

Dottorato di Ricerca in Oncologia e Patologia Sperimentale

Progetto 1: “Oncologia”

Coordinatore Chiar. mo Prof. Sandro Grilli

**STUDIO DEI MECCANISMI DELLA
FARMACORESISTENZA NELL'OSTEOSARCOMA
UMANO PER LA PIANIFICAZIONE DI NUOVE
STRATEGIE TERAPEUTICHE**

MED/06

Presentata da:

Dott. ssa Michela Pasello

Relatore:

Chiar. mo Prof. Mario Mercuri

Correlatore:

Dott. Massimo Serra

Anno Accademico 2005 – 2006

XIX Ciclo

Indice

Introduzione.....	1
Aspetti biologici e anatomo-patologici dell'osteosarcoma	2
Storia naturale, decorso clinico e terapia dell'osteosarcoma	5
La chemioterapia nel trattamento dell'osteosarcoma.....	5
Doxorubicina.....	8
Methotrexate.....	9
Cisplatino.....	11
Ifosfamide.....	13
La farmaco-resistenza nell'osteosarcoma.....	15
Meccanismi di resistenza alla Doxorubicina.....	16
Meccanismi di resistenza al Methotrexate.....	18
Meccanismi di resistenza al Cisplatino.....	20
Nuovi farmaci chemioterapici per il trattamento dell'osteosarcoma	23
Il PNU-159548.....	23
Il Trimetrexate.....	24
NBDHEX.....	25
Fattori prognostici nell'osteosarcoma ad alto grado di malignità.....	26
Scopo, finalità e fasi dello studio	28
Materiali e Metodi.....	29
Farmaci.....	30
Modelli Sperimentali.....	31
Analisi della citotossicità in vitro dei farmaci chemioterapici.....	32
Citotossicità in vitro del PNU-159548.....	32
Citotossicità in vitro del Trimetrexate.....	32
Citotossicità in vitro di NBDHEX.....	33
Analisi delle interazioni reciproche tra i diversi farmaci.....	34
Calcolo del coefficiente di interazione tra farmaci.....	35
Analisi del ciclo cellulare.....	36
Effetti del PNU-159548 sul ciclo cellulare.....	36
Determinazione dell'apoptosi.....	37
Incorporazione intracellulare di Doxorubicina e PNU-159548.....	38
Risultati.....	40
Citotossicità in vitro del PNU-159548.....	41
Analisi delle interazioni tra PNU-159548 e i farmaci chemioterapici convenzionali.....	42
Effetti del PNU-159548 sul ciclo cellulare e apoptosi.....	43
Incorporazione intracellulare di Doxorubicina e PNU-159548.....	44
Citotossicità in vitro del Trimetrexate.....	45
Analisi delle interazioni tra Trimetrexate e i farmaci chemioterapici convenzionali.....	46
Effetti del Trimetrexate sull'apoptosi.....	46
Citotossicità in vitro di NBDHEX.....	48
Analisi delle interazioni tra NBDHEX e i farmaci chemioterapici convenzionali.....	48
Effetti di NBDHEX sull'apoptosi.....	49
Discussione.....	50

Indice

Conclusioni.....	63
Bibliografia.....	64
Pubblicazioni inerenti questo studio.....	65
Riferimenti bibliografici nel testo.....	66
Figure.....	77
Tabelle.....	97
Ringraziamenti.....	111

Indice delle Figure

Figura 1: Osteosarcoma classico.....	78
Figura 2: Sottotipi istologici di osteosarcoma ad alto grado.....	79
Figura 3: Struttura molecolare della doxorubicina e della daunorubicina.....	80
Figura 4: Struttura molecolare dell'acido folico e degli antifolati aminopterina e methotrexate.	81
Figura 5: Reazioni enzimatiche del metabolismo dei folati.....	82
Figura 6: Struttura molecolare del cisplatino.....	83
Figura 7: Struttura molecolare dell'ifosfamide e della ciclofosfamide.....	83
Figura 8: Principale via metabolica dell'ifosfamide.....	84
Figura 9: Meccanismi di resistenza.....	85
Figura 10: Rappresentazione schematica della P-glicoproteina.....	86
Figura 11: Meccanismo di detossificazione del glutatione.....	87
Figura 12: Struttura molecolare del PNU-159548 e della antraciclina Idarubicina.....	88
Figura 13: Struttura molecolare del Trimetrexate.....	89
Figura 14: Struttura molecolare di NBDHEX.....	89
Figura 15: Effetti sulle fasi del ciclo cellulare del PNU-159548 nelle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti resistenti.....	90
Figura 16: Incorporazione di Doxorubicina e PNU-159548 in linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti resistenti.....	91
Figura 17: Modalità di incorporazione intracellulare di Doxorubicina (DX) e PNU-159548 in linee cellulari di osteosarcoma farmaco-sensibili e DX-resistenti.....	92
Figura 18: Sensibilità in vitro al Trimetrexate (TMTX) delle varianti MTX-resistenti che derivano dalle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2.....	93
Figura 19: Sensibilità in vitro al Trimetrexate (TMTX) delle varianti DX-resistenti che derivano dalle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2.....	94
Figura 20: Sensibilità in vitro al Trimetrexate (TMTX) delle varianti CDDP-resistenti che derivano dalle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2.....	94
Figura 21: Effetti del Trimetrexate (TMTX) sull'apoptosi in linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti MTX-resistenti.....	95
Figura 22: Effetti di NBDHEX sull'apoptosi in linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti CDDP-resistenti.....	96

Indice delle Tabelle

Tabella 1: Protocolli di chemioterapia neoadjuvante eseguiti agli Istituti Ortopedici Rizzoli dal 1983 al 2000.....	98
Tabella 2: Pannello di linee cellulari di osteosarcoma umano farmaco-sensibili e farmaco-resistenti.....	99
Tabella 3: Paragone tra la sensibilità al PNU-159548 e alla Doxorubicina (DX) in linee cellulari di osteosarcoma umano farmaco-sensibili.....	100
Tabella 4: Confronto tra la sensibilità al PNU-159548 e alla Doxorubicina (DX) in linee cellulari di osteosarcoma umano farmaco-sensibili.....	101
Tabella 5: Sensibilità in vitro al PNU-159548 delle varianti farmaco-resistenti che derivano dalle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2.....	102
Tabella 6: Effetti della somministrazione contemporanea di PNU-159548 e Doxorubicina (DX), Methotrexate (MTX) o Cisplatino (CDDP).....	103
Tabella 7: Effetti della somministrazione sequenziale di PNU-159548 e Doxorubicina (DX), Methotrexate (MTX) o Cisplatino (CDDP).....	104
Tabella 8: Sensibilità in vitro al Trimetrexate delle varianti MTX-resistenti che derivano dalle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2.....	105
Tabella 9: Effetti della somministrazione contemporanea di Trimetrexate (TMTX) e Doxorubicina (DX) o Cisplatino (CDDP).....	106
Tabella 10: Effetti della somministrazione sequenziale di Trimetrexate (TMTX) e Doxorubicina (DX) o Cisplatino (CDDP).....	107
Tabella 11: Sensibilità in vitro a NBDHEX di linee cellulari di osteosarcoma umano farmaco-sensibili e CDDP-resistenti.....	108
Tabella 12: Effetti della somministrazione contemporanea di NBDHEX e di Cisplatino (CDDP).....	109
Tabella 13: Effetti della somministrazione sequenziale di NBDHEX e di Cisplatino (CDDP).....	110

Introduzione

Aspetti biologici e anatomo-patologici dell'osteosarcoma

L'osteosarcoma è un tumore altamente maligno, che nasce all'interno dell'osso ed è composto da cellule mesenchimali che si differenziano in senso osteoblastico, ossia che tendono a produrre sostanza ossea (osteoidi). Generalmente la produzione di osteoidi è abbondante e questo ne permette l'identificazione sia attraverso l'esame radiografico che ad un esame macroscopico.

