GSK3β, glycogen synthase kinase-3β; HDAC, histone deacetylase; JNK, c-jun N-terminalkinase; RYBP, Ring1 and YY1b binding protein.

Il VPA è un inibitore degli enzimi istone deacetilasi

La struttura del cromatina può essere alterata tramite le modifiche post-traduzionali, come l'acetilazione, che svolge un ruolo importante nel regolare l'espressione genica e che coinvolge circa il 2% dei geni trascritti.

Due gruppi di enzimi, istone deacetilasi (HDACs) e istone acetil transferasi (HATs) determinano la condizione di acetilazione degli istoni. Le HDACs catalizzano la rimozione dei gruppi acetile dai residui di lisina nelle code ammino-terminali degli istoni del nucleosoma. Questo processo di alterazione della struttura terziaria del DNA che controlla la trascrizione, porta ad una modulazione dell'accessibilità dei fattori trascrizionali alle loro sequenze target di DNA. L'integrità dei nucleosomi è infatti regolata dallo stato di acetilazione degli istoni. In uno stato ipoacetilato, i nucleosomi sono strettamente compattati e risultano non permissivi alla trascrizione, mentre l'acetilazione degli istoni porta ad un rilassamento della struttura con una maggiore accessibilità ai fattori trascrizionali (74).

Ci sono tre classi di HDACs, classe I (HDACs 1, 2, 3 e 8), classe II (HDACs 4, 5, 6, 7, 9 e 10) e classe III. Quest'ultima è strutturalmente distante rispetto alle altre due e non è inibita dai normali inibitori delle HDACs di classe I/II. Alterazioni nei livelli di acetilazione della cromatina e una funzione deregolata delle HDACs sembrano coinvolte nella tumorigenesi. Molti inibitori delle HDACs sono attualmente studiati in clinica come possibili agenti antitumorali poiché mostrano una efficace attività inibitoria a dosi ben tollerate.

Recentemente si è dimostrato che il VPA è un potente inibitore dell'istone deacetilasi. L'inibizione dell'HDACs causa la iperacetilazione con conseguente attivazione di geni silenti. E' inoltre dimostrato che l'attività dell'HDACs risulta in una regolazione positiva del programma multigenico di invasione cellulare.

Tale invasione può essere inibita dall'Acido Valproico attraverso la ri-espressione di geni coinvolti nell'inibizione dell'invasione e la chemiotassi (75).

Si è visto inoltre che il VPA agisce più efficientemente sugli enzimi di classe I rispetto a quelli di classe II, alle concentrazioni previste nel regime terapeutico, imitando l'inibitore prototipo dell'istone deacetilasi, la tricostatina A (TSA). In più il VPA funziona come potente induttore di differenziazione in cellule trasformate di origine tissutale diversa.

Recenti studi effettuati su linee cellulari 293T di neuroblastoma e di teratocarcinoma F9, hanno dimostrato che l'effetto anti-proliferativo e differenziante del VPA risulta strettamente associato alla sua attività inibitoria sull'istone deacetilasi (62,76).

E' noto che l'acido valproico presenta scarsi effetti collaterali negli adulti, anche se i livelli del farmaco nel siero eccedono oltre il range terapeutico normale. Inoltre le dosi quotidiane di VPA, richieste per raggiungere nel siero dei pazienti il livello terapeutico (20-30 mg/kg), risultano moderate in paragone a quelle richieste per altri inibitori disponibili, quale il butirrato o l'acido

idrossamico suberoilanicilide (SAHA). Dal momento che il VPA è un farmaco ben tollerato, persino durante il trattamento a lunga durata, recentemente è emerso il suo potenziale utilizzo come terapia alternativa nei tumori di diversa origine.

VPA induce Apoptosi

Analizzando i possibili effetti epatotossici del VPA è stato scoperto che l'esposizione di ratti all'Acido Valproico porta alla diminuzione della trascrizione di geni coinvolti nell'omeostasi dell'energia cellulare nel tessuto epatico, con risultante fluttuazione dei livelli di ATP cellulare e in alcuni casi morte cellulare programmata (apoptosi) (77).

Come dimostrato da Phillips A. et al. (78), il VPA, a concentrazioni maggiori di 300 μ M, induce una caratteristica condensazione della cromatina e frammentazione del DNA, tipica dell'induzione di apoptosi nella linea cellulare di epatoma di ratto (FaO), un incremento dei livelli di espressione di Fas-ligand e della forma attiva della caspasi 11 e della caspasi 3.

Recenti studi hanno confermato che il VPA induce apoptosi in diverse linee cellulari leucemiche umane (79). La dose terapeutica (che si somministra normalmente nei pazienti epilettici) di 100-150 μ g/ml determinerebbe l'eliminazione completa, tramite apoptosi, di linee leucemiche MV4-11 e KOCL-44, *in vitro*. Il dato rilevante di questo studio, pubblicato di recente, è che questo tipo di leucemia in genere è refrattaria alla terapia chemioterapica convenzionale, lasciando presupporre quindi il possibile utilizzo del VPA come

trattamento alternativo efficace in questa patologia oncologica.

L'induzione di apoptosi in queste linee leucemiche è caratterizzata da una condensazione della cromatina, frammentazione del DNA ed esternalizzazione della fosfatidilserina. Il VPA induce anche il rilascio di citocromo C dai mitocondri, attraverso l'attivazione della cascata enzimatica di caspasi 3, 8 e 9. Inoltre il pre-trattamento della linea cellulare MV4-11 con l'inibitore delle caspasi zVAD-FMK, causa la perdita degli eventi apoptotici nucleari indotti dal VPA, come la condensazione della cromatina e la frammentazione del DNA, senza però bloccare il processo apoptotico, con l'esposizione della fosfatidilserina sulla superficie cellulare (78).

Ciò dimostra che il VPA può agire attivando due diverse vie di trasduzione del segnale apoptotico: la via caspasi-8-indipendente, che media i cambiamenti a livello nucleare e mitocondriale e la via caspasi-8-dipendente, che media invece gli eventi sulla membrana cellulare, così come dimostrato anche su modelli di carcinoma prostatico (80).

VPA e ciclo cellulare

Dettagliati studi sull'effetto del VPA, su linee cellulari di tumore endometriale, hanno dimostrato un forte arresto della crescita con blocco delle cellule nella fase G0/G1 del ciclo cellulare (79). E' stata osservata inoltre una riduzione dell'espressione della ciclina D e un incremento dell'espressione degli inibitori delle chinasi ciclina dipendenti $p21^{WAF1}$ e $p27^{KIP1}$, entrambi coinvolti

nel blocco del ciclo cellulare in fase G1 (81). Gli effetti anti-tumorali dell'Acido Valproico sul tumore endometriale sono stati osservati anche *in vivo*, dove, in topi immunosoppressi il VPA a 0.3-1.5 mM, ha inibito la proliferazione e indotto l'apoptosi e l'arresto del ciclo cellulare, in assenza di significativi effetti collaterali. Simili effetti del VPA sulla proliferazione sono stati osservati anche nelle linee cellulari di carcinoma della mammella (MCF-7).

Recentemente è stato suggerito che l'attività antitumorale del VPA possa essere amplificata dalla combinazione con altri farmaci, soprattutto con quelli non citotossici e che l'utilizzo combinato dell'Acido Valproico possa aumentare l'efficacia di altri farmaci antitumorali, nel caso in cui le cellule tumorali abbiano acquisito una certa resistenza.

E' stato investigato anche l'effetto della terapia combinata del VPA e dell'acido retinico all-trans (ATRA) su linee cellulari di leucemia mieloide acuta (AML). Mentre i singoli trattamenti mostrano un debole impatto sulla sopravvivenza cellulare e il differenziamento *in vitro*, il trattamento combinato è risultato più efficiente, causando una riduzione della vitalità cellulare e un spostamento verso un fenotipo più differenziato e post-mitotico (82) di tipo mieloide, come mostrato dalla aumentata espressione di marcatori specifici del differenziamento (CD11b e CD11c) (83).

Altri studi dimostrano che, quando il VPA è utilizzato contemporaneamente con interferone- α , si sviluppa un arresto della crescita e della differenziazione, accompagnata da un'alterata espressione dei geni correlati ai fenotipi maligni,

nelle cellule di neuroblastoma (Cinatl et al.) (84).

5.2 L'Acido Valproico e il trattamento del melanoma

Attualmente gli studi in corso che riguardano il trattamento del melanoma con Acido Valproico, sono di tipo preliminare. In particolare uno studio condotto su diverse linee di melanoma umano ha messo in relazione l'induzione di apoptosi con il trattamento con Acido Valproico, individuando quali molecole vengono coinvolte in questo processo (85). Principalmente è stata focalizzata l'attenzione sull'espressione dei fattori pro e anti-apoptotici, su cellule sensibili al VPA. I risultati mostrano come il trattamento con Acido Valproico non modula in modo significativo i livelli di espressione di alcune proteine note, coinvolte nei processi pro-apoptotici, quali *apaf-1* o proteine anti-apoptotiche quali *bcl-2* e *bcl-xl*, mentre reprime significativamente i livelli d'espressione (induce un'ipoespressione) della survivina (nota proteina anti-apoptotica). Inoltre nelle cellule sensibili al VPA il trattamento con il farmaco induce apoptosi attraverso l'attivazione della caspasi 8 nella sua forma clivata (86).

Altri lavori preliminari di associazione farmacologia del VPA e chemioterapici riguardano esperimenti in cui è stato approfondito il ruolo dell'Acido Valproico come adiuvante nella terapia con karenitecina (KTN) su cellule di melanoma. La KTN è un inibitore delle Topoisomerasi di tipo I e analogo lipofilico della camptotecina. Sono state studiate 4 linee di melanoma sensibili alla karenitecina: A375, A2058, SK-MEL-5 e SK-MEL-28. Dopo

trattamento con VPA per 48 ore si è visto che tutte e 4 le linee cellulari risultavano da 2,5 a 6 volte più sensibili all'induzione dell'apoptosi da parte della KTN, in confronto al trattamento solo con la karenitecina (87). Ulteriori indagini eseguite anche *in vivo*, su modelli di topo trapiantati con la linea cellulare A375, hanno mostrato un effetto sinergico del trattamento VPA+KTN. Risultati simili sono stati ottenuti da altri inibitori delle HDAC ipotizzando che l'esposizione al VPA possa aumentare il danno al DNA indotto dalla KTN (87).

Da questi studi preliminari si deduce come l'Acido Valproico possa effettivamente avere un ruolo nella terapia del melanoma, soprattutto in associazione con i chemioterapici convenzionali, anche se, a tutt'oggi, sono ancora numerosi gli approfondimenti necessari per comprendere gli effetti molecolari indotti dal VPA.

Scopo della Tesi

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'efficacia antitumorale dell'Acido Valproico, testando la sua attività biologica su melanoma umano *in vitro* ed *in vivo*.

Abbiamo sfruttato l'azione inibente del VPA nei confronti delle istone deacetilasi (HDACs), nel tentativo di ripristinare il pattern genetico delle linee di melanoma umano, attraverso la ri-espressione di *p16* (oncosoppressore) e conseguente controllo del ciclo cellulare.

Successivamente abbiamo indagato se l'attività del VPA potesse determinare una sensibilizzazione delle cellule al trattamento chemioterapico convenzionale. Abbiamo studiato, quindi, una possibile associazione del VPA con farmaci, quali cisplatino ed etoposide, al fine di individuare un possibile effetto sinergizzante *in vivo*.

Materiali e Metodi

1. Saggio dell'attività dell'Istone deacetilasi

L'attività delle istone deacetilasi (HDACs) è stata saggiata mediante l'HDACs Activity Assay Kit (Upstate, saggio colorimetrico).

Le procedure sperimentali sono state eseguite in base al protocollo contenuto nel kit. I pellet cellulari di M14 trattati a differenti dosi di VPA (2,5mM-5mM) per 72 ore e i controlli sono stati utilizzati come campioni per la misurazione dell'attività delle HDACs.

L'estratto nucleare di HeLa presente nel kit è stato utilizzato come controllo positivo. Come ulteriore controllo della procedura l'estratto nucleare è stato trattato con un inibitore naturale delle istone deacetilasi, la Tricostatina A. I pellet sono stati prima di tutto risospesi in un buffer di lisi per le proteine nucleari (50mM Tris Hcl pH7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, inibitore delle proteasi).

Una volta preparati i campioni e diluiti i reagenti è stata allestita la piastra da 96 pozzetti con i campioni in doppio, un controllo negativo (acqua) e un controllo positivo (HeLa). Sono stati aggiunti in ogni well il buffer da solo o contenente la Tricostatina A (4 μ M), successivamente sono stati aggiunti i 20 μ l del campione da analizzare o del controllo positivo (estratto di HeLa) e infine il substrato delle HDAC (4 μ M).

E' stata mantenuta la piastra a 37°C per 1 ora per far avvenire la reazione

di deacetilazione e in ultimo è stata aggiunta la soluzione attivante, che selettivamente distacca la molecola polimerica dal substrato deacetilato. La piastra è stata mantenuta a temperatura ambiente per 10-20 minuti e infine si è letta l'assorbanza a 405 nm utilizzando lo spettrofotometro Sirio-S (SEAC, Radim Group).

2. Colture cellulari e test di citotossicità (MTS)

Le linee cellulari di melanoma umano (M14, JR8) sono state cresciute in RPMI-1640 (Gibco) supplementato con siero fetale bovino al 10% (GIBCO), 5% di L-Glutamina (GIBCO) e antibiotici. Il tampone fosfato (Ca^{2+} e Mg^{2+} -free phosphate buffered saline (PBS) e la tripsina (Ca^{2+} e Mg^{2+} -free) sono stati forniti dall'Euroclone (Devon,U.K). In seguito le cellule sono state incubate in atmosfera umida con CO_2 al 5% a 37°C .

Il tempo di duplicazione delle cellule è di circa 24-36 ore. La vitalità cellulare è stata determinata mediante la tecnica di esclusione del colorante vitale Tripan-Blue effettuata nella camera citometrica di bürker.

L'Acido Valproico (VPA, Sigma, St.Louis, MO, USA) è stato risospeso in H_2O sterile e poi filtrato con filtro da $0.2 \mu\text{M}$. Le concentrazioni utilizzate sono state 1mM, 2,5 mM e 5mM. Le cellule sono state trattate 24 ore dopo il piastramento su piastre da 6 pozzetti (Becton Dickinson labware Bedford, MA, U.S.A.) e raccolte a 24, 48 e 72 h dal trattamento.

Per il test di citotossicità le cellule (2×10^3) sono state piastrate in 100 μl di

terreno di coltura in piastre (Falcon, CA) da 96 pozzetti. Per ogni esperimento il VPA è stato diluito in serie nel terreno di coltura delle cellule per ottenere le concentrazioni desiderate (0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM) e un volume uguale della soluzione diluita (100µl/well) è stato aggiunto alle cellule.

Ogni trattamento è stato effettuato in triplicato, in tre esperimenti separati. Le cellule sono state esposte in modo continuato all'Acido Valproico per 72h. Per determinare l'effetto citotossico alla fine del periodo di incubazione col farmaco, è stata aggiunta alle cellule la soluzione di MTS (Promega). La piastra è stata incubata per 2 ore a 37°C nell'incubatore con 90% di umidità e 5% di CO₂ e misurata l'assorbanza a 490 nm usando lo spettrofotometro Sirio-S (SEAC, Radim Group).

I risultati sono stati espressi come la media \pm la deviazione standard (SD) della percentuale delle cellule vive, per ogni concentrazione del farmaco, confrontata con quella delle cellule non trattate.

Principio del test: il composto tetrazolico MTS viene bioridotto all'interno delle cellule formando un prodotto colorato, detto formazano, che è solubile nel terreno di coltura. La conversione a formazano è permessa dagli enzimi deidrogenasi che producono NADPH o NADH in cellule metabolicamente attive. La quantità di formazano prodotta viene misurata dall'assorbanza letta a 490 nm, che sarà direttamente proporzionale al numero di cellule vive nella coltura.

3. Associazione dell'Acido Valproico con *cis*-Platino ed etoposide, *in vitro*

Le cellule (1×10^3) sono state piastrate in 100 μ l di terreno di coltura in 5 piastre (Falcon, CA) da 96 pozzetti. L'Acido Valproico è stato sciolto in acqua sterile, il *cis*-Platino è stato sciolto in DMSO (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) così come l'etoposide. Per ogni esperimento i farmaci sono stati diluiti in serie nel terreno di coltura delle cellule per ottenere le concentrazioni desiderate. Per il VPA abbiamo utilizzato le concentrazioni di 1 mM e 5 mM; per il *cis*-Platino le dosi utilizzate sono state di 2,5 μ M, 5 μ M e 10 μ M mentre per l'etoposide di 0,5 μ M, 1 μ M e 5 μ M. Come da protocollo un volume uguale della soluzione diluita (100 μ l/well) è stato aggiunto alle cellule. Ogni trattamento è stato effettuato in triplicato. Il protocollo di trattamento prevedeva la contemporanea somministrazione di VPA+*cis*-Platino e VPA+etoposide. Le cellule sono state esposte all'azione dei farmaci per 72h.

Per determinare l'effetto citotossico alla fine del periodo di incubazione col farmaco, è stata aggiunta alle cellule la soluzione di MTS (Promega). La piastra è stata incubata per circa 2 ore a 37°C nell'incubatore con 90% di umidità e 5% di CO₂ e misurata l'assorbanza a 490 nm usando lo spettrofotometro Sirio-S (SEAC, Radim Group).

Il calcolo del *Combination index* secondo l'equazione:

$$CI = \frac{C_{A,x}}{IC_{x,A}} + \frac{C_{B,x}}{IC_{x,B}}$$

permette di valutare il tipo di interazione fra due o più farmaci (CI < 1 sinergismo, CI =1 additività, CI > 1 antagonismo) (88).

4. Curve di crescita

L'inibizione della crescita cellulare e la vitalità delle cellule di melanoma sono state valutate seguendo le curve di crescita con il test di esclusione con il Tripan blue. Sono state piastrate 2 "multiwell" da 24 pozzetti con $2,5 \times 10^4$ in 500 μ l di RPMI 1640 completo. Dopo 24 ore sono stati trattati 12 pozzetti con VPA 1 mM, 12 pozzetti con VPA 2,5 mM e 12 pozzetti con VPA 5 mM mentre ai restanti 12 pozzetti di controllo è stato eseguito il cambio terreno. Dal giorno successivo fino al sesto sono stati staccati con 250 μ l di tripsina+250 μ l di terreno due pozzetti per diluizione di VPA e due pozzetti per controllo. Con il colorante Tripan Blue si è effettuata la conta della vitalità cellulare (0.4% p/v) nella camera citometrica di bürker.

5. Estrazione dell'RNA e RT-PCR

Per estrarre l'RNA totale è stato utilizzato il metodo semplificato della guanidina tiocianato di Cromczynski-Sacchi (Tri Reagent, Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.).

2×10^6 cellule sono state raccolte tramite centrifugazione a 800 xg per 10 minuti in modo tale da ottenere un pellet al quale viene aggiunto 1 ml di Tri Reagent (sufficiente per lisare 5×10^6 cellule), segue incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la completa dissociazione dei complessi nucleoproteici.

Sono stati poi aggiunti 0.2 ml di cloroformio (per ogni ml di Trizol usato).

Dopo una vigorosa agitazione di 15 secondi, i campioni sono stati lasciati per 15 minuti a temperatura ambiente, agitandoli ogni tanto, e poi centrifugati a 12.000 xg per 15 minuti a 4°C.

In questo modo è stata ottenuta una separazione in 3 fasi:

- 1 una fase organica rossa contenente le proteine;
- 2 un'interfase contenente DNA;
- 3 una fase acquosa superiore incolore contenente l'RNA.

Quest'ultima fase è stata trasferita in una nuova provetta nella quale sono stati poi aggiunti 0,5 ml di isopropanolo (per ogni ml di Trizol usato). E' stata quindi mantenuta per 10 minuti a temperatura ambiente e centrifugata a 12.000 xg per 10 minuti a 4°C, in modo tale da ottenere la precipitazione dell'RNA. Il pellet di RNA è stato lavato aggiungendo 1 ml di etanolo al 75% in H₂O DEPC [DEPC, inibitore delle proteasi, diluito 1:1000 (v/v) in H₂O, lasciato per 3 ore e successivamente autoclavato]. Dopo averli vortexati, i campioni sono stati centrifugati a 12000 xg per 10 minuti a 4°C. Eliminata la maggior parte del sovrantante, il pellet di RNA è stato fatto essiccare in ghiaccio per circa 10 minuti e risospeso in 10 µl di H₂O DEPC.

Per la determinazione della concentrazione dell'RNA allo spettrofotometro (SmartSpec 3000, BioRad), ogni campione di RNA è stato diluito 1:1000 (v/v) in H₂O DEPC.

La lettura, preceduta dall'autozero con acqua sterile, è stata effettuata utilizzando una cuvetta di quarzo, alle due lunghezze d'onda (λ) di 260 nm, alla

quale assorbono le basi eterocicliche degli acidi nucleici, e di 280 nm, alla quale assorbono gli aminoacidi aromatici (tirosina, fenilalanina e triptofano) delle proteine.

La concentrazione dell'RNA, espressa in $\mu\text{g/ml}$, è stata ottenuta utilizzando la seguente formula:

$$[\text{RNA}] = \text{O.D.}_{260 \text{ nm}} \times \frac{1000}{1} \times 40$$

(1 O.D. = 40 $\mu\text{g/ml}$)

La qualità dell'estrazione è stata verificata dal rapporto A260/A280, considerando ottimali i rapporti tra 1.7 e 2.0. Per la sintesi del cDNA, 1 μg di RNA totale (estratto come descritto in precedenza) di ciascun campione, sia di quelli trattati con Acido Valproico a concentrazioni 2,5 e 5 mM, sia di quelli non trattati, è stato trascritto usando come trascrittasi inversa l'enzima presente nel kit per RT-PCR (AMV-Roche Applied Science) e come primers oligo-p(dT).

6. QReal Time PCR

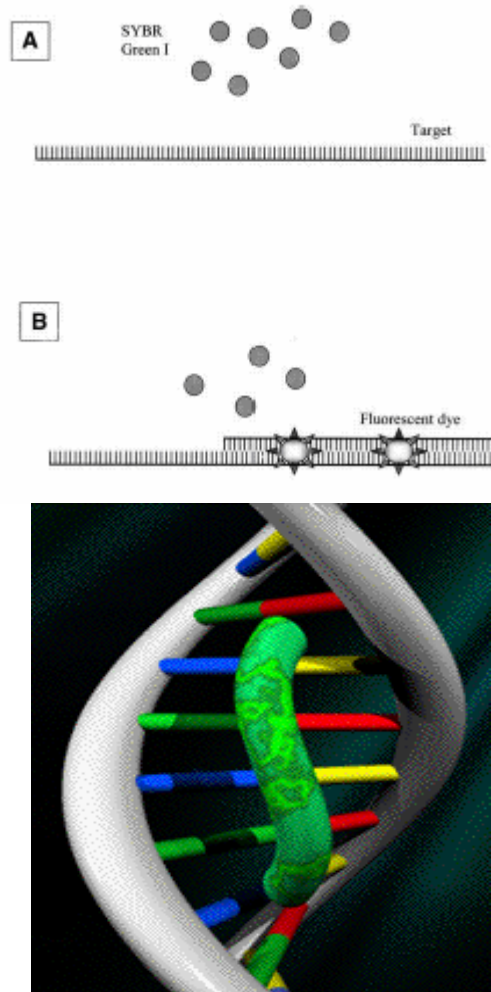
La Quantitative Real Time PCR permette di monitorare e quantificare il prodotto amplificato in "tempo reale", ad ogni ciclo, durante la fase esponenziale della reazione. Il principio della QReal Time PCR è basato sulla amplificazione del cDNA d'interesse che viene quantificato (numero di copie) grazie alla presenza, nella reazione di amplificazione, di una molecola fluorescente che emette un segnale in maniera proporzionale al quantitativo di prodotto amplificato.

Registrando la fluorescenza ad ogni ciclo è possibile controllare la reazione durante la fase esponenziale. Più alto è il numero di copie iniziali del template, più precocemente verrà osservato un aumento della fluorescenza. Il parametro CT (threshold cycle; ciclo soglia) è il parametro che definisce il numero di cicli in cui la fluorescenza emessa supera l'emissione basale di fluorescenza ("baseline") e indica quindi l'inizio della fase esponenziale della reazione di PCR.

La QReal Time RT-PCR è stata eseguita usando la strumentazione Mx3000P™ (Stratagene®) che registra il segnale fluorescente durante la reazione di PCR. Per la rilevazione dell'amplificato è stato utilizzato il *Sybr Green I*, che è uno specifico marcatore per il DNA a doppia elica (dsDNA) frequentemente usato nella QReal Time PCR. Tale colorante è una cianina asimmetrica che lega la sequenza al solco minore del dsDNA, con una affinità di legame 100 volte maggiore rispetto a quella del bromuro d'etidio.

La fluorescenza del *Sybr Green I* legato è 1000 volte maggiore rispetto a quella evidenziabile quando il colorante è libero, quindi, è un ottimo fluorocromo per la rilevazione del prodotto accumulato durante la PCR.

Il *Sybr Green I* viene eccitato ad una lunghezza d'onda di 480 nm con una emissione comparabile a quella della fluoresceina, con assorbimento a 512 nm.



SYBR® Green dye.

Il volume totale di ciascuna reazione di QReal Time PCR è di 25 μ l
contenenti:

- 2,5 μ l del cDNA del campione;
- 5 pmol di ciascun primer:

p16 [S/5' - AAG CCA TTG CGA GAA CTT-3']
[AS/5' - CAG AGG GCA GAAAGA AAA-3']

β 2-Microglobulina [S/5' -GAGTATGCCTGCCGTGTG-3']
[AS/5' -AATCCAAATGCGGCATCT-3']

- 12,5 µl di SYBR® Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems)

Il protocollo di amplificazione comprende 10 minuti a 95°C; 40 cicli a 95°C per 30 secondi, 55°C per 45 secondi, 72°C per 1 minuto e 1 ciclo a 72°C per 7 minuti. Ogni misurazione include una curva standard (da 1 µg a 125 ng di cDNA da linfociti) in duplicato, un controllo (acqua), 500 ng di cDNA del calibratore in triplicato (linfociti).

La quantificazione dei risultati ottenuti con la QReal Time PCR è stata determinata con il metodo comparativo $\Delta\Delta CT$. Questo metodo confronta i valori di CT del campione da esaminare con quelli di un controllo interno (un campione non trattato) e un calibratore. I due valori di CT sono ovviamente normalizzati secondo i valori di un gene endogeno ($\beta 2$ -Microglobulina) e paragonati a quelli del calibratore.

Tale metodo è anche noto come *metodo* $2^{-\Delta\Delta CT}$, dove:

$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ campione} - \Delta CT \text{ controllo}$

$\Delta CT \text{ campione} =$ è il valore di CT campione normalizzato

$\Delta CT \text{ controllo} =$ è il valore di CT controllo normalizzato.

La validazione con il $\Delta\Delta CT$ richiede che l'efficienza di amplificazione del gene *p16* e del controllo endogeno, il gene β -2-microglobulina, sia simile.