L'osteosarcoma è il tumore primitivo più frequente nello scheletro dopo il mieloma, tuttavia è un tumore con una scarsa incidenza. Tra tutte le neoplasie maligne dell'uomo rappresenta solamente lo 0,2%, 2 casi per milione di abitanti per anno (poco più di 100 casi l'anno in Italia) (*Campanacci M, 1999*).

Questa neoplasia predomina nel sesso maschile con un rapporto di circa 1,5-2:1 rispetto al sesso femminile (**Figura 1**) e nel 75% dei casi si manifesta in individui con una età compresa tra i 10 e i 30 anni (**Figura 1**), soprattutto in coincidenza con l'età in cui si ha il maggiore accrescimento osseo. Il tumore si sviluppa nelle zone di più vivace neoformazione e rimaneggiamento dell'osso, questo spiega, almeno in parte, l'incidenza della malattia in una fascia di età composta di adolescenti e giovani adulti. Raramente, l'osteosarcoma insorge in soggetti di età inferiore ai 5 anni e i pazienti più anziani presentano solitamente osteosarcoma secondari (osteosarcoma post-irradiazione, osteosarcoma su malattia di Paget) (*Campanacci M, 1999*).

L'osteosarcoma predilige alcune strutture ossee rispetto ad altre nelle quali si manifesta eccezionalmente. Le aree più colpite sono nell'ordine, la parte distale del femore e la parte prossimale della tibia, seguite dalla parte prossimale dell'omero. Si manifesta inoltre nelle ossa cranio-facciali, nell'estremità prossimale del femore, nella diafisi del femore e nel bacino. In alcune sedi compare molto raramente, come nel perone, nella diafisi e nell'estremità distale della tibia. In sedi come la colonna vertebrale, la scapola, la clavicola, le coste, lo sterno, l'omero distale, l'avambraccio, la mano e il piede, compare invece decisamente molto raramente (*Campanacci M, 1999*). Nelle ossa lunghe l'osteosarcoma predilige le metafisi e le metadiafisi. La cartilagine di accrescimento, finché è presente, costituisce un ostacolo che ritarda l'invasione dell'epifisi. Nell'adulto, infatti, il tumore si

estende rapidamente all'epifisi. Raramente il tumore origina in una zona diafisiaria o epifisiaria (**Figura 1**).

L'esame radiografico, accompagnato dalle più moderne tecnologie di tomografia computerizzata e dalla risonanza magnetica rappresentano l'unico mezzo per una diagnosi precoce. Il quadro radiografico dell'osteosarcoma è quello di un tumore maligno che nasce all'interno dell'osso, infiltra e distrugge rapidamente la spongiosa e la corticale, solleva e alla fine supera il periostio andando ad invadere anche i tessuti molli circostanti, producendo sostanza osteoide ed ossea in quantità variabile.

Per una diagnosi corretta, le analisi devono essere convalidate dall'esame istologico. Nell'osteosarcoma è frequente osservare cellule grandi, talora gigantesche con forte dismetria e polimorfismo, atipia, ipercromia, mitosi frequenti e atipiche, la natura sarcomatosa è generalmente molto evidente.

Nel tessuto tumorale si osserva la deposizione di osteoide e tessuto osseo in maniera irregolare. Le cellule che restano inglobate nella matrice ossea diventano più piccole, i nuclei picnotici e le mitosi spariscono, talora queste cellule diventano necrotiche. In zone di intensa vascolarizzazione e emorragia (osteosarcoma emorragico) invece è frequente osservare cellule giganti plurinucleate senza atipia nucleare identiche a osteoclasti.

Nell'osteosarcoma possono essere identificati diversi sottotipi istologici (**Figura 2**) che, in ordine di frequenza sono classificati come:

- Osteosarcoma classico intramidollare o centrale (osteoblastico, condroblastico, fibroblastico)
- Osteosarcoma emorragico (o teleangectasico)
- Osteosarcoma centrale a basso grado di malignità
- Osteosarcomi della superficie dell'osso (parostale, periosteo, di superficie ad alto grado di malignità)
- Osteosarcoma su malattia di Paget
- Osteosarcoma secondario a lesioni preesistenti
- Osteosarcoma della mandibola
- Osteosarcoma in condrosarcoma dedifferenziato
- Osteosarcoma multicentrico
- Osteosarcoma post-irradiazione

Le cause responsabili dell'insorgenza dell'osteosarcoma sono tuttora sconosciute. La correlazione con l'età adolescenziale e la comparsa del tumore nella maggior parte dei pazienti in coincidenza con il periodo di massimo accrescimento osseo, individuano nell'aumentata attività osteoblastica ed osteogenetica un fattore predisponente all'insorgenza della neoplasia.

L'unica relazione certa di causa-effetto esiste per l'esposizione a radiazioni (*Finkel MP, 1973*).

Una precedente e prolungata esposizione a radiazioni in seguito a radioterapia per la cura di altre forme tumorali è, infatti, responsabile dell'insorgenza di circa il 4% degli osteosarcomi.

Oltre alle radiazioni, l'altro fattore per il quale sia stato accertato un sicuro coinvolgimento nell'insorgenza dell'osteosarcoma sono le anomalie genetiche specifiche (mutazioni e/o delezioni) a carico di geni oncosoppressori, tra cui il gene *P53* (localizzato nella regione cromosomica 17p13) (*Hansen MF, 1991; Toguchida J, 1992*). Infatti, nei pazienti affetti da osteosarcoma, mutazioni o delezione parziale o completa del gene *P53* sono stati rilevati in circa il 30-50% dei casi, indicando come queste alterazioni genetiche giochino un ruolo di primo piano nella tumorigenesi di questa neoplasia (*Miller CW, 1990; Lonardo F, 1997*). Inoltre, mutazioni del gene *P53* sono state associate anche ad una sindrome particolare, la sindrome di Li-Fraumeni, la quale è caratterizzata da un'elevata incidenza di diversi tumori, fra cui anche l'osteosarcoma (*Li FP, 1988*).

Altro fattore genetico predisponente all'insorgenza di osteosarcoma è la delezione del gene oncosoppressore del retinoblastoma (gene *RBI*), localizzato nella regione cromosomica 13q14 (*Hansen MF, 1991; Chano T, 2002*). La perdita parziale o completa del gene *RBI* è responsabile dell'insorgenza di retinoblastoma, un raro tumore della retina che insorge in età infantile. E' stato ampiamente dimostrato che i pazienti affetti da retinoblastoma ereditario, in cui entrambi gli alleli del gene *RBI* risultano alterati, presentano un rischio di sviluppare un osteosarcoma, in età adolescenziale, di circa 500 volte maggiore di quello presente nella popolazione normale (*Draper GJ, 1986; Wadayama B, 1994*). Inoltre, delezione completa o parziale del gene *RBI* è stata ritrovata in circa il 60% degli osteosarcomi, confermando ulteriormente come questa anomalia genetica sia il fattore predisponente all'insorgenza non solo del retinoblastoma, ma anche di buona parte degli osteosarcomi (*Draper GJ, 1986; Wadayama B, 1994*).

Storia naturale, decorso clinico e terapia dell'osteosarcoma

La storia naturale dell'osteosarcoma ad alto grado di malignità è costituita da un decorso clinico molto rapido ed estremamente aggressivo, con esito spesso infausto. La crescita del tumore è generalmente veloce anche se esistono alcuni osteosarcomi con accrescimento relativamente lento.

L'osteosarcoma metastatizza per via ematica principalmente ai polmoni e, generalmente in tempi successivi, anche in altre parti dello scheletro. Quando sono presenti metastasi ossee, solitamente sono associate alla presenza di pregresse metastasi polmonari (*Campanacci M, 1999*).

La cura dell'osteosarcoma è spesso complicata dal fatto che, anche in presenza di radiografia al torace negativa al momento della diagnosi, si può andare incontro allo sviluppo di metastasi polmonari dopo la rimozione chirurgica del tumore primitivo, fatto che dimostra come la metastatizzazione del polmone da parte delle cellule neoplastiche inizia, nella maggior parte dei casi, molto precocemente. Per questo motivo il solo trattamento chirurgico non è sufficiente per la cura di questa neoplasia, di qui la necessità dell'utilizzo della terapia farmacologica nell'intento di eliminare le micrometastasi polmonari eventualmente già presenti.

La chemioterapia nel trattamento dell'osteosarcoma

Fino agli '70, l'osteosarcoma, era trattato con la sola chirurgia (soprattutto amputazione) e radioterapia. Nonostante una buona risposta locale, molti pazienti morivano in poco tempo per l'insorgenza di metastasi, soprattutto a localizzazione polmonare. Con la sola chirurgia, la sopravvivenza libera da malattia a cinque anni era del 12%, e tre pazienti su quattro morivano entro due anni dalla diagnosi. Per questo motivo, nel 1970 è stata introdotta la chemioterapia adjuvante (post-operatoria). La doxorubicina ed il methotrexate sono stati i primi farmaci ad essere impiegati con successo (*Enneking WF, 1979; Rosemburg SA, 1979; Campanacci M, 1981*). Altri farmaci sono stati considerati nei primi studi pionieristici, come la vincristina, la

bleomicina e l'actinomicina-D, ma subito abbandonati per la loro scarsa efficacia (*Avella M, 1988; Meyers PA, 1992*). Il cisplatino e l'ifosfamide sono stati aggiunti solo successivamente e insieme al trattamento con la doxorubicina e il methotrexate si è avuto un significativo aumento della sopravvivenza libera da malattia a cinque anni del 35 – 40% rispetto al 10 – 15% dei pazienti trattati con la sola chirurgia (*Kraker J, 1989; Bacci G, 2002*).

Nel 1978 è stata introdotta da Rosen la chemioterapia neoadjuvante (pre-operatoria) (*Rosen G, 1982*). Lo scopo della chemioterapia neoadjuvante, oltre all'eliminazione delle micrometastasi e il miglioramento dei pazienti con malattia localizzata, era la distruzione delle cellule del tumore primitivo in modo da ridurre le dimensioni e permetterne una migliore rimozione chirurgica con conseguente significativo aumento degli interventi conservativi (resezioni) ed una concomitante riduzione delle amputazioni.

Inoltre, un grande vantaggio degli schemi di chemioterapia neoadjuvante è rappresentato dalla possibilità di valutare l'entità della risposta al trattamento farmacologico al termine dei cicli di chemioterapia pre-operatoria, subito dopo la rimozione chirurgica del tumore, ed eventualmente modulare di conseguenza la fase post-operatoria del trattamento.

La necrosi dei tumori dell'osso dopo chemioterapia pre-operatoria, è stato dimostrato essere un fattore prognostico ed è correlato alla sopravvivenza libera da malattia e alla sopravvivenza complessiva (*Glaser DB, 1992; Bielack SS, 2002; Bacci G, 2003*). La necrosi tumorale, attualmente è valutata secondo la classificazione di Huvos (Grado I, assenza di necrosi; Grado II, necrosi compresa tra il 50% e il 90%; Grado III, necrosi compresa tra il 90% e il 100%; Grado IV, necrosi totale del 100%) (*Huvos A, 1991*), oppure secondo il modello proposto da Picci (*Picci P, 1996*), applicato agli Istituti Ortopedici Rizzoli, in base al quale, sul tumore asportato chirurgicamente è quantificata l'entità della necrosi chemioindotta attraverso l'esame anatomico-patologico dell'intera massa neoplastica asportata chirurgicamente. Una necrosi chemioindotta presente in almeno il 90% del tessuto tumorale è associata ad una buona risposta al trattamento chemioterapico pre-operatorio (Good responders), mentre una percentuale di necrosi inferiore al 90% è interpretata come una scarsa risposta (Poor responders) e indirizza verso un cambiamento del trattamento nella fase post-operatoria, al fine di tentare di migliorare l'efficacia terapeutica del trattamento farmacologico (*Picci P, 1996*).

Conoscendo il grado di necrosi tumorale in risposta alla chemioterapia, il successivo trattamento post-operatorio può essere fatto suddividendo i pazienti in diversi gruppi (Poor e

Good responders) che seguono schemi di trattamento differenziati. Nel tentativo di migliorare la risposta al trattamento per quei pazienti poco responsivi alla chemioterapia (pazienti con scarsa necrosi tumorale), gli attuali protocolli prevedono l'intensificazione della chemioterapia post-operatoria (dosi più alte, chemioterapia prolungata). In **Tabella 1** sono riportati i protocolli di chemioterapia neoadjuvante applicati dal 1983 al 2000, nel trattamento di pazienti con osteosarcoma ad alto grado agli Istituti Ortopedici Rizzoli (Bologna, Italia).

Tutti questi schemi di trattamento comportano vari effetti di tossicità collaterale. Circa la metà dei giovani adulti che sopravvivono ad un osteosarcoma, riportano almeno uno dei danni principali provocati dagli effetti tossici dovuti al trattamento chemioterapico (*Offinger KC, 2004*), tra cui tossicità cardiaca, insorgenza di una seconda neoplasia, sterilità, ridotta funzionalità renale cronica e tossicità neurologica (soprattutto ototossicità dovuta al trattamento con cisplatino).

La tossicità cardiaca che si manifesta come cardiomiopatia e insufficienza cardiaca congestizia si sviluppa solitamente entro un anno dalla fine del trattamento con le antracicline (*Steinherz LJ, 1991*) e si è riscontrata dopo trattamento dell'osteosarcoma con un'incidenza variabile tra lo 0% e il 16% (*Kremer LC, 2002*).

La cardiomiopatia indotta da antracicline, si manifesta con diminuzione delle miofibrille, dilatazione del reticolo sarcoplasmatico, vacuolizzazione del citoplasma, rigonfiamento dei mitocondri e aumento del numero dei lisosomi.

Tra i fattori di rischio dell'insorgenza della cardiomiopatia, quello dovuto alla dose complessiva è il più importante e i picchi di incidenza di cardiomiopatia si verificano alle dosi cumulative comprese tra 550 e 600 mg di doxorubicina/m² (*Lipshultz SE, 1995*).

Al momento non vi sono trattamenti per la cardiomiopatia indotta dal trattamento con le antracicline. Tra quelli provati sinora vi è il trattamento con digossina, il cui effetto, però, sull'insufficienza cardiaca è temporaneo (*Singal PK, 1998*); i β -bloccanti sono stati impiegati con successo in bambini con disfunzioni sistoliche (*Hjalmarson A, 1994*); gli angiotensinogeni sono indicati per quei pazienti con elevato sovraccarico e disfunzioni asintomatiche del ventricolo sinistro. Il trapianto cardiaco rimane l'unica alternativa per i pazienti con cardiomiopatia o insufficienza cardiaca indotta dalle antracicline (*Thomas X, 2002*).

Il rischio di sviluppare una seconda neoplasia nei sopravvissuti un osteosarcoma, è stato calcolato essere dell'8–20%, 20 anni dopo il primo tumore, in conseguenza al trattamento con

farmaci alchilanti (*Hawkins MM, 1984; Meadows AT, 1985; Aung L, 2002; Longhi A, 2006*). I tumori secondari più comuni che insorgono in pazienti che hanno avuto come primo tumore un osteosarcoma, sono: leucemie, cancro del cervello, sarcomi dei tessuti molli e carcinoma mammario. L'intervallo tra la fine della chemioterapia e il verificarsi di un secondo tumore è più breve nel caso delle leucemie (3 – 5 anni) rispetto i tumori solidi (10 – 20 anni) (*Aung L, 2002; Longhi A, 2006*).

Doxorubicina

Le antracicline sono tra i farmaci antitumorali più efficaci impiegati nella terapia di molti tumori umani (*Weiss RB, 1992*). Le prime antracicline, doxorubicina (DX) e daunorubicina (**Figura 3**), sono state isolate dal pigmento prodotto da *Streptomyces peucetius* agli inizi degli anni '60 (*Minotti G, 2004*).