7. Western Blotting

Estrazione e Dosaggio delle Proteine

1 x 10⁶ cellule sono state lisate in 50 µl di buffer di lisi (1% Triton, 0.1% SDS, 2 mM CaCl₂, 100 µg/ml fenilmetil sulfonil fluoride) e successivamente ogni campione è stato sonicato 1 volta per pochi secondi in ghiaccio in un sonicatore Sonics Vibra Cell (Danbury, CT, U.S.A.).

La concentrazione proteica è stata determinata spettrofotometricamente utilizzando il metodo colorimetrico dell'acido bicinconinico (BCA) [Bicinchoninic acid solution and copper (II) sulfate (Sigma, MO, U.S.A.)]. Questo dosaggio si basa sul principio secondo il quale le proteine riducono il rame alcalino [Cu(II)] in rame rameico [Cu(I)] in modo dipendente dalla concentrazione. L'acido bicinconinico è un reagente cromogeno altamente specifico per il Cu (I) che forma un complesso violaceo con un massimo di assorbanza a 562 nm. In questo modo l'assorbanza a 562 nm risulta direttamente proporzionale alla concentrazione delle proteine e misurata in cuvette monouso in plastica, utilizzando il DU 640 spectrophotometer (Beckman Coullter, U.S.A.).

Elettroforesi su Gel di Poliacrilamide in SDS

Per lo studio dell'espressione delle proteine del ciclo cellulare è stata eseguita un'elettroforesi su gel di acrilamide composto da un "resolving gel", per la risoluzione dei campioni e uno "stacking gel", per l'effetto di impaccamento dei campioni stessi.

Il “resolving gel” è stato preparato con acrilamide/bis (12% T; 3.4% C), polimerizzata in un tampone con una concentrazione finale di 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% (p/v) SDS, 0.1% (p/v) ammonio persolfato e 0.07% (v/v) TEMED.

Lo “stacking gel” è stato preparato con acrilamide/bis (4% T; 3.4% C) polimerizzata in un tampone con una concentrazione finale di 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% (p/v) SDS, 0.3% (p/v) ammonio persolfato e 0.2% (v/v) TEMED.

Di ciascun campione sono stati caricati 50 µg di proteine totali diluiti 1:1 (v/v) in Laemmli Sample Buffer [62,5 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% (p/v) SDS, 25% (v/v) glicerolo, 0.01% (p/v) Bromofenolo Blu] in condizioni non riducenti e bolliti per 5 minuti prima del caricamento.

L’acrilamide/N,N’-Metilenbisacrilamide, il sodiododecilsolfato (SDS), la glicina, l’ammonio persolfato, l’ N,N,N’,N’-tetra-metiletilendiamina (TEMED), il TBS (20mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5), il polioxi-etilen-sorbitano-monolaurato (TWEEN 20), il Laemmli Sample Buffer e l’Agarosio sono stati forniti dalla BioRad (Hercules, CA, U.S.A.).

L’elettroforesi è stata condotta su Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis Cell 7.3×8.3 cm (BioRad) utilizzando gli spaziatori da 1.5 mm, un tampone di corsa 25 mM Tris, 192 mM glicina pH 8.3, 0.1% SDS, sottoponendolo ad un campo elettrico costante di 120 Volt per 2 ore circa, utilizzando un alimentatore POWER-PAC 3000 (BioRad).

Immunoblotting



*Apparato per il trasferimento delle
proteine su nitrocellulosa*

Terminata l'elettroforesi, le proteine separate su gel di poliacrilamide sono state trasferite su nitrocellulosa (Trans-Blot Transfer Medium Pure Nitrocellulose Membrane 0.45 μm , BioRad) utilizzando un tampone 25 mM Tris, 192 mM Glicina, 20% MetOH (v/v), pH 8.3. Il blotting è stato eseguito con la Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (BioRad) sottoponendolo ad una intensità di corrente costante a 300 mA per 3 ore a 4°C utilizzando l'alimentatore POWER-PAC-3000.

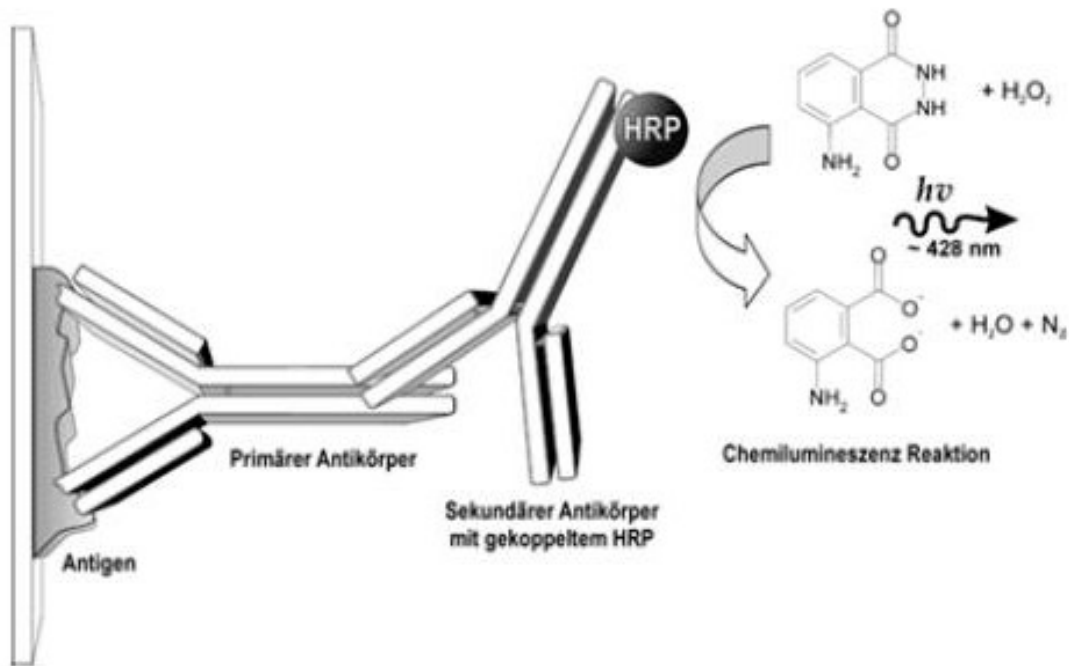
Terminato il trasferimento, il filtro di nitrocellulosa è stato lavato con TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl) 0.05% Tween-20 (T-TBS) per 5 minuti e con TBS per altri 5 minuti. E' stato poi eseguito il bloccaggio dei siti di legame aspecifici con una incubazione di 1 ora a temperatura ambiente in una soluzione 2% latte in polvere (p/v) in T-TBS.

Dopo 2 ulteriori lavaggi, uno in T-TBS per 5 minuti, l'altro in TBS per 5 minuti, il filtro è stato incubato "overnight" a temperatura ambiente con

l'anticorpo 1° anti P16^{INK4} (Clone G175-1239, BD Pharmingen), anticorpo 1° anti ciclina D1 (Ab-3, Calbiochem), anticorpo 1° anti P21 (Clone 2G12, BD Pharmingen) e anticorpo anti tubulina acetilata (Clone 6-11B-1, Sigma).

Dopo 3 lavaggi in T-TBS per 5 minuti e 7 in TBS per 5 minuti ciascuno, è stato aggiunto il 2° anticorpo Anti- Mouse ECL-Horseradish Peroxidase labelled (Amersham) diluito 1:3000 in 1% T-TBS e lasciato incubare per 2 ore a temperatura ambiente.

Dopo 3 lavaggi in T-TBS per 5 minuti e 7 in TBS per 5 minuti ciascuno, il filtro è stato trattato con il sistema di rivelazione in chemiluminescenza ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences.). Sono state mescolate uguali quantità di due soluzioni, una contenente luminolo, un substrato chemiluminescente, e l'altra contenente perossido di idrogeno, preparando un volume sufficiente per ricoprire completamente la superficie di nitrocellulosa. In presenza di perossido di idrogeno, la perossidasi ossida il luminolo con la concomitante produzione di luce. Il segnale chemiluminescente è stato rilevato su Fluor-S Max (BioRad, Hercules, CA,U.S.A.).



schema del sistema di rilevazione in chemiluminescenza (ECL)

8. Analisi Citofluorimetriche

Analisi del Ciclo Cellulare

La determinazione delle fasi del ciclo cellulare e degli eventi apoptotici è stata effettuata con il citofluorimetro FACS-Calibur (Becton-Dickinson, CA, U.S.A.), in seguito a colorazione con ioduro di propidio. Lo ioduro di propidio è un intercalante del DNA e permette perciò la valutazione della quantità di acidi nucleici delle cellule e del loro stato di ploidia. Mediante programmi statistici è possibile analizzare il contenuto di propidio e quindi la fluorescenza, per cellula, ricavando la percentuale delle fasi del ciclo della popolazione cellulare in analisi (G0/G1- S- G2+M).

Per l'analisi del ciclo cellulare le cellule (1×10^6) sottoposte ai diversi

trattamenti, sono state centrifugate a 800 xg per 10 minuti e fissate con etanolo 80% freddo (si usa 1ml/1x10⁶ cellule). Dopo un lavaggio in PBS, le cellule vengono incubate con RNasi (50U/ml in PBS) per 20 minuti a 37°C in agitazione e successivamente con il fluorocromo ioduro di propidio (50 µg/ml in PBS) per 1 ora a 37°C, infine analizzate al citofluorimetro.

Le cellule sono state quindi eccitate a 488 nm con una lampada Argon da 15mW e la fluorescenza emessa è stata monitorata a 578 nm su una media di 150-300 eventi/secondo. Ventimila eventi sono stati analizzati utilizzando il programma Mod-Fit per calcolare la percentuale di apoptosi e la distribuzione cellulare nelle varie fasi del ciclo. Per eliminare eventuali aggregati cellulari è stato utilizzato il ‘gate’ elettronico FSC-A/vs/FSC-H.

Saggio TUNEL

Il saggio Tunel (Terminal transferase dUTP Nick-End Labeling) è un metodo utilizzato per la rilevazione della frammentazione del DNA in seguito alla cascata di attivazione enzimatica dopo induzione di apoptosi.

Durante l’apoptosi, infatti, il DNA subisce dei tagli con conseguente formazione di frammenti a doppio filamento, mono ed oligonucleosomi.

Questi tagli del filamento di DNA possono essere identificati mediante marcatura delle estremità libere 3¹OH attraverso l’aggiunta di nucleotidi, in una reazione enzimatica catalizzata dalla Tdt (terminal deossinucleotidil transferase).

Durante la prima fase avviene la marcatura dei filamenti ad opera della trasferasi che catalizza l’aggiunta dei dUTPs che verranno marcati, nella

seconda fase, con fluoresceina (FITC, Fluoresceina Isotiocianato) la quale ne renderà possibile l'identificazione e la quantificazione attraverso il microscopio a fluorescenza o il citofluorimetro a flusso.

Per il nostro esperimento le cellule sono state raccolte e fissate il paraformaldeide al 4% per 45 minuti a temperatura ambiente, dopo esposizione alla concentrazione di 2,5 e 5 mM di VPA per 72 ore. Dopo lavaggio in PBS, le cellule sono state risospese in una soluzione di 0.1% Triton X-100 e 0.1% sodio citrato e incubate per 2 minuti in ghiaccio. I campioni sono stati lavati in PBS e incubati nella mix di reazione per il saggio TUNEL (Boehringer Mannheim-Roche) per 1 ora a 37°C al buio. Dopo un ultimo lavaggio in PBS i campioni sono stati analizzati al citofluorimetro FACS-Calibur (Becton-Dickinson, CA, U.S.A.). La percentuale delle cellule positive al FITC nella popolazione totale è stata determinata utilizzando il Cell Quest software (Becton Dickinson).

9. Impianto del tumore in vivo, capacità tumorigenica e formazione di metastasi

Per gli esperimenti *in vivo* si sono utilizzati topi nudi maschi CD-1 (nu/nu), dell'età di 6-8 settimane e del peso di 22-24 g (Charles River Laboratories, Calco, Italia). Gli animali, stabulati in condizioni di sterilità, sono stati nutriti con mangime commerciale irradiato ai raggi γ ed acqua acidificata ed autoclavata. Tutte le manipolazioni, svolte in condizioni di sterilità sotto una cappa a flusso orizzontale, sono state eseguite in accordo con le linee guida

nazionali ed internazionali (EEC Council Directive 86/609, OJL 358 del 01.12.1987 e National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1985).

Sono state inoculate nel muscolo dell'arto posteriore, 2×10^6 di cellule della linea M14. Questo tipo di impianto determina lo sviluppo di una massa tumorale dopo circa 8 giorni dall'inoculo e la metastatizzazione spontanea nei polmoni. Sono stati inoculati 10 topi per gruppo e il peso del tumore e la crescita è stata seguita giornalmente calibrando il tumore secondo il metodo di Geran (89):

$$\text{Peso del Tumore} = \text{lunghezza (mm)} \times \text{spessore}^2 \text{ (mm)} / 2.$$

Per valutare il potenziale metastatico della linea di melanoma (M14), per ogni gruppo sono stati sacrificati almeno 10 animali, 35 giorni dopo l'impianto del tumore, i polmoni prelevati sono stati fissati e colorati con la soluzione di Bouin (ac. Picrico, Formaldeide e ac. Acetico glaciale) che permette di distinguere il tessuto normale dai noduli metastatici.