La doxorubicina possiede una parte agliconica e una parte contenente uno zucchero. L'aglicone è composto da un anello tetraciclico con un gruppo chinone – idrochinone adiacente agli anelli C – B, da un sostituito metossi in C4 nell'anello D, da una corta catena in C9 che termina in un alcool e da un carbonile in C13. Lo zucchero, daunosamina, è legato mediante legame glicosidico all'anello A in C7 e consiste di una parte 3-amino-2,3,6-trideossi-L-fucosil (*Minotti G, 2004*).

Nonostante il largo impiego clinico della doxorubicina, i meccanismi d'azione nelle cellule tumorali rimangono ancora non completamente chiariti. Sono stati comunque ipotizzati i seguenti meccanismi d'azione: 1) intercalazione del DNA con conseguente inibizione della sintesi di macromolecole; 2) generazione di radicali liberi che danneggiano il DNA o che causano la perossidazione dei lipidi; 3) alchilazione del DNA; 4) inibizione della topoisomerasi II e conseguente induzione dell'apoptosi (*Gewirtz DA, 1999*).

Il meccanismo con cui le antracicline causano il danno al DNA, sembra dipendere dalla concentrazione di farmaco impiegata e dall'accumulo a livello nucleare del farmaco stesso. Tra tutti i meccanismi sopra citati, quello che comporta l'inibizione della topoisomerasi II, sembra essere il meccanismo d'azione della doxorubicina quando è impiegata a basse concentrazioni, dell'ordine di quelle usate in clinica (*Minotti G, 2004*).

Le topoisomerasi sono enzimi che modificano la topologia del DNA senza alterarne la struttura e la sequenza dei deossinucleotidi; possono causare la rottura di una singola catena del DNA (topoisomerasi I) o di entrambe le catene del DNA (topoisomerasi II) causandone il rilassamento dal suo stato di superavvolgimento di doppia elica. Le topoisomerasi hanno, quindi, la funzione di modulare il superavvolgimento della doppia elica del DNA in base alle fasi del ciclo cellulare e all'attività trascrizionale (*Binaschi M, 2001*).

Le antracicline legandosi alla topoisomerasi II, portano alla formazione di un composto ternario antraciclina-DNA-topoisomerasi II, impedendo così il rilassamento e lo svolgimento delle catene di DNA. Il danno al DNA mediato dall'attività della topoisomerasi II è seguito dall'arresto della crescita cellulare in fase G₁ e conseguente morte cellulare programmata (*Perego P, 2001; Zunino F, 2001*).

La doxorubicina è in grado di inibire anche la topoisomerasi I (*Guano F, 1999*). L'inibizione della topoisomerasi I sembrerebbe rappresentare solamente un meccanismo d'azione ausiliario dell'azione svolta dalla doxorubicina, poiché la morte cellulare, causata dalle antracicline è solo in piccola parte dipendente dal contenuto di topoisomerasi I cellulare (*Guano F, 1999*).

La doxorubicina è un farmaco essenziale nel trattamento di molti tumori, tra cui, il carcinoma mammario, i tumori solidi dell'infanzia, i sarcomi dei tessuti molli e i linfomi aggressivi.

Purtroppo, l'uso clinico della doxorubicina è limitato da una serie di problemi come l'instaurarsi della farmaco-resistenza nelle cellule tumorali o lo sviluppo di tossicità cardiaca.

Methotrexate

L'introduzione di farmaci chemioterapici antimetaboliti (l'antifolato aminopterina) è avvenuta alla fine degli anni '40 da parte di Farber e collaboratori nel trattamento delle leucemie acute pediatriche (*Farber S, 1948*). Per ragioni di tossicità, l'aminopterina è stata sostituita dal methotrexate (MTX) che possiede identico meccanismo d'azione (*McGuire JJ, 2003*). Il methotrexate, N¹⁰-metil derivato dell'aminopterina (**Figura 4**), è stato introdotto in clinica nei primi anni '50 ed è tuttora l'antifolato maggiormente impiegato nell'oncologia medica (*McGuire JJ, 2003*). Il methotrexate è usato nel trattamento delle leucemie, dell'osteosarcoma, del carcinoma mammario, dei carcinomi della testa e del collo (*Chu E,*

1996). È usato anche nella cura di altre patologie, come l'artrite reumatoide, la psoriasi e nel trattamento del rigetto da trapianto (McGuire JJ, 2003).

Il methotrexate (sinonimi: methylaminopterina, amethopterina) è un potente inibitore della diidrofolato reduttasi (DHFR) (McGuire JJ, 2003), enzima che svolge un ruolo chiave nel metabolismo del folato intracellulare e nella sintesi del DNA (**Figura 5**). Più precisamente, il methotrexate è un analogo dell'acido folico (**Figura 4**) ed interferisce con la sintesi delle purine e della timidina monofosfato inibendo di conseguenza la sintesi degli acidi nucleici, legandosi irreversibilmente alla DHFR.

Il methotrexate differisce dall'acido folico per la sostituzione di un gruppo amminico con un gruppo idrossilico in posizione 4 dell'anello di pteridina, questa piccola alterazione strutturale cambia il normale substrato della DHFR (l'acido folico) in un suo inibitore (il methotrexate) (Takimoto CH, 1996). Le forme ridotte dell'acido folico, chiamate tetraidrofolati, sono cofattori essenziali nella sintesi enzimatica della serina, della glicina, della metionina e del timidilato e dei nucleotidi purinici (McGuire JJ, 2003). L'inibizione della DHFR provoca il parziale svuotamento dei folati ridotti intracellulari, con conseguente ridotta produzione di nucleotidi, essenziali precursori della sintesi del DNA.

L'entrata del methotrexate nella cellula può avvenire con diverse modalità, che cambiano a seconda della concentrazione extracellulare del farmaco.

A basse dosi (inferiori a 10 μM , la situazione in cui si trovano normalmente le cellule tumorali *in vivo*) il methotrexate entra nella cellula per trasporto attivo attraverso l'interazione con un trasportatore specifico di membrana (reduced folate carrier RFC), mentre a dosi più elevate il farmaco entra nella cellula principalmente per trasporto passivo, senza interagire con RFC.

Una volta all'interno della cellula, il methotrexate è immediatamente coniugato a residui di acido poligluttammico dall'enzima folipoligluttammato sintetasi (FPGS) (Takimoto CH, 1996).

La reazione di poligluttammazione ha alcune importanti conseguenze biologiche (McGuire JJ, 2003); in conseguenza della poligluttammazione vengono ad aumentare le dimensioni e lo stato ionizzato della molecola di methotrexate, il cui efflusso è rallentato, inoltre, il methotrexate poligluttammato, non è più in grado di fuoriuscire dalla cellula per sola diffusione passiva, come avviene invece per il folato monogluttammato. Il methotrexate rimanendo più a lungo all'interno della cellula può spiegare maggiormente la sua azione (Takimoto CH, 1996); inoltre gli antifolati poligluttammati sono dei substrati e inibitori più

efficaci dei monoglutammati (*McGuire JJ, 2003*).

Nella sua forma poligluttammata, il methotrexate può interagire con il suo bersaglio molecolare, rappresentato dall'enzima DHFR, bloccandone l'attività enzimatica con conseguente inibizione della sintesi del DNA e, come diretta conseguenza, della proliferazione cellulare.

Il trattamento con methotrexate può indurre tossicità epatica e renale.

Cisplatino

Il cisplatino (cis-diamminedicloroplatino (II), cis-DDP o CDDP) è un composto inorganico neutro a geometria planare quadrata (**Figura 6**) che interagisce con il DNA.

Le proprietà antitumorali del cisplatino sono state descritte per la prima volta nel 1969 da Barnett Rosenberg (*Rosenberg B, 1969*) quattro anni dopo il suo lavoro pionieristico nell'intento di dimostrare l'influenza di un campo elettrico sulla crescita batterica e 125 anni dopo la sintesi del cisplatino da parte di Michele Peyrone (*Galanski M, 2005*).

Oggi, il cisplatino è uno tra i migliori farmaci antitumorali ed è attivo in molti tumori, quali il carcinoma ovarico, il cancro del polmone a piccole cellule e in quello a non-piccole cellule, il carcinoma della vescica e dell'esofago, il carcinoma a cellule squamose, il carcinoma del collo e della testa, l'osteosarcoma, ed è attivo soprattutto nel carcinoma metastatico delle cellule germinali del testicolo, che è curabile nel 90% dei casi (*Galanski M, 2005*).