10. Analisi statistica

Per determinare le differenze fra i gruppi è stato utilizzato il test non-parametrico Kruskal Wallis. Le differenze *in vivo* fra i pesi dei tumori sono stati determinati utilizzando il test T di Student. Le differenze sono da considerarsi significative per valori di $p < 0,05$.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Risultati

1. Effetti biologici e molecolari dell'Acido Valproico *in vitro*

Abbiamo valutato l'attività del VPA come inibitore delle istone deacetilasi (HDACs), mediante saggio enzimatico su estratti nucleari di M14 trattate con dosi crescenti di Acido Valproico (1-2,5-5 mM). L'analisi dei risultati ha evidenziato un'inibizione dell'attività delle HDACs da parte del VPA in maniera dose-dipendente.

In particolare abbiamo osservato una riduzione dell'attività enzimatica delle istone deacetilasi (HDACs) del 30% in seguito a trattamento con la dose 1 mM di VPA; la percentuale di inibizione raggiungeva il 50% in seguito a somministrazione di VPA alla concentrazione 2,5 mM e il 60% alla concentrazione 5 mM (fig. 1A). Dati sovrapponibili sono stati ottenuti nella linea cellulare JR8.

La Tricostatina (TSA), alla concentrazione di 4 μ M, è stata utilizzata come controllo del saggio enzimatico.

In associazione allo studio sull'attività dell'HDAC abbiamo valutato la iperacetilazione della tubulina, in quanto è una delle prime proteine che subisce il processo di acetilazione in seguito all'inibizione delle istone deacetilasi. Già dopo 48h di trattamento con VPA, sia alla dose 2,5 mM che 5 mM, abbiamo osservato un aumento di acetilazione, confermando così che l'Acido Valproico era in grado di inibire le HDACs nel nostro modello cellulare (fig. 1B).

Fig. 1A

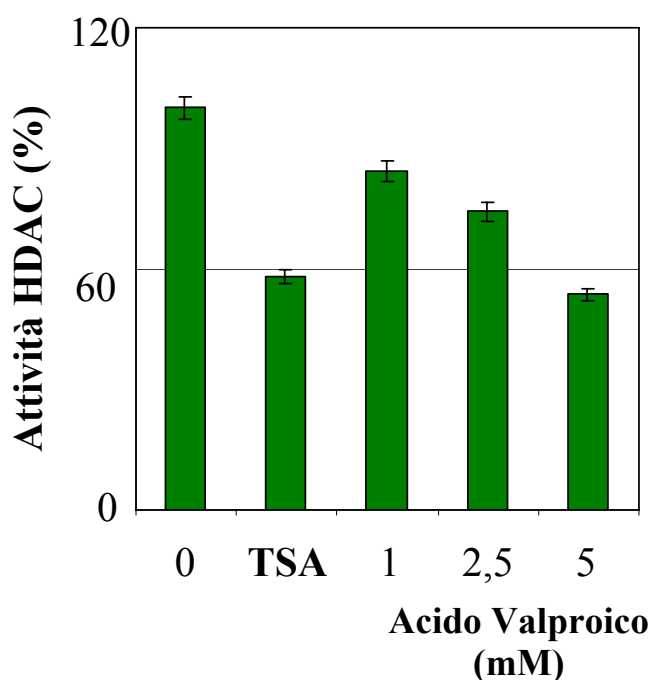
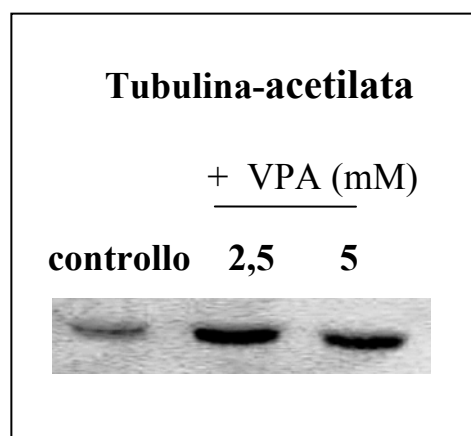


Fig. 1B



Abbiamo quindi studiato gli effetti biologici del VPA in seguito a inibizione delle HDACs sulle due linee cellulari di melanoma umano (M14 e JR8). Dopo 72 ore di esposizione al farmaco si osservava un effetto citotossico dose-dipendente come mostrato in figura 2A. In particolare abbiamo valutato l'effetto citotossico del VPA tramite il test dell'MTS ed estrapolato la "dose letale" al 50% (IC50). Nella linea MI4 l'inibizione del 50% della proliferazione (IC50) si raggiungeva alla concentrazione di 5mM, mentre per quanto riguardava la linea JR8, lo stesso effetto si osservava alla dose di 2,5 mM. I dati sono stati riportati in funzione del controllo come 100% di proliferazione (fig. 2A).

Inoltre abbiamo seguito l'effetto dell'Acido Valproico sulla proliferazione

cellulare attraverso la curva di crescita su cellule non trattate (controllo) e cellule trattate con VPA alle dosi 1, 2,5, 5 mM dopo 6 giorni di esposizione continua al farmaco (fig.2B).

I controlli delle due linee cellulari mostravano una crescita lineare nel tempo mentre, nelle cellule trattate, si evidenziava un'inibizione della crescita dose-dipendente. Sia nelle M14 che nelle JR8, dopo 24h (2g) di trattamento era già evidente un'inibizione della crescita pari al 25%, rispetto al controllo, alle dosi di 1 mM e 2,5 mM di VPA. Alla dose più alta di 5 mM si riscontrava una mortalità elevata, indice della citotossicità immediata indotta dal farmaco.

L'inibizione della crescita raggiungeva il 50% dopo 72h (4g) con esposizione alla dose di 2,5 mM di VPA e circa il 60% alla dose di 5 mM. Come è evidente da questi risultati si può dedurre che l'Acido Valproico presenta buone potenzialità come agente antitumorale *in vitro*, essendo sia un inibitore della crescita cellulare oltre che inibitore delle istone deacetilasi.

Fig. 2A

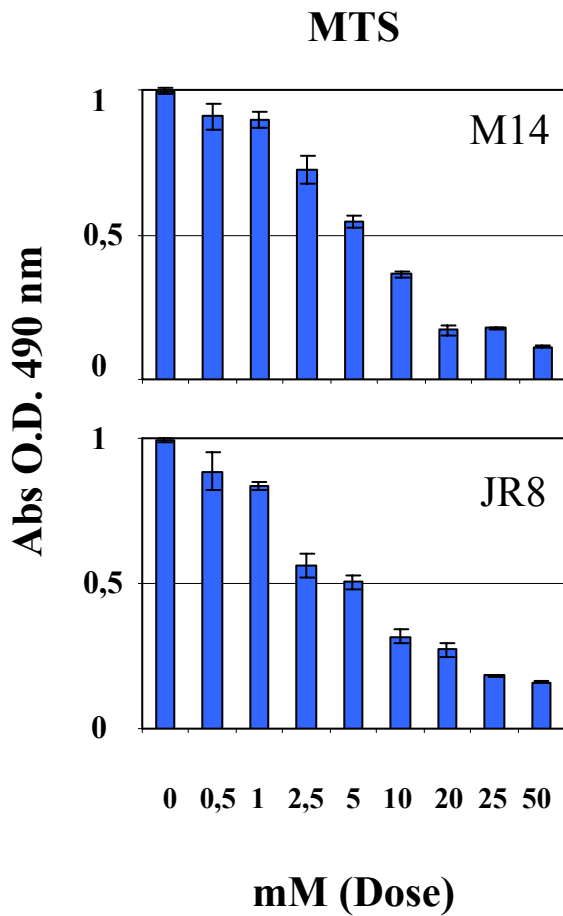
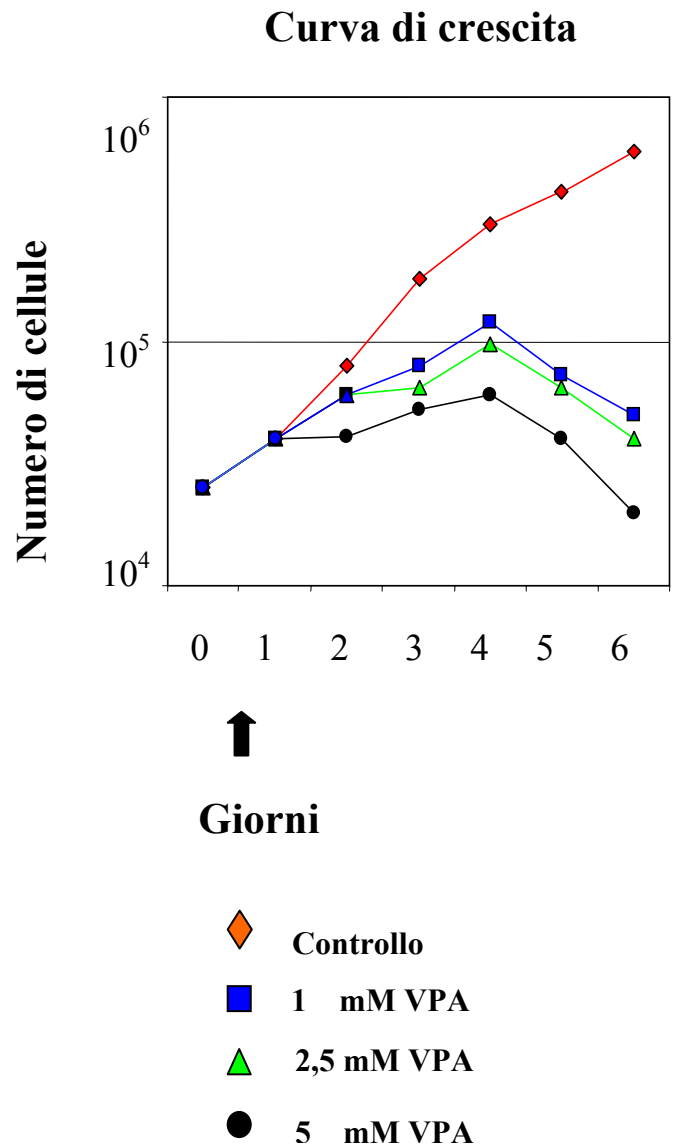


Fig. 2B



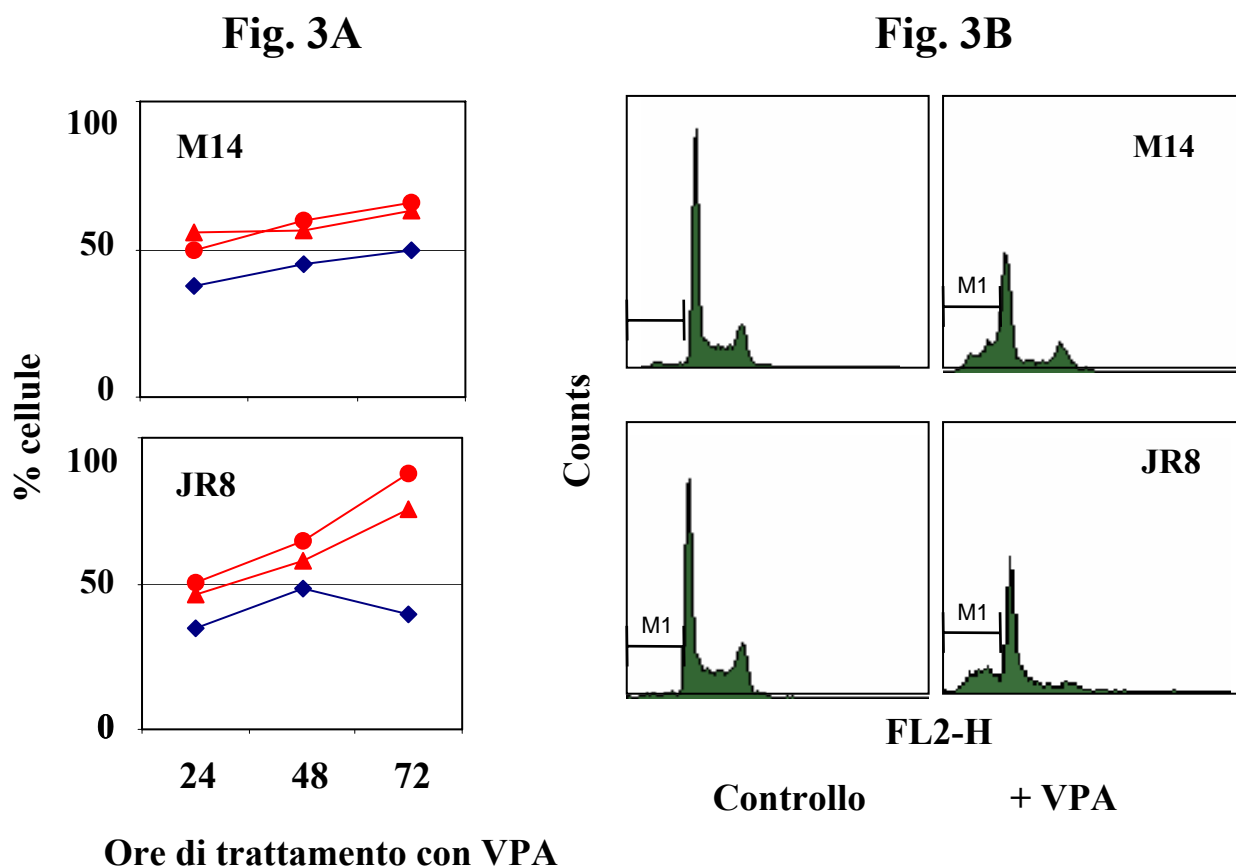
In seguito allo studio sugli effetti antiproliferativi del VPA, abbiamo analizzato la sua implicazione nel ciclo cellulare mediante l'utilizzo della citofluorimetria. Le cellule sono state trattate con due diverse concentrazioni di farmaco, 2,5 mM e 5 mM, rispettivamente per 24, 48 e 72 ore e i dati sono stati riportati rispetto ai controlli non trattati.

L'esposizione delle cellule all'Acido Valproico ha determinato un blocco

del ciclo cellulare nella fase G0/G1. Infatti dopo 24h, nelle linee M14, si osservava un 50% di cellule bloccate in G1, sia alla dose di VPA 2,5 mM che alla dose di VPA 5 mM. A 48h dal trattamento, si otteneva un aumento della percentuale di cellule bloccate fino al 55%, sia per la dose di VPA 2,5 mM che alla dose di VPA 5 mM. Il 64% di cellule in fase G0/G1 era evidente dopo 72h di trattamento ad entrambe le dosi.

Diversamente dalle M14, le JR8 sembravano subire in modo più sensibile la perturbazione del ciclo cellulare, indotta dal VPA, mostrando una percentuale del 65% di cellule bloccate in G1 già dopo 48h di esposizione alle dosi 2,5 e 5 mM. L'effetto massimo si riscontrava dopo 72h di trattamento, con il risultato di 76% di cellule bloccate in G1 alla concentrazione di 2,5 mM e dell'88% alla concentrazione di 5 mM (fig. 3A).

In associazione all'analisi condotta sull'arresto del ciclo cellulare, in seguito a trattamento con VPA, abbiamo verificato la possibile modulazione del processo di morte programmata (apoptosi) da parte dell'Acido Valproico stesso, in quanto l'analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA mostrava il caratteristico picco ipodiploide (sub-G1), indice della presenza di cellule apoptotiche nella popolazione in analisi. L'induzione di apoptosi è stata riscontrata su entrambe le linee cellulari trattate dopo 72h alle dosi 2,5 e 5 mM di VPA (fig 3B).



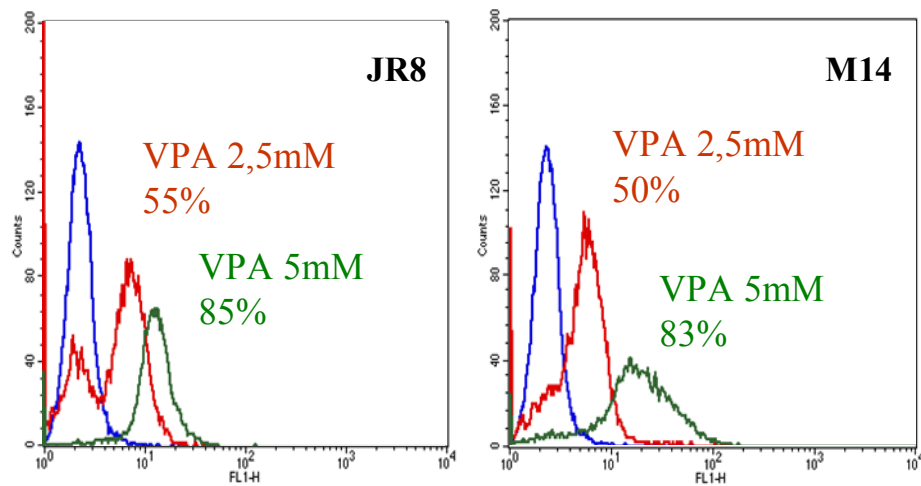
Ore di trattamento con VPA

- ◆ Controlli
- ▲ 2,5 mM
- 5 mM

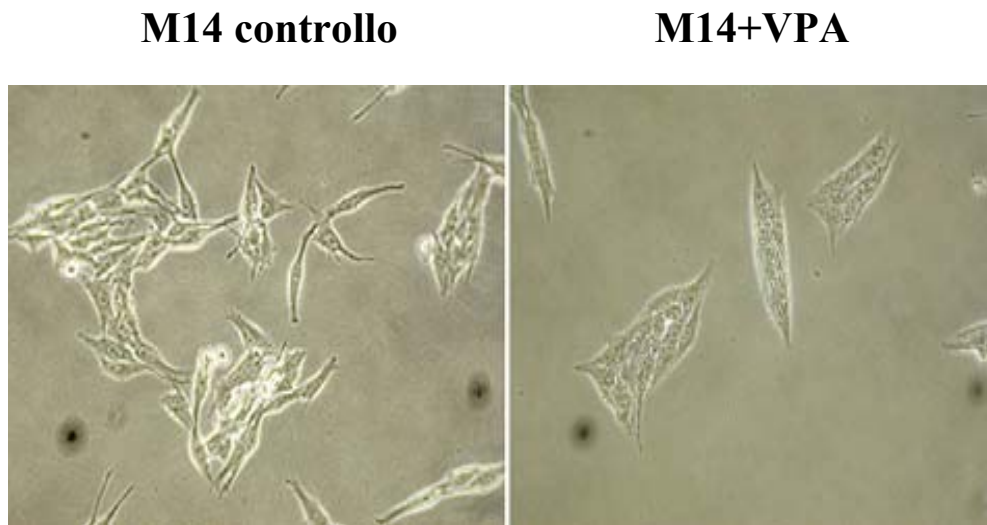
Abbiamo quindi verificato l'aumentata incidenza di morte programmata attraverso un test più specifico per quantizzare l'avvenuta apoptosi [TUNEL (Terminal transferase dUTP Nick-End Labeling)]. Le linee cellulari M14 e JR8 sono state trattate con diverse concentrazioni di VPA (2,5 mM e 5 mM) per 72 ore e abbiamo osservato che, il trattamento con VPA alla concentrazione di 2,5 mM, determinava sulla linea cellulare JR8, un'induzione di apoptosi pari al 55% e alla dose di 5 mM, pari all'85% (fig. 4).

Nelle M14 il VPA mostrava una efficacia sovrapponibile nell'induzione dell'apoptosi alle medesime concentrazioni: in particolare il trattamento a 2,5

mM induceva il 50% di apoptosi e l'83% alla dose di 5 mM suggerendo che, le 2 linee, pur mostrandosi diversamente sensibili al blocco in G1 indotto dal VPA, presentavano entrambe una stessa quota di cellule in cui era indotta l'apoptosi.

Fig.4

Inoltre abbiamo osservato che, in seguito al trattamento con VPA, le linee di melanoma subivano un cambiamento morfologico indirizzandosi verso un fenotipo differenziato. La figura 5 riporta la fotografia della linea M14 in cui, in seguito a trattamento con l'Acido Valproico, abbiamo osservato una perdita dei caratteristici prolungamenti pseudo-dendritici e la presenza di cellule più compatte.

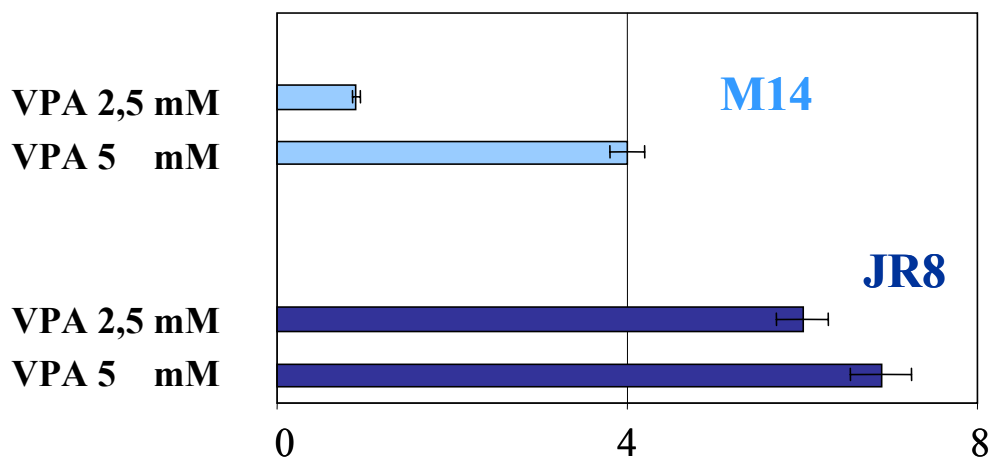
Fig. 5

Per interpretare gli effetti biologici, osservati dopo il trattamento con il VPA, abbiamo esaminato l'aspetto molecolare analizzando le modulazioni sia a livello dell'espressione genica che a livello proteico.

Mediante la tecnica QRT-PCR (Quantitative Real Time PCR) abbiamo valutato l'espressione di *p16* utilizzando l'mRNA estratto da entrambe le linee (M14, JR8) trattate per 48h con le due diverse concentrazioni di VPA: 2,5 mM e 5 mM. Come mostrato in figura 6 l'espressione di *p16* aumentava di 1.5 volte dopo esposizione alla dose 2,5 mM e di 4 volte in corrispondenza della dose 5 mM, nelle M14 rispetto al controllo. Nella linea cellulare JR8 questa ri-espressione risultava essere ancora più marcata, con un aumento di 5 volte, alla concentrazione 2,5 mM e di 7.5 volte rispetto al controllo, alla dose di 5 mM di VPA.

Fig.6

Espressione di p16 relativa al controllo

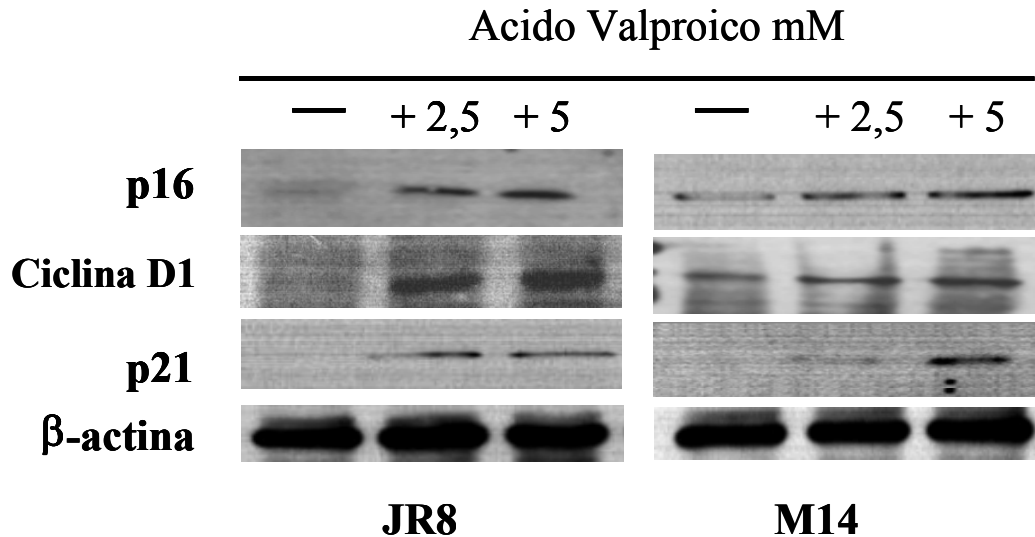


Successivamente abbiamo confermato l'analisi dell'espressione genica di *p16* in Western Blotting, per valutarne la modulazione a livello proteico. Come è evidente nella figura 7, oltre all'espressione di *p16*, abbiamo analizzato anche l'espressione delle proteine che regolano la transizione G0/G1 del ciclo cellulare.

In particolare abbiamo osservato, in entrambe le linee, un aumento dell'espressione della proteina p16 nelle cellule trattate con VPA rispetto ai controlli. Inoltre, associato al blocco in G1 precedentemente descritto, abbiamo riscontrato un aumento dell'espressione proteica della Ciclina D1 e dell'inibitore ciclina-cdk p21, in entrambe le linee di melanoma umano, sia alla dose 2,5 mM che alla dose 5 mM di VPA. La β -actina è stata utilizzata come controllo per la normalizzazione.

Fig. 7

Il VPA induce l'arresto in G1 attraverso la sovra-espressione della ciclina D1, p16 e p21



2. Sensibilizzazione ai chemioterapici indotta dal VPA

Per il trattamento del melanoma metastatico esistono diverse strategie terapeutiche a disposizione: dalla monoterapia alla polichemioterapia, dalla bioterapia ai vaccini. La necessità di ottenere risultati migliori sia in termini di risposta, ma soprattutto in termini di sopravvivenza, ha portato allo sviluppo di regimi terapeutici di combinazione con diversi farmaci.

Al fine di verificare un possibile effetto di sensibilizzazione agli antitumorali da parte dell'Acido Valproico, abbiamo analizzato l'efficacia del VPA in associazione con altri chemioterapici,.

Una volta individuata la dose letale al 50% per i due chemioterapici (fig.

8A) abbiamo osservato che in seguito a somministrazione contemporanea del VPA e del *cis*-Platino o dell'etoposide si determinava una citotossicità di circa il 50% già alle basse concentrazioni di *cis*-Platino (2,5 μ M) e di etoposide (0,5 μ M), rispetto ai chemioterapici e al VPA somministrati singolarmente (fig. 8B).

I dati di tossicità ci indicavano chiaramente una sensibilizzazione delle cellule di melanoma da parte dell'Acido Valproico al trattamento con i chemioterapici etoposide e *cis*-Platino.