Il DNA è il bersaglio principale del cisplatino (*Jamieson ER, 1999*) e gli addotti che si vengono a formare tra il platino(II) centrale della molecola di cisplatino e le basi del DNA portano all'attivazione dell'apoptosi o della necrosi, a seconda della linea cellulare tumorale e/o della dose del farmaco (*Fuertes MA, 2003*). Tuttavia solamente l'1% circa (o meno) del cisplatino somministrato per via intravenosa, interagirebbe con il DNA. La maggior parte del cisplatino reagirebbe con proteine e biomolecole a basso peso molecolare, soprattutto con quelle contenenti zolfo (*Reedijk J, 1999*).

Dopo somministrazione intravenosa, a causa della elevata concentrazione di ioni cloro nei fluidi extracellulari (100 mM circa), il cisplatino va incontro a idrolisi, con conseguente formazione di un complesso contenente cloro, acqua e gruppi idrossilici. Nel sangue un'alta

percentuale di cisplatino è legata alle proteine plasmatiche (*Galanski M, 2005*).

Il cisplatino entra nella cellula mediante diffusione passiva (*Gately DP, 1993*), solo recentemente è stato dimostrato che la proteina trasportatrice del rame CTR1 avrebbe un ruolo nell'incorporazione del cisplatino nella cellula come possibile meccanismo di trasporto attivo (*Nitiss JL, 2002; Safaei R, 2004*).

All'interno della cellula, il cisplatino, poiché è una molecola neutra, è attivato attraverso una serie di reazioni spontanee, che coinvolgono il legame di molecole di acqua al platino(II) centrale in sostituzione degli ioni cloro (*Kelland LR, 2000*). Questa reazione è facilitata dal fatto che all'interno della cellula la concentrazione degli ioni cloro è significativamente più bassa (4 mM circa) rispetto al compartimento extracellulare (*Galanski M, 2005*). Questa forma attivata interagisce con molti nucleofili endogeni come il glutatione, la metionina e le metallotioneine (*Siddik ZH, 2003*). Così quando il cisplatino entra nella cellula, è potenzialmente vulnerabile all'attacco da parte di questi componenti endogeni che ne potrebbero causare l'inattivazione. Oltre alla reazione con le biomolecole intracellulari, si vengono però a formare anche diversi tipi di addotti con le basi del DNA, che inducono distorsioni strutturali della doppia elica. Il cisplatino interagisce con il DNA per formare legami intercatena e intracatena, interagendo con le basi puriniche adenina e guanina in posizione N7 e le basi pirimidiniche citosina e uracile in posizione N3 con conseguente formazione di addotti CDDP-DNA (*Eastman A, 1987*).

Vi sono proteine specifiche (hMSH2, hMutS α (mismatch repair complex); HMG1, HMG2 (non histone chromosomal high-mobility group 1 and 2); hUBF (human RNA polymerase I transcription "upstream binding factor") e TBP (transcriptional factor "TATA binding protein") (*Donahue BA, 1990; Chaney SG, 1999*), in grado di riconoscere e di legarsi agli addotti CDDP-DNA (*Fink D, 1998*) e conseguentemente, di attivare alcune vie di trasduzione del segnale tra cui quelle che coinvolgono ATR (ATM- e Rad3-related protein; *Damia G, 2001*), p53 (*Jayaraman L, 1998*), p73 (*Gong JC, 1999*) e MAPK (mitogen-activated protein kinase; *Wang X, 2000*) che culminano nell'attivazione dell'apoptosi.

Gli effetti collaterali dovuti alla terapia con cisplatino consistono in nefrotossicità, neurotossicità, ototossicità. L'ototossicità e la nefrotossicità sono i fattori dose-limitanti della terapia con cisplatino, la nefrotossicità in alcuni casi può provocare danno renale permanente (*CvitkovicE, 1998; Galanski M, 2005*).

Ifosfamide

L'ifosfamide ([N,3-bis(2-cloroetil)tetraidro-2H-1,3,2-oxazafosforina-2-amino 2-ossido], IFO) è un agente alchilante bifunzionale usato nel trattamento di molti tumori. È un analogo dell'oxazafosforina con un atomo di fosforo asimmetrico (**Figura 7**). L'ifosfamide è stata sviluppata nei primi anni '70 (*Brock N, 1989*) nel tentativo di ottenere un farmaco antitumorale con un più ampio spettro di attività rispetto alla ciclofosfamide che era già in uso negli anni '60. L'ifosfamide è stata introdotta nell'oncologia pediatrica clinica negli anni '80 (*De Kraker J, 1983; Pinkerton CR, 1985*).

Il meccanismo d'azione delle oxazafosforine dipende dalla loro capacità (dopo attivazione extracellulare) di alchilare il DNA reagendo con la guanina in posizione N7 con entrambi i gruppi elettrofilici reattivi (intermedi dell'etileneimina). Altri siti di alchilazione, ma meno frequenti, sono l'adenina in posizione N1 e N3, la citosina in posizione N3 e la guanina in posizione N6. La capacità di formare legami intracatena e intercatena, può provocare citotossicità e morte cellulare. La mostarda ifosforamide (la forma attiva dell'ifosfamide) è un farmaco alchilante bifunzionale con un gruppo cloroetil sull'atomo di azoto esociclico della oxazafosforina e uno su quello endociclico. Questo probabilmente facilita il legame intercatena del DNA che è più difficile da riparare e promuove un più alto effetto tossico.

L'ifosfamide è un profarmaco attivato *in vivo* dal citocromo epatico P450 (*Allen IM, 1972*), in particolar modo dai sottotipi CYP3A4 e CYP2B6, che prendono parte all'idrossilazione dell'atomo di carbonio C4 dell'anello tetraidro-2H-1,3,2-oxazafosforina (*Misiura K, 2006*). La risultante 4-idrossiifosfamide (4-OH-IFO) è in equilibrio con l'aldoifosfamide, che rilascia spontaneamente la mostarda ifosforamide, il metabolita finale bi-alchilante del DNA, e il composto nefrotossico acroleina (*Hill DL, 1973*). I gruppi cloroetil della ifosfamide possono essere rimossi portando alla formazione di due derivati attivi, 2- e 3-decloroetilifosfamide, e ad un potenziale composto neurotossico, la cloroacetaldeide (*Norpoth K, 1976*) (**Figura 8**).

L'emivita e l'eliminazione dell'ifosfamide sono abbastanza variabili, dipendono dalla durata del trattamento, dall'età, dalla composizione dei tessuti (contenuto in grassi dei tessuti), trattamento con altri farmaci, funzione epatica e renale. Nei bambini il farmaco ha un'emivita più breve rispetto agli adulti probabilmente per una più elevata attività del citocromo P450

epatico (*Carli M, 2003*).

La mielosoppressione rappresenta la tossicità dose-limitante (*De Pas T, 2002*) e può essere ridotta se sono applicati schemi di trattamento frazionati (*Morgan LR, 1982*). La neurotossicità, un secondo effetto dose-limitante dell'ifosfamide, comprende sintomi psichiatrici e neurologici che possono indurre coma e morte nei casi più gravi (*Verdeguer A, 1989*). Un terzo fattore dose-limitante avverso è rappresentato dalle cisti emorragiche che possono essere prevenute mediante somministrazione di composti contenenti gruppi sulfidrilici, mesna (sodio-2-mercaptoetansulfonato), che legano sia l'acroleina sia il 4-OH-IFO. Pazienti di sesso femminile, con età superiore ai 35 anni, che sono trattate con dosi di ifosfamide superiori ai 30 g/m² possono andare incontro a sterilità (*Longhi A, 2003*).

Può manifestarsi disfunzione renale sotto forma di tubolopatia associata ad una sindrome simile a quella di Fanconi (*Arndt C, 1999*).