Fig. 8A

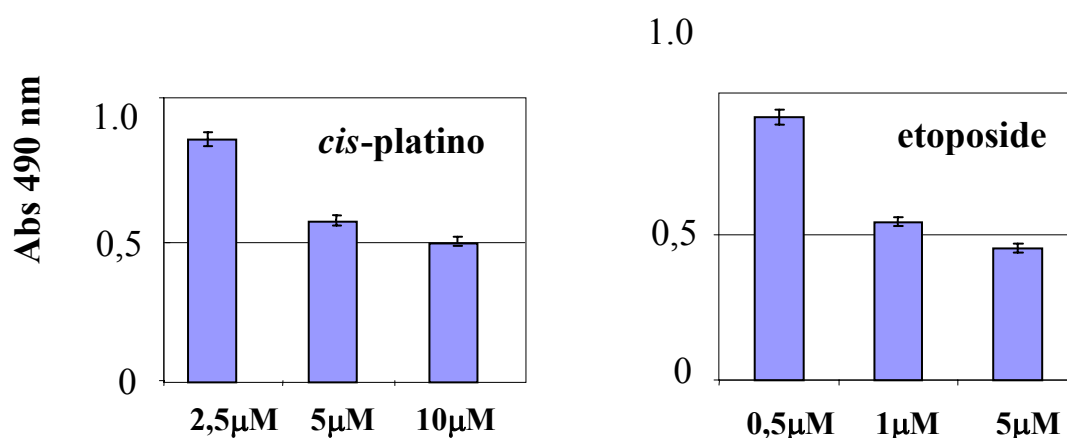
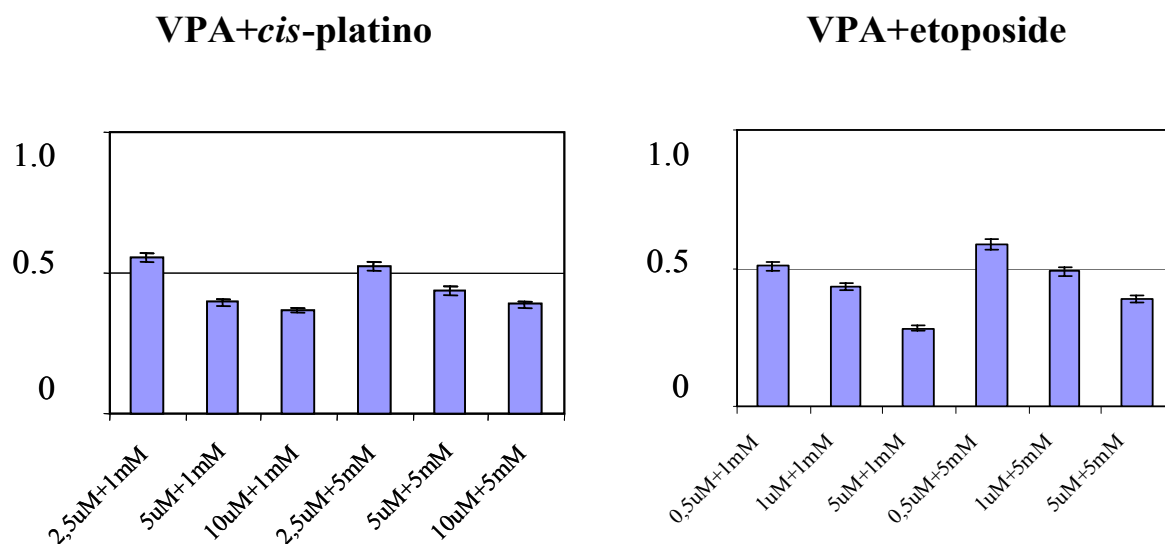


Fig. 8B

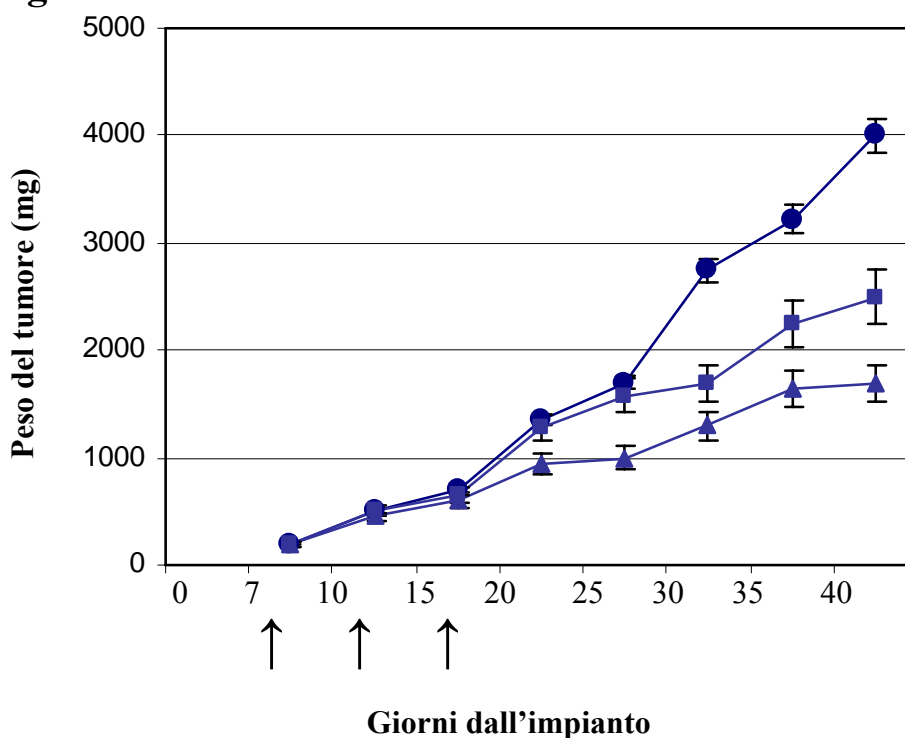


Questi dati ci indicano che i due farmaci somministrati contemporaneamente determinano un effetto sinergico poiché il C.I. (combination index) risulta essere < 1 , ossia 0,833 sia per la combinazione con il *cis*-Platino che per la combinazione con l'etoposide.

3. Effetti dell'associazione VPA e *cis*-Platino *in vivo* e valutazione dell'effetto antimetastatico

Successivamente abbiamo voluto verificare su modelli murini gli effetti osservati *in vitro*. La linea cellulare di melanoma umano M14 è stata, quindi, innestata i.m. in topi^{nu/nu}. L'acido valproico è stato somministrato i.v. alle dosi di 250mg/kg e 500mg/kg, dosi corrispondenti al protocollo terapeutico per le patologie epilettiche e per i disturbi bipolari. La somministrazione del VPA è avvenuta in un primo bolo al 7^{mo} giorno, e seguentemente al giorno 12^{mo} e al giorno 18^{mo} dalla comparsa del tumore, così come evidenziato dalle frecce nella figura 9.

Fig.9



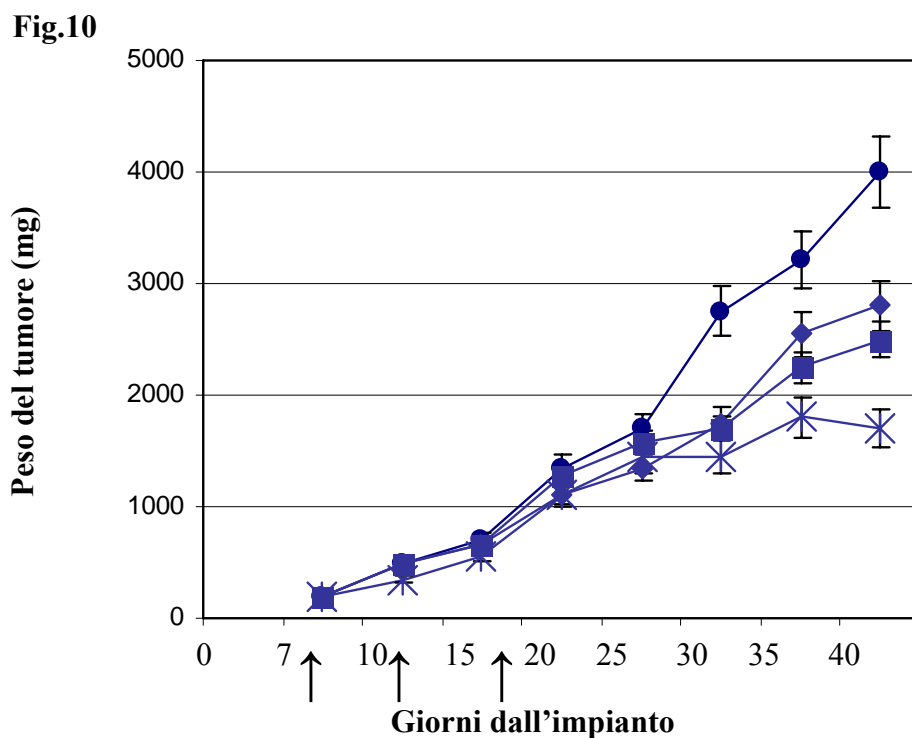
È evidente come seguendo la crescita del tumore nel tempo si osserva una diminuzione della massa tumorale in seguito al trattamento con acido valproico sia alla dose di 250mg/kg che alla dose massima di 500mg/kg. Questo effetto è dose dipendente e raggiunge il 37% nei topi trattati con VPA 250mg/kg e il 50% nei topi trattati con VPA 500 mg/kg, è necessario aggiungere che alla dose massima si è osservata una mortalità (3/10 topi) probabilmente dovuta a una tossicità aspecifica del farmaco.

I topi sono stati in seguito sacrificati per valutare l'eventuale effetto antimetastatico del farmaco, contando le metastasi polmonari. Dalla tabella 1 si evince che il VPA in singola somministrazione non è in grado di ridurre in maniera statisticamente significativa, la capacità metastatica del melanoma poiché alla dose tossica di 500mg/kg abbiamo osservato una riduzione delle metastasi solo del 40 % circa.

Tabella 1. Metastasi polmonari (VPA singolo)

	Numero mediano di metastasi polmonari (range)
controllo	24 (15-30)
VPA 250 mg/kg	18 (10-22)
VPA 500 mg/kg	15 (10-21)

Per confermare i dati ottenuti *in vitro* riguardanti l'effetto sinergico dei due farmaci, abbiamo somministrato in concomitanza il VPA e il *cis*-Platino. Nella figura 10 è riportata la crescita del tumore (M14) in seguito a trattamento con VPA singolo (◆), *cis*-Platino singolo (■) ed i due farmaci in combinazione somministrati contemporaneamente (*). Dal grafico si osserva che la combinazione del trattamento VPA+cisPlatino inibisce la crescita del melanoma



nel topo del 48% rispetto al controllo e del 30% rispetto al VPA e al *cis*-Platino somministrati singolarmente. Sicuramente il dato più significativo si osserva

nella valutazione delle formazioni di metastasi polmonari che diminuiscono del 40% nei topi trattati con VPA+cis-Platino rispetto ai singoli trattamenti e del 45% rispetto al controllo (Tab.2).

Tabella 2. Metastasi polmonari associazione VPA+cis-Platino (somministrazione contemporanea)

	Numero mediano di metastasi polmonari (range)
controllo	23 (13-28)
VPA 250 mg/kg	16 (8-21)
Cis-Pt 3,3 mg/kg	18 (10-24)
VPA+cis-Pt	12 (5-16)

Nel tentativo di individuare un protocollo terapeutico più efficace e che soprattutto sfruttasse l'azione farmacologica naturale dei due farmaci (il primo VPA, inibitore delle deacetilasi il secondo *cis*-Platino, intercalante il DNA) abbiamo trattato i topi in sequenza con i due farmaci: dosi di VPA 250mg/kg (↑) per 3 giorni consecutivi e dopo 5 giorni due dosi seguenti di *cis*-Platino 3,3mg/kg (↑) (fig.11). Seguendo questo protocollo abbiamo evidenziato un potenziamento dell'effetto inibitorio sulla crescita tumorale del *cis*-Platino, dovuto al pre-trattamento con acido valproico. L'inibizione della crescita tumorale era del 61% (*versus* controllo) nel trattamento sequenziale VPA→*cis*-Platino rispetto al 35% (*vs* controllo) osservato nelle dosi singole dei due farmaci. Inoltre come evidente dalla tabella 3, si è osservato un effetto antimetastatico significativo poiché si ha una riduzione delle metastasi del 70% circa rispetto al controllo, dopo trattamento secondo il protocollo sequenziale

VPA→*cis*-Platino. Nella sequenza di trattamento *cis*-Platino→VPA non abbiamo osservato inibizioni della crescita tumorali significative rispetto ai trattamenti singoli.