La farmaco-resistenza nell'osteosarcoma

Nonostante l'introduzione della chemioterapia neoadjuvante abbia permesso il progressivo raggiungimento dell'attuale soglia di sopravvivenza, pari appunto a circa il 60 – 65% dei pazienti con osteosarcoma ad alto grado, questo risultato appare non essere ulteriormente migliorabile con gli schemi di trattamento ed i farmaci attualmente disponibili. Infatti, fin dalle prime valutazioni dei risultati clinici è apparso subito evidente come il principale fattore limitante l'efficacia del trattamento chemioterapico fosse l'insorgenza della farmaco-resistenza nelle cellule tumorali in circa il 40 – 50% dei pazienti. Questa evidenza indica che la responsività alla chemioterapia è un fattore critico, che influenza drammaticamente la possibilità di guarigione dei pazienti con osteosarcoma ad alto grado.

La resistenza alla chemioterapia nei tumori può essere intrinseca o acquisita. I tumori che non rispondono all'iniziale terapia possiedono meccanismi che sono parte integrante della loro patogenesi (resistenza intrinseca). I tumori che ricorrono, dopo una risposta iniziale al trattamento farmacologico, probabilmente contengono sottopopolazioni cellulari che hanno acquisito cambiamenti genetici che conferiscono la resistenza (resistenza acquisita). Queste cellule acquisiscono un vantaggio selettivo quando le cellule sensibili alla chemioterapia sono state eliminate (*Chou AJ, 2006*).

Le cellule tumorali possono usare meccanismi diversi per divenire resistenti a uno o più farmaci chemioterapici, tra cui, disattivazione del farmaco, mutazioni del bersaglio del farmaco, diminuita incorporazione del farmaco, aumentata eliminazione del farmaco e aumentata riparazione del danno al DNA, sono tutti meccanismi che possono contribuire sia alla resistenza intrinseca sia alla resistenza acquisita ai farmaci chemioterapici. Il verificarsi dell'uno piuttosto che dell'altro dipende dal farmaco e dal tipo di linea cellulare tumorale (*Gottesman MM, 2002*).

A parte il caso di tumori che possono essere inizialmente responsivi al trattamento farmacologico e che poi diventano farmaco-resistenti in corso di trattamento, diversi studi clinici e sperimentali hanno dimostrato come spesso l'osteosarcoma ad alto grado possa essere naturalmente resistente, o quantomeno, possa presentare una ridotta sensibilità ai farmaci chemioterapici in base a caratteristiche costitutive e non acquisite in corso di chemioterapia (*Baldini N, 1995; Bramwell VH, 1997; Serra M, 2003*).

La conoscenza a quali farmaci un tumore è resistente, può non solo contribuire a migliorare la conoscenza della biologia del tumore, ma anche suggerire metodi per aggirare i meccanismi di resistenza e l'introduzione di nuove terapie in sostituzione o a supporto di quelle già in uso nella cura dell'osteosarcoma per cercare di migliorare la sopravvivenza dei pazienti che non sono responsivi ai farmaci convenzionali.

Meccanismi di resistenza alla Doxorubicina

La resistenza alla doxorubicina è stata dimostrata dipendere da vari meccanismi, tra cui, l'aumento dell'efflusso di farmaco dalla cellula, aumento dell'efficienza dei meccanismi di detossificazione, alterazioni della topoisomerasi II e aumento dei meccanismi di riparazione del danno al DNA (**Figura 9**) (*Lothstein L, 2001*).

Sebbene la resistenza alla doxorubicina sia un fenomeno multifattoriale, ossia dipende dal verificarsi di più meccanismi all'interno della stessa cellula, il meccanismo più importante che è causa della mancata o ridotta risposta al trattamento con la doxorubicina è quello che coinvolge la proteina di membrana P-glicoproteina (**Figura 10**) (*Bramwell VH, 2000*).

La P-glicoproteina è stata dimostrata essere il più importante fattore prognostico avverso per i pazienti con osteosarcoma (*Baldini N, 1995a; Chan HS, 1997; Pakos EE, 2003; Serra M, 2003*).

La P-glicoproteina è una proteina di membrana di 170 kD (*Juliano RL, 1976*) che è codificata dal gene *MDR1* (*Ueda K, 1987*). Questa proteina non è altro che una pompa organica cationica di efflusso ATP-dipendente, con 12 domini transmembrana idrofobici che contengono 2 siti catalitici per l'ATP, ed è parte di una più ampia famiglia di proteine trasportatrici chiamate ATP-binding cassette (ABC) (*Leonard GD, 2003*).

La P-glicoproteina è normalmente espressa in molti tessuti. Livelli medio/alti di espressione sono stati trovati nelle cellule della corticale del surrene, nell'epitelio dei tubuli prossimali del rene, negli epatociti biliari, nelle cellule della mucosa dell'intestino, nei dotti pancreatici, nell'endotelio della barriera emato-encefalica, nella barriera emato-testicolare, nella placenta, nell'epitelio gastrointestinale, e nelle cellule staminali CD34⁺ del midollo osseo (*Cordon-Cardo C, 1990*). È espressa anche negli stadi precoci dello sviluppo embrionale e la sua

presenza correla con i cambiamenti funzionali che si verificano durante lo sviluppo degli organi fetali (*van Kalken CK, 1992*).

È possibile che la P-glicoproteina sia coinvolta nel trasporto transepiteliale di metaboliti endogeni e composti xenobiotici. In particolare, nell'intestino, può servire come barriera per prevenire l'accumulo di prodotti tossici. La localizzazione nel cervello e nell'endotelio dei testicoli e nella placenta, indicano una possibile funzione per prevenire l'accumulo di composti tossici. Nella ghiandola surrenale e nell'utero durante la gravidanza, la P-glicoproteina potrebbe essere coinvolta nella secrezione degli ormoni steroidi

I più elevati livelli di espressione della P-glicoproteina sono stati riscontrati in tumori che derivano da tessuti che normalmente esprimono il gene *MDR1*, compresi il carcinoma epatico, del rene, del pancreas e della ghiandola surrenalica (*Goldstein LJ, 1989*). Clinicamente questi tumori sono farmaco-resistenti e rispondono poco alla chemioterapia.

Altri tumori come il carcinoma mammario e i sarcomi, che derivano da tessuti che normalmente non esprimono la P-glicoproteina, mostrano solamente bassi livelli di espressione del gene *MDR1* al momento della diagnosi in una variabile percentuale di casi. In generale, questi tumori, inizialmente rispondono alla chemioterapia, ma poi diventano resistenti al trattamento farmacologico. In questo gruppo di tumori, la farmaco-resistenza è spesso un fattore prognostico negativo (*Bradley G, 1994*).

Il ruolo della P-glicoproteina come fattore prognostico di scarsa risposta alla terapia, in certi tipi, di tumori può essere indice di alterazioni genetiche che si sviluppano durante la progressione del tumore.

Nell'osteosarcoma ad alto grado l'aumentata espressione della P-glicoproteina al momento della diagnosi, è risultata essere il marcatore prognostico negativo più importante, essendo correlata ad un elevato rischio di ricaduta, con sviluppo di metastasi polmonari, ed una prognosi particolarmente sfavorevole (*Baldini N, 1995a; Chan HS, 1997; Baldini N, 1999; Serra M, 2003; Serra M, 2006*).

Il suggerimento che la P-glicoproteina sia un marcatore di prognosi sfavorevole dovuta alla sua mediazione nella farmaco-resistenza nelle cellule tumorali, è supportato da studi che mostrano che il valore prognostico della P-glicoproteina può essere mitigato se il trattamento consiste di farmaci che non sono substrato della P-glicoproteina (*Broxterman HJ, 2000*).

Sperimentazioni preliminari con modificatori della resistenza di prima e seconda generazione, che avevano lo scopo di aggirare la farmaco-resistenza mediata dalla P-glicoproteina, hanno

avuto successo solamente in parte, rivelando l'incapacità di questi farmaci di "revertere" completamente il fenotipo della multifarmacoresistenza (MDR) a dosi non tossiche (*Bates SE, 1999*).

Una possibile alternativa ai modificatori della resistenza è rappresentata dalla sintesi di nuovi farmaci chemioterapici che abbiano la stessa efficacia antitumorale delle antracicline.

Negli ultimi vent'anni, sono stati fatti numerosi tentativi per identificare nuove antracicline che abbiano attività e tollerabilità cardiaca superiore a quella della doxorubicina. La ricerca di una "antraciclina migliore" è risultata nella produzione di circa 2000 analoghi, cosa che non è del tutto sorprendente se si considerano tutte le possibili modificazioni, sostituzioni o coniugazioni che possono essere introdotte nella struttura molecolare di un'antraciclina (*Weiss RB, 1992*).

Tra tutte le nuove molecole sintetizzate, un nuovo composto antitumorale, appartenente ad una nuova classe di alchicicline, ha mostrato di essere attivo in tumori farmaco-resistenti (*Geroni C, 2001*). Il principale composto di questa nuova classe di farmaci è il 4-dimetossi-3'-deamino-3'aziridinil-4'metilsulfonil-daunorobin (PNU-159548, ladirubicin), che ha dimostrato di essere attivo in linee cellulari tumorali che sovraesprimono P-glicoproteina o resistenti agli agenti alchilanti (compresi il cisplatino e la ciclofosfamida) o inibitori della topoisomerasi I e II (*Marchini S, 2001*).

Meccanismi di resistenza al Methotrexate

Dallo studio di vari modelli sperimentali è emerso come la resistenza al methotrexate nelle cellule tumorali possa insorgere in seguito a diversi meccanismi cellulari e biomolecolari (**Figura 9**), i quali possono essere presenti da soli o anche coesistere all'interno della stessa cellula (*Bertino JR, 1996; Banerjee D, 2002*). Questi meccanismi di resistenza al methotrexate sono, in ordine di frequenza:

- aumento dei livelli citoplasmatici dell'enzima DHFR, in seguito ad amplificazione e/o sovraespressione del gene *DHFR*, con conseguente raggiungimento di livelli intracellulari di enzima tali da non poter essere più inibiti in maniera efficiente dal methotrexate accumulatosi nel citoplasma;

- riduzione della permeabilità cellulare al methotrexate in conseguenza di una minore efficienza del sistema di trasporto transmembrana mediato dal RFC;
- diminuzione della ritenzione intracellulare del farmaco in seguito ad una ridotta attività di poligluttammazione del methotrexate ad opera dell'enzima FPGS;
- alterazioni o mutazioni del gene *DHFR* con conseguente sintesi di una molecola enzimatica con una ridotta affinità per il methotrexate;
- aumento dell'attività enzimatica dell'enzima DHFR.

Mentre i primi tre meccanismi sono stati descritti e ritrovati sia in modelli sperimentali sia in campioni clinici di tumori umani, gli ultimi due sembrano essere esclusivi dei soli modelli sperimentali, quindi con una valenza clinica estremamente ridotta, se non praticamente nulla. Per quanto riguarda più specificatamente l'osteosarcoma, i meccanismi che sembrano essere più frequentemente associati allo sviluppo di resistenza al methotrexate sono la sovraespressione e/o l'amplificazione del gene *DHFR* e la ridotta espressione del gene *RFC* (Guo W, 1999; Yang R, 2003; Hattinger CM, 2003; Serra M, 2004).

Oltre ai meccanismi di resistenza sopra citati, dati clinici e sperimentali sembrano indicare nella presenza di alterazioni del gene *RBI*, un possibile fattore in grado di interagire con il livello di espressione del gene *DHFR*, con importanti possibili conseguenze sulla sensibilità cellulare al methotrexate. Sperimentalmente è stato infatti dimostrato come linee cellulari di osteosarcoma umano nelle quali la funzionalità del gene *RBI* risulta compromessa o assente presentano livelli dell'enzima DHFR più elevati della norma e risultino naturalmente più resistenti al methotrexate (Li W, 1995; Serra M, 2004). In accordo con queste osservazioni, alcuni studi clinici sembrano indicare che i pazienti con osteosarcoma ad alto grado con delezione parziale o completa del gene *RBI*, presentano una scarsa risposta a regimi di chemioterapia prevalentemente impostati sull'uso del methotrexate ad alte dosi e, di conseguenza, una prognosi peggiore rispetto a pazienti in cui la funzionalità del gene *RBI* non è compromessa (Feugeas O, 1996).

In base alle evidenze cliniche e sperimentali finora riportate, risulta chiaro che la resistenza al methotrexate, al pari di quella verso altri farmaci chemioterapici, è un fenomeno multifattoriale, che coinvolge diversi meccanismi genetici e molecolari che variano da tumore a tumore.

Inoltre, in base ad osservazioni fatte su campioni clinici, è risultato che nell'osteosarcoma, l'amplificazione del gene *DHFR* è un fattore prognostico di diminuita risposta al trattamento

con il methotrexate (*Serra M, 2004*).

Nel tentativo di aggirare i meccanismi di resistenza al methotrexate, sono stati sintetizzati nuovi farmaci antifolato, tra cui il trimetrexate che è efficace in molti tumori resistenti al methotrexate (*Lacerda JF, 1995*).

Meccanismi di resistenza al Cisplatino

I più comuni meccanismi responsabili della resistenza al cisplatino nelle cellule tumorali comprendono il decremento dell'accumulo intracellulare o l'incremento dell'efflusso extracellulare del farmaco (*Andrews PA, 1990*), l'aumento della detossificazione cellulare mediata dal sistema della glutatione-S-transferasi (GST) (*Goto S, 1999*), l'aumento dell'efficienza dei sistemi cellulari di riparazione del DNA (*Lai GM, 1988; Kelland LR, 1992*) e alterazioni delle vie di trasduzione del segnale (*Ricci G, 2005*) (**Figura 9**). È probabile che sia la combinazione di questi meccanismi a contribuire allo sviluppo della resistenza al cisplatino nei tumori, piuttosto che il verificarsi di uno solo di essi (*Chou AJ, 2006*).

È stato ampiamente dimostrato, che la iperespressione dell'enzima GST, in particolare della isoforma π , è associata all'insorgenza di farmaco-resistenza nella maggior parte dei tumori umani (*Goto S, 1999; Goto S, 2002; Su F, 2003*).

Per quanto riguarda l'osteosarcoma, è stato riportato un aumento di attività glutatione S-transferasica in cellule di osteosarcoma canino rese resistenti al cisplatino (*Shoieb AM, 1998*).

L'esposizione a farmaci antitumorali può causare l'induzione dell'aumento dell'espressione del GST π che risulta così coinvolto nello sviluppo della resistenza nei confronti dei farmaci chemioterapici (*Tew KD, 1994*).

Il GST π sembra avere due ruoli distinti nello sviluppo della farmaco-resistenza, sia attraverso la sua azione detossificante, sia agendo come inibitore della via di trasduzione del segnale mediato dalle protein chinasi attivatrici della mitogenesi (MAPK) (*Townsend DM, 2003*).

Il glutatione (GSH) è un tiolo non-proteico ubiquitario in natura. Il GSH stesso e gli enzimi coinvolti nella sua sintesi e riassorbimento, svolgono un ruolo importante nella protezione delle cellule dagli insulti ossidativi e nella detossificazione da parte di composti endogeni e xenobiotici inclusi i composti dei metalli come il CDDP (**Figura 11**) (*Townsend DM, 2003*).

La funzione protettiva del GSH si esplica attraverso l'attività dell'enzima GST (una superfamiglia di enzimi, tra i più importanti le isoforme α , μ , e π). Questo enzima favorisce la formazione di aggregati GSH-CDDP (attraverso l'interazione di legami S-S) a livello del citoplasma, che sono poi estrusi in modo efficiente dalle cellule da specifiche pompe di esporto (Townsend DM, 2003).