Fig.11

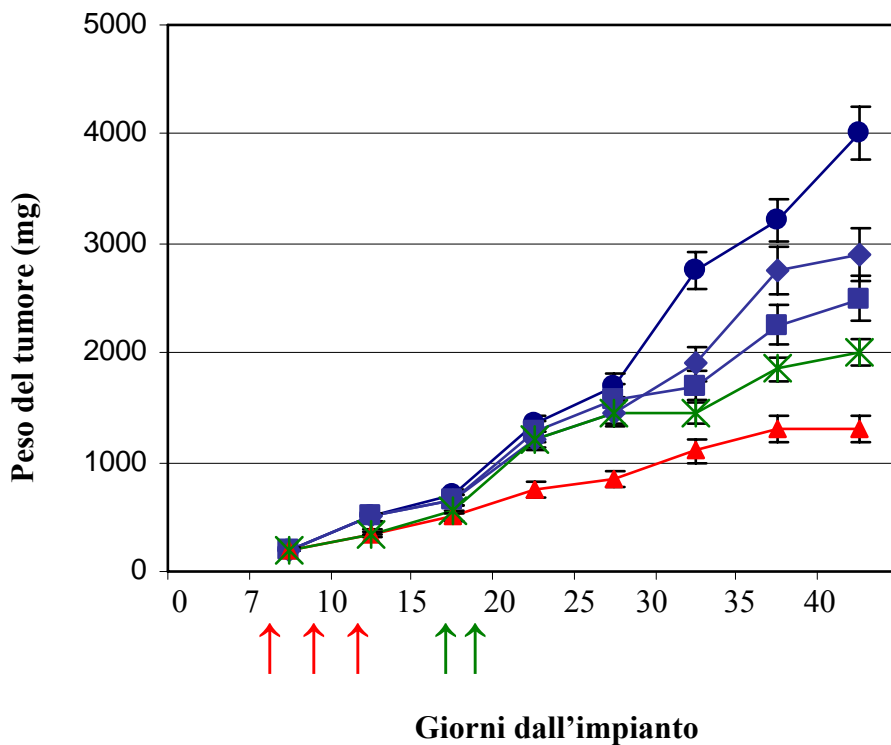
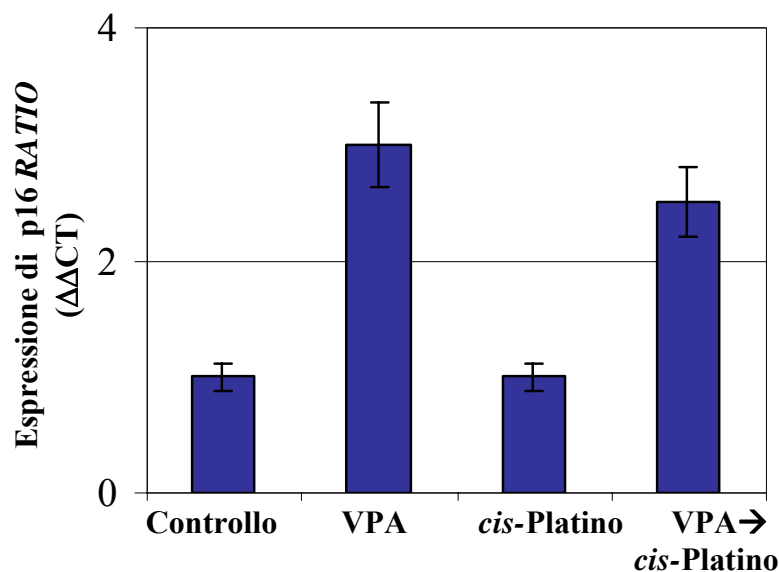


Tabella 3. Metastasi polmonari associazione VPA+*cis*-Platino (somministrazione sequenza)

	Numero mediano di metastasi polmonari (range)
controllo	25 (10-31)
VPA 250 mg/kg	18 (10-24)
Cis-Pt 3,3 mg/kg	15 (11-23)
Cis-Pt+VPA	12 (5-21)
VPA+Cis-Pt	8 (0-18)

Per valutare se l'acido valproico agisse inibendo la crescita tumorale *in vivo* attraverso la modulazione molecolare di *p16*, così come già valutato *in vitro*, abbiamo studiato l'espressione genica di questo inibitore delle chinasi/ciclino-dipendenti nel nostro modello.

Fig.12

Dai dati ottenuti in QReal-time PCR, abbiamo osservato che l'espressione di *p16* aumenta nei tumori trattati con VPA singolo, di 3 volte rispetto al controllo e di 2,5 volte nei tumori trattati con acido valproico e *cis*-Platino in sequenza. Nei tumori trattati singolarmente con *cis*-Platino l'espressione di *p16* risulta essere sovrapponibile a quella del controllo, suggerendo così che l'effetto terapeutico osservato nel protocollo di trattamento sequenziale è attribuibile alla aumentata espressione di *p16*.

Discussione

La potenzialità dell'Acido Valproico come agente antiproliferativo nel trattamento dei tumori è attualmente oggetto di intenso studio. Il nostro interesse è stato quello di testare il VPA sul melanoma umano, che tende spesso a sviluppare resistenze ai protocolli di terapia chemioterapica convenzionale.

Abbiamo quindi valutato, attraverso studi *in vitro* ed *in vivo*, l'efficacia dell'Acido Valproico come adiuvante nella terapia del melanoma.

L'acido valproico agisce come inibitore dell'attività delle istone deacetilasi (HDACs), enzimi che catalizzano la deacetilazione degli istoni. Sia l'acetilazione che la deacetilazione degli istoni svolgono un ruolo essenziale nella modificazione della struttura della cromatina e nella regolazione dell'espressione genica negli eucarioti. In particolare la deacetilazione della cromatina ad opera delle HDACs induce la repressione genica (90). Questi enzimi svolgono funzioni biologiche specifiche, per esempio la HDAC6 agisce come deacetilasi specifica dell' α -tubulina la cui iperespressione promuove movimenti cellulari chemiotattici, una funzione correlata ai microtubuli (90).

Gli inibitori delle HDACs sono capaci di dereprimere geni la cui espressione è bloccata da una alterata ipoacetilazione della cromatina, generando quindi processi come apoptosi, necrosi, differenziazione e inibizione della proliferazione.

Nei nostri esperimenti abbiamo considerato l'effetto biologico dell'Acido

Valproico sulle linee cellulari umane di melanoma M14 e JR8.

Il trattamento con VPA ha evidenziato un'inibizione dell'attività delle HDACs in maniera dose-dipendente in entrambe le linee cellulari.

In associazione allo studio sull'attività delle istone deacetilasi abbiamo valutato quindi la iperacetilazione della tubulina. Questa proteina è una delle prime coinvolte nel processo di acetilazione e, in seguito all'inibizione delle HDAC da parte del VPA, abbiamo osservato un aumento significativo della acetilazione già dopo 48h, confermando quindi l'azione di inibitore delle HDACs da parte del farmaco.

Successivamente abbiamo studiato gli effetti biologici del VPA in seguito a inibizione delle HDACs sulle linee cellulari di melanoma umano (M14 e JR8), valutando sia l'attività citotossica del farmaco, che l'inibizione della crescita cellulare. Il VPA mostrava un effetto citotossico dose-dipendente raggiungendo l'IC50 già alla dose di 2,5 mM nella linea JR8. Si riscontrava, peraltro, sia nelle M14 che nelle JR8, una significativa inibizione della crescita cellulare, così come è stato osservato tramite curve di crescita; l'effetto antiproliferativo inoltre era direttamente proporzionale alla dose somministrata, indicando una dose-dipendenza nell'azione dell'Acido Valproico.

Inoltre abbiamo osservato modifiche fenotipiche delle cellule di melanoma, in seguito a trattamento con VPA. In particolare abbiamo individuato una perdita dei caratteristici prolungamenti pseudo-dendritici e la presenza di cellule più compatte e di aspetto tondeggiate, probabilmente a

causa dell'attività del farmaco che interferisce con l'espressione di geni codificanti per proteine del citoscheletro.

Studi più approfonditi sul meccanismo biologico, suggeriti dall'azione differenziante del VPA (69), hanno messo in evidenza che l'azione antiproliferativa dell'Acido Valproico si esplica in duplice attività, sia perturbando il ciclo cellulare, che sull'induzione di apoptosi.

In seguito a trattamento con le due dosi analizzate di VPA (2,5 e 5 mM) abbiamo osservato nel tempo un incremento del blocco del ciclo in G1, evidenziando un effetto molto significativo, con un massimo dell'80% di cellule bloccate in G1 nella linea JR8, ed una percentuale del 60% nella linea M14.

Per quanto riguarda, inoltre, la capacità dell'Acido Valproico di indurre apoptosi abbiamo analizzato la formazione di corpi apoptotici, attraverso metodica citofluorimetrica del contenuto di DNA e attraverso il saggio TUNEL, evidenziando la presenza di una popolazione apoptotica in entrambe le linee, trattate alle dosi di 2,5 e 5 mM di VPA, che mostravano il caratteristico picco ipodiploide (sub-G1).

Attraverso il saggio TUNEL abbiamo quantizzato i dati di induzione apoptotica, osservando una percentuale di induzione di apoptosi sovrapponibile per le due linee analizzate suggerendo che, sebbene le M14 e le JR8 presentassero una differente sensibilità al blocco in G0/G1, entrambe mostravano una stessa sensibilizzazione all'induzione dell'apoptosi da parte del VPA.

A tutt'oggi le basi molecolari dell'effetto antitumorale del VPA non sono ancora del tutto chiare e molti studi sono ancora in corso (90). In seguito alle osservazioni sui dati biologici ottenuti dopo trattamento con VPA, abbiamo indagato quali meccanismi molecolari venissero modulati nelle nostre linee di melanoma.

Il significativo effetto del VPA come antitumorale, nelle linee cellulari analizzate, è stato evidenziato attraverso l'analisi d'espressione di molecole coinvolte nell'omeostasi del ciclo cellulare. In entrambe le linee studiate abbiamo riscontrato un'aumentata espressione genica della proteina di *p16*, importante regolatore del ciclo cellulare. Proprio la funzione di *p16* come inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti, lo configura come un gene onco-soppressore in quanto, in sua mancanza, viene meno un controllo negativo sulla proliferazione cellulare. Mutazione di *p16* sono state trovate in un'alta percentuale di tumori umani di diversa origine istologica, incluso il melanoma, indicando il possibile ruolo generale delle alterazioni di *p16* nella trasformazione neoplastica di diversi tessuti.

Successivamente abbiamo confermato l'analisi dell'espressione genica di *p16* in Western Blotting per valutare se la modulazione genica venisse confermata a livello proteico, in seguito a trattamento con VPA. Abbiamo analizzato, oltre all'espressione di *p16*, anche l'espressione delle proteine che regolano la transizione G0/G1 del ciclo cellulare. In particolare abbiamo evidenziato che, nelle cellule trattate con VPA 2,5 e 5 mM, si osservava un

aumento della ciclina D1 e dell'inibitore del complesso ciclina-cdk, *p21*. L'aumentata espressione di queste proteine risultava quindi essere in accordo con il blocco in G1 osservato.

Dal momento che la terapia del melanoma risulta spesso inefficace a causa delle resistenze e della refrattarietà, molti studi sono stati indirizzati verso una associazione dei chemioterapici convenzionali, utilizzati in monoterapia, con nuovi farmaci (32).

In particolare abbiamo analizzato l'efficacia del VPA in associazione con altri chemioterapici al fine di verificare un possibile effetto di sensibilizzazione agli antitumorali da parte dell'Acido Valproico stesso.

Nel nostro esperimento, in seguito a trattamento con VPA ed etoposide o cisplatino, somministrati contemporaneamente, abbiamo evidenziato un effetto citotossico già alle dosi meno concentrate dei chemioterapici, rispetto ai trattamenti in singolo di *cis*-Platino, etoposide e di VPA. Inoltre l'effetto di associazione dell'acido valproico sia con il *cis*-Platino che con l'etoposide è risultato di tipo sinergico così come calcolato dal C.I. (88).

I nostri dati *in vitro* indicano chiaramente come l'Acido Valproico possa essere un efficace antitumorale nel trattamento del melanoma umano, grazie alle sue caratteristiche di agente antiproliferativo ed essendo induttore di apoptosi.

In seguito i dati *in vivo* ci hanno dato conferma del fatto che il VPA può essere considerato coadiuvante alla chemioterapia classica, infatti il protocollo

terapeutico di sequenza acido valproico → *cis*-Platino, studiato su topi nu/nu in cui è stata precedentemente innestata la linea cellulare di melanoma umano (M14), determina una inibizione della crescita del melanoma *in vivo* considerevole.

L'inibizione della crescita tumorale infatti passa da 48% determinato dal trattamento concomitante VPA+*cis*-Platino con un effetto antimetastatico del 40%, ad una inibizione del 61% dopo somministrazione in sequenza VPA → *cis*-Platino, con un effetto antimetastatico del 70% circa. Inoltre nei tumori trattati con VPA → *cis*-Platino si osservava anche un aumento di espressione di *p16*, suggerendo che l'effetto terapeutico osservato nel protocollo di trattamento sequenziale è attribuibile alla aumentata espressione di *p16* e presumibilmente al ripristino del ciclo cellulare nel melanoma.

Dai dati ottenuti ed in considerazione del fatto che l'acido valproico è un farmaco generalmente ben tollerato, si potrebbe ipotizzare il suo utilizzo come coadiuvante nella terapia del melanoma.

Bibliografia

1. Comoglio P.M. *La Cellula Neoplastica*. In: Progressi nella ricerca sul cancro. Le Scienze S.p.A. ed., Milano, 1989, p.40-41.
2. Robbins S.L. et al. *Le Basi Patologiche delle Malattie*. Piccin ed., Padova, 1989, p. 267-344.
3. Comoglio P.M. e Naldini, L. *La Biologia Molecolare della Metastasi*. In: Il cancro. Ricerca e applicazioni cliniche. Le Scienze S.p.A ed., Milano,1994, p. 31-40.
4. Ruoslathi E. *Come si Diffonde il Cancro*. Le Scienze, 339: 38-45, 1996.
5. Squartini F. *Progressione Neoplastica*. In: Comoglio P.M. Biologia della cellula neoplastica. UTET, Torino, 1992, p. 11-37.
6. Bianco A.R. *Manuale di Oncologia Medica*. McGraw-Hill, 1996, p.131-136.
7. Fearon E.R. e Vogelstein B. *A Genetic Model for Clorectal Tumorigenesis*. Cell vol 61:759-767, 1990.
8. Rosenthal M.A. e Ramsay R.G. *Molecular Biology of Colorectal Cancer*. Diagn.Oncol. vol 95: 73-79, 1994.

9. Vogelstein B. e Kinzler K.W. *The Multistep Nature of Cancer*. Trends Genet. vol 9:138-141, 1993.
10. Jimbow K, Quevedo W Jr, Fitzpatrick T, et al “*Biology of melanocytes*”. Dermatology in General Medicine 4th ed. New York. McGraw Hill, p261, 1993.
11. Ito S “*Biochemistry and physiology of melanin: Pigmentation and Pigmentary Disorders*”. Boca Raton, Fla: CRC Press, p33, 1993.
12. Bouchard B, Fuller BB, Vijayasaradhi S et al “*Induction of pigmentation in mouse fibroblasts by expression of human tyrosinase cDNA*”. J Exp Med 169:2029, 1989.
13. King R, Townsends D, Oetting W “*Inherited hypopigmentary disorders*”. Boca Raton, Fla: CRC Press, p297, 1993.
14. Peak MJ, Peak JG, Carnes BA “*Induction of direct and indirect single-strand breaks in human cell DNA by far and near ultraviolet radiations: action spectrum and mechanism*”. Photochem Photobiol 45:381, 1987.
15. Setlow RB, Carrier WL “*Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's*”. J Mol Biol 17:237, 1996.
16. Pollock PM, Yu F, Qiu L, et al “*Evidence for u.v. induction of CDKN2 mutations in melanoma cell line's*”. Oncogene 11:663, 1995.

17. Halaban R “*Growth factors and melanomas*”. *Semin Oncol* 23:673, 1996.
18. Halaban R, Langdon R, Birchall N, et al “*Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes*”. *J Cell Biol* 107:1611, 1988.
19. Halaban R “*Growth factors and tyrosine protein kinase in normal and malignant melanocytes*”. *Cancer Metastasis Rev* 10:129, 1991.
20. Gilchrest B, Park H, Eller M, et al “*Mechanism of ultraviolet light-induced pigmentation*”. *Photochem Photobiol* 63:1, 1996.
21. Year M, Grossman K, Eller M, et al “*Evidence for nerve growth factor mediated paracrine effects in human epidermis*”. *J Cell Biol* 115:821, 1991.
22. Rhodes A “*Neoplasm: benign neplasias, hyperplasias, and dysplasias of melanocytes*”. *Dermatology in General Medicine*, 4th ed., p.996, 1993.
23. Tucker MA, Halpern A, Holly EA, et al “*Clinicallly recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma*”. *JAMA* 277:1439, 1997.
24. Barnhill R, Mihm M Jr, Fitzpatrick T, et al “*Neoplasm: Malignant melanoma*”. *Dermatology in General Medicine*, 4th ed., p1078, 1993.

25. Brady MS, Coit DG “*Sentinel lymph node evaluation in melanoma*”. Arch Dermatol 133:1014, 1997.
26. Clark WH Jr, Elder DE, Guerry DT, et al “*Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression*”. J Natl Cancer Inst 81:1893, 1989.
27. Clark WH Jr, From L, Bernardino EA, et al “*The histogenesis and biologic behaviour of primary human malignant melanomas of the skin*”. Cancer Res 29:705, 1969.
28. Breslow A: *Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma*”. Ann Surg 172:902, 1970.
29. Schuchter L, Schultz DJ, Synnestvedt M, et al “*A prognostic model for predicting 10-year survival in patients with primary melanoma. The pigmented Lesion Group*”. Ann Intern Med 125 :369, 1996.
30. Khayat et al : *Educational book*”. 36th ASCO annual meeting
31. A. Meulemans et al “*Permeability of two nitrosureas, carmustine and fotemustine, in rat cortex*”. Chemotherapy, 35 (5), 1989.
32. Chapman P.B et al “*Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma*”. Melanoma Res., 17 (9), 1999.
33. CI. Falkson et al “*Experience with interferon α -2b combined with dacarbazine in the treatment of metastatic malignant melanoma*”. Med. Oncology, 12 (1), 1995.

- 34.DB. Thomson et al “*Interferon alpha-2a does not improve response or survival when combined with dacarbazine in metastatic malignant*”. Res., 3 (2), 1993.
- 35.E. Bajetta et al “*Multicenter randomized trial of dacarbazine alone or in combination with two different doses and schedules of interferone α -2b in the treatment of advance melanoma*”. Journal of Clinical Oncology, 12 (4), 1994.
- 36.CI. Falkson et al “*Phase III trial dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study*”. Journal of Clinical Oncology, 16 (5), 1998.
- 37.E. Gilboa: “*The promise of cancervaccines*”. Nat. Rev.Cancer4(5): 401-411, 2004.
- 38.Berzofsky J. A., Tarabe M, S. Oh, I. M. Belyakov, J. D. Ahlers, J. E. Janikand JC Morris “*Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer*”. J. Clin. Invest. 113: 1515-1525, 2004.
- 39.Xiong Y, Zhang H, Beach D. “*Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation*”. Genes Devel., 7: 1572-1583, 1993.

40. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. "*A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*". *Nature*, 366: 704-707, 1993.
41. Morgan D. "*Principles of CDK regulation*". *Nature*, 374: 131-135, 1995.
42. Nobori T, Miura K, Wu DJ, et al "*Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers*". *Nature*, 368: 753-756, 1994.
43. Hong-Van Le, Andy J. Minn, Joan Massague "*Cyclin-dependent kinase inhibitors uncouple cell cycle progression from mitochondrial apoptotic functions in DNA-damaged cancer cells*". *J Biol Chem*, Sep 9;280(36): 32018-25, 2005.
44. Monzon J, Liu L, Brill H, et al "*CDKN2A mutations in multiple primary melanomas*". *N. Engl. J. Med.*, 338: 879-887, 1998.
45. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J., et al "*A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types*". *Science*, 264: 436-440, 1994.
46. Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles E, et al "*Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus*". *Nat Genet* 8:23, 1994.

47. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, et al “*Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest*”. *Cell* 83 :993, 1995.
48. Fountain JW, Bale SJ, Housman DE, et al “*Genetics of melanoma*”. *Cancer Surv* 9 :645, 1990.
49. Thompson FH, Emerson J, Olson S, et al “*Cytogenetics of 158 patients with regional or disseminated melanoma. Subset analysis of near-diploid and simple karyotypes*”. *Cancer Genet Cytogenet* 83 :93, 1995.
50. Cannon-Albright L.A, Goldgar D.E, Meyer L.J., et al “*Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22*”. *Science*, 258: 1148-1151, 1992.
51. Hussussian CJ, Struwing JP, Goldstein AM, et al “*Germline p16 mutations in familial melanoma*”. *Nat Genet. Sep;8(1):15-21, 1994.*
52. Bressac de Paillerets B, Soufir N, Chompret A, et al “*Germline mutations in p16 and CDK genes in 38 melanoma families*”. *Melanoma Res* 7:132, 1997.
53. Monzon J, Liu L, Bull H, et al “*CDKN2A mutations in multiple primary melanomas*”. *N. Engl. J. Med.*, 338: 879-887, 1998.
54. Ohta M, Nagai H, Schimizu, et al “*Rarity of somatic and germline mutations of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor gene, CDK4I, in melanoma*”. *N Engl J Med* 338:879, 1994.

55. Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, et al. “*Loss of expression of melanocytic lesions correlates with invasive stage of tumor progression*”. *Cancer Res* 56:5023, 1996.
56. Merlo A, Herman JG, Mao L, et al. “*5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers*”. *Nat Med* 1:686, 1995.
57. Regan CM, et al. “*Therapeutic levels of sodium valproate inhibit mitotic induces in cells of neural origin*”. *Brain Res* 347:394-398, 1985.
58. Martin ML, Regan CM. “*The anticonvulsant valproate teratogen restricts the glial cell cycle at a defined point in the mid-G1 phase*”. *Brain Res* 554:223-228, 1991.
59. Leszczyniecha M, Roberts T, Dent P, et al. “*Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical application*”. *Pharmacol. Ther.* 90:105-156, 2001.
60. Nojiri H, Manya H, Isono H, et al. “*Induction of terminal differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cells by brefeldin A, a drug affecting ganglioside biosynthesis*”. *FEBS Lett.* 453:140-144, 1999.
61. Cinatl J. Jr, Cinatl J., Driever PH et al. “*Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells*”. *Anticancer drugs* 8:958-963, 1997.

62. Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, et al.. “*Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells*”. EMBO J 20:6969-6978, 2001.
63. Sackellares JC, Sato S, Dreifus FE, Penry JK. “*Reduction of steady-state valproate levels by others antiepileptic drugs*”. Epilepsia 22:437-441, 1981.
64. Vasudev K, Das S, Goswami U, Tayal G. “*Pharmacokinetics of valproic acid in patients with bipolar disorder*”. J. Psychopharmacol. 15:187-190, 2001.
65. Driever PH, Knupher MM, Cinatl J, Wolff JE. “*Valproic acid for the treatment of pediatric malignant glioma*”. Klin. Pediatr. 211:323-328, 1999.
66. Loeschner W. “*Valproate: a reappraisal of its pharmacodynamic properties and mechanism of action*”. Prog. Neurobiol. 58:31-59, 1999.
67. Miller AC, Whittaker T, Thibault A, Samid D. “*Modulation of radiation response of human tumor cells by differentiation inducers, phenylacetate and phenylbutyrate*”. Int J Radiat. Biol. 72:211-218, 1997.
68. Yuan PX, Huang LD, Jiang YM, Gutkind JS, Manji HK., Chen G. “*The mood stabilizer valproic acid activates mitogen-activated protein kinases and promotes neurite growth*”. J Biol Chem. 276:31674-31683, 2001.

69. Chen G, Yuan P, Hawver DB, Potter WZ, Manji HK. "Increase in AP-1 transcription factor DNA binding activity by valproic acid". *Neuropsychopharmacology* 16:238-245, 1997.
70. Wlodarczyk BC, Craig JC, Bennet GD, Calvin JA, Finnel RH. "Valproic acid-induced changes in gene expression during neurulation in a mouse model". *Teratology* 54:284-297, 1996.
71. Chen G, Yuan PX, Jiang YM, Huang LD, Manji HK. "Valproate robustly enhances AP-1 mediated gene expression". *Brain Res* 64:52-58, 1999.
72. Cinatl J Jr., Kotchetkov R., Blaheta R, Hernaiz-Driever P, Vogel JU., Cinatl J. "Induction of differentiation and suppression of malignant phenotype of human neuroblastoma BE(2)-C cells by valproic acid: enhancement by combination with interferon". *Int J. Oncol.* 20:97-106, 2002.
73. Wakabayashi K., Saito H., Ebinuma H., Saito Y., Takagi T., Nakamura M., Umezawa A., Hata J., Ishii H. "Bcl-2 related proteins are dramatically induced at the early stage of differentiation in human liver cancer cells by a histone inhibitor projecting an anti-apoptotic role during this period". *Oncol Rep.* 7:285-288, 2000.
74. Pazin MJ., Kadonaga JT. "What's up and down with histone deacetylation and transcription?" *Cell*, 89:325-328, 1997.

-
75. Mc Garry LC, Winnie JN., Ozanne BW.. *“Invasion of v-Fos (FBR)-transformed cells is dependent upon histone deacetylase activity and suppression of histone deacetylase regulated genes”*. *Oncogene* 23:5284-5292, 2004.
76. Serrano M, Hannon GJ et al. *Nature*. 366:704-707, 1993.
77. *Eur. J. Biochem.* 268:1-6, 2001.
78. Phillips A., Bullock T., Plant N. *“Sodium valproate induces apoptosis in the rat hepatoma cell line, FaO ”*. *Toxicology*, 192:219-227, 2003.
79. Kawagoe R., Kawagoe H., Sano K. *“Valproic acid induces apoptosis in human leukaemia cells by stimulating both caspase-dependent and independent apoptotic signalling pathways”*. *Leuk Res*, 26:495-502, 2002.
80. A. Angelucci, A. Valentini, D. Millimaggi, R. Miano, G.L. Gravina, C. Festuccia, V. Dolo, C. Vicentini, M. Bologna, G. Federici, S. Bernadini *Valproic Acid induces Apoptosis in prostate carcinoma cell lines by activation of multiple apoptotic pathways*. *Anti-Cancer Drugs*. 17(10):1119-1126, November 2006.
81. Takai N, Desmod JC, Kumagei T, Gui D, Said JW, Whittakers S, Miyakawa I, Koeffler HP. *“Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells”*. *Clin. Cancer Res*. 10:1141-1149, 2004.

- 82.**Michaelis M., Michaelis UR., Fleming I., Suhan T., Cinatl J., Blaheta RA, Hoffmann K., Kotchetkov R., Busse R., Nau H., Cinatl J., Jr. *“Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo”*. Mol.Pharmacol, 65:520-527, 2004.
- 83.**Bradbury Ca, O'Neill LP., Turner BM., Craddock CF., Drayson MT., Bunce CM. *“Sodium valproate, an established drug with histone deacetylase inhibitory properties, as adjunctive therapy in acute myeloid leukaemia”*. Blood,102:issue 11, 2003.
- 84.**Drescher B, Görlich K., Döhring A., Ganser A., Heil G., Krauter J. *“Effect of the histone deacetylase inhibitor valproic acid alone and in combination with all-trans retinoic acid on t(15;17) positive leukemic cells”*. Blood, 102:issue 11, 2003.
- 85.**Michaelis M., Suhan T., Cinatl J., Driever PH., Cinatl J, Jr. *“Valproic acid and interferon –alpha synergistically inhibit neuroblastoma cell growth in vitro e in vivo”*. Int. J. Oncol, 25:1795-1799, 2004.
- 86.**Facchetti F, Previdi S, Ballarini M, Minucci S, Perego P and La Porta CA. *“Modulation of pro- and anti-apoptotic factors in human melanoma cells exposed to histone deacetylase inhibitors”*. Apoptosis 9: 573–582, 2004.
- 87.**Jana L, Douglas C, Sullivan DM *“Valproic acid sensitizes human melanoma cells to karenitecin in vitro and in vivo”*.Abstract AACR, 2006.

- 88.**A.Valentini, P.Gravina, G.Federici, S.Bernardini *Valproic acid induces Apoptosis, p16^{INK4A} up-regulation and Sensitization to Chemotherapy in human melanoma cells.*
Cancer Biology and Therapy Feb;6(2):185-91, 2007
- 89.**Geran R.I. et al. III ed. Cancer Chemotherapy Rep. vol 3:1-88, 1972.
- 90.**De Ruijter JM, Van Gennip A, Caron H “*Histone deacetylases: characterization of the classical HDAC family*”.
Biochem J, 737-749, 2003.