Studi recenti hanno dimostrato un ruolo regolatorio per le classi π e μ del GST nella via di trasduzione del segnale della MAPK, importante proteina nella modulazione della sopravvivenza e morte cellulare (Adler V, 1999; Duvoix A, 2003). Il GST- π svolge un ruolo essenziale nella regolazione della via di trasduzione del segnale di MAPK attraverso interazioni proteina-proteina. In particolare, è un inibitore endogeno della chinasi c-jun N-terminale 1 (JNK1), una chinasi coinvolta nella risposta allo stress cellulare, nell'apoptosi e nella proliferazione cellulare (Adler V, 1999; Yin Z, 2000). In cellule non stressate, si è osservata bassa attività di JNK dovuta al fatto che la proteina è inattivata dal suo legame con il GST π (Adler V, 1999). Molti farmaci tumorali inducono l'apoptosi attraverso l'attivazione delle MAP chinasi, specificatamente attraverso l'attivazione di JNK e p38 (Davis RJ, 2000; Ono K, 2000). Il cisplatino è un esempio di farmaco dove l'attivazione di JNK è richiesta per l'espletamento del suo effetto tossico. L'inibizione della via di trasduzione del segnale di JNK porta al decremento dell'apoptosi indotta dal cisplatino, mentre la sovraespressione di c-jun aumenta la sensibilità delle cellule al cisplatino (Potapova O, 1997).

Il GST π è un bersaglio promettente poiché l'espressione è aumentata in molti tumori e alti livelli sono spesso correlati con una prognosi peggiore. Inoltre il GST π è spesso sovraespresso nei tumori farmaco-resistenti (Townsend DM, 2003).

Anche nell'osteosarcoma, studi condotti in campioni biotipici derivanti da pazienti, è stato visto che la sovraespressione del GST π è associata all'insuccesso della chemioterapia pre-operatoria (Uozaki H, 1997). Inoltre linee cellulari di osteosarcoma umano selezionate per la resistenza al cisplatino, presentano gradi crescenti di espressione del GST π in relazione al livello di resistenza del farmaco di selezione.

Sono stati compiuti numerosi tentativi nel cercare di sintetizzare degli inibitori del GST π nel tentativo di ridurre il suo ruolo protettivo *in vivo* (Tew KD, 1997).

Gli inibitori meglio caratterizzati del GST π , sono stati l'acido etacrinico e l'analogo del GSH, TER199 (Ploemen JH, 1990; Nagourney RA, 1990). Studi clinici di Fase I hanno evidenziato

che l'acido etacrinico è fortemente tossico, causando inoltre, diuresi, anormalità metaboliche e mielosoppressione (*Schultz M, 1997*), mentre TER199 è substrato delle proteine di membrana MDR1 e MRP che ne impediscono l'accumulo intracellulare (*Muller M, 1994; Zaman GJ, 1996*). Per aggirare questo problema, sono state disegnate molecole che si legano in modo efficiente al GST π , possiedono proprietà lipofile che le rendono in grado di attraversare la membrana cellulare e soprattutto non sono substrato delle proteine di membrana MDR1 e MRP coinvolte nella multifarmaco-resistenza di molti tumori (*Ricci G, 2005*).

Questi composti sono dei derivati del 4-cloro-7-nitro -2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl) ed in particolare è stato considerato per questo studio l'NBDHEX, in quanto è quello che ha dimostrato maggior efficacia (*Turella P, 2005*).

Nuovi farmaci chemioterapici per il trattamento dell'osteosarcoma

Il PNU-159548

La ricerca verso nuovi farmaci antitumorali è stata diretta allo scopo di trovare composti con nuovi meccanismi d'azione e che siano efficaci anche in tumori con fenotipo farmaco-resistente (*Geroni C, 2001*).

Una delle strategie impiegate è stata quella di sintetizzare una nuova classe di derivati delle antracicline modificandone la struttura.

È stato dimostrato che l'inserimento di una molecola alchilante nell'amminozucchero nella struttura di un'antraciclina, porta alla sintesi di una nuova classe di farmaci antitumorali (*Geroni C, 2001*).

Dei sostituenti alchilanti sono stati introdotti in posizione C3' dell'amminozucchero della idarubicina, un'antraciclina di seconda generazione usata in clinica (*Fields SM, 1991; Cersosimo RJ, 1992*), la sostituzione in C3' dello zucchero è critica per la capacità dei farmaci ad interferire con la topoisomerasi II (*Capranico G, 1990; Capranico G, 1994*) e la configurazione di C3'-NH₂ è fondamentale per la capacità del farmaco di aggirare la farmaco-resistenza (*Priebe W, 1993; Suarato A, 1999*). Un gruppo metilsulfonil è stato inoltre inserito in posizione C4' dello zucchero per aumentarne la lipofilità e ridurre la reattività chimica di queste molecole. Il nuovo composto che ne è derivato, il PNU-159548 (**Figura 12**), è in grado di alchilare la guanina in posizione N⁷ e l'adenina in posizione N³ nel solco maggiore del DNA (*Marchini S, 1995*). Inoltre, la presenza di voluminosi sostituenti in posizione C3' impedisce l'attacco del DNA da parte della topoisomerasi II impedendone l'azione (*Capranico G, 1994*), questo fa sì che il PNU-159548 sia efficace anche in linee cellulari che presentano farmaco-resistenza dipendente dall'azione della topoisomerasi II (*Geroni C, 2001*). Il PNU-159548 ha mostrato avere buona attività *in vitro* in linee cellulari tumorali umane e murine e notevole efficacia antitumorale *in vivo*, in leucemie murine rapidamente proliferanti e alcuni tumori umani xenogeni. Il PNU-159548 è in grado di attraversare la barriera

ematoencefalica e impedire la crescita di tumori impiantati intracranialmente (*Geroni C, 2001*). Per il suo particolare meccanismo d'azione, il PNU-159548 è attivo anche in cellule che sovraesprimono il gene *MDR1* e in tumori che sono resistenti agli agenti alchilanti come cisplatino, ciclofosfamide o melphalan (*Geroni C, 2001; Marchini S, 2001*).

Gli effetti tossici dovuti alla somministrazione di questo farmaco sono la mielosoppressione, trombocitopenia e tossicità intestinale (*De Jonge MJ, 2002*).

D'altra parte, studi *in vivo* hanno mostrato che il PNU-159548 ha una cardiotossicità significativamente inferiore a quella della doxorubicina, favorendolo come nuovo possibile candidato per aggirare la farmaco-resistenza e la tossicità collaterale della doxorubicina (*Geroni C, 2001; Marchini S, 2001; Della Torre P, 2001*). Sulla base di queste osservazioni pre-cliniche, il PNU-159548 è stato incluso in studi clinici di Fase I e II in vari tumori (*De Jonge MJ, 2002; Moneta D, 2003*).

Il Trimetrexate

Il trimetrexate è stato introdotto in clinica nei primi anni '70 nel tentativo di aggirare la resistenza al methotrexate (*Duch DS, 1982; Lin JT, 1987*); è un derivato del quinazoline ed è un inibitore più potente della DHFR rispetto al methotrexate (**Figura 13**) (*Marshall JL, 1994*). La trimetossi sostituzione del gruppo glutamil nel residuo dell'acido p-aminobenzoico, rende il trimetrexate lipofilo a differenza del methotrexate che invece è idrofilo; questo antifolato lipo-solubile entra rapidamente nelle cellule attraverso meccanismi di diffusione passiva (*Kamen BA, 1984*), pertanto non è substrato dei comuni trasportatori attivi dei folati come RFC.

Le linee cellulari resistenti al methotrexate per alterazione di RFC, generalmente mantengono la loro sensibilità al trimetrexate. Il trimetrexate essendo privo della catena di acido glutammico non può essere poligluttammato dall'enzima FPGS per cui, non è trattenuto all'interno della cellula, di conseguenza sono necessarie esposizioni più prolungate al trimetrexate per avere un effetto antitumorale ottimale (*Takimoto CH, 1996*).

Una volta all'interno della cellula, il trimetrexate essendo un potente inibitore dell'enzima DHFR, causa il parziale svuotamento del pool dei folati ridotti e l'accumulo dei diidrofolati

poliglutammati con conseguente inibizione della sintesi delle purine e del timidilato (*Takimoto CH, 1996*).

In studi pre-clinici, il trimetrexate è risultato attivo in un'ampia varietà di tumori, anche quelli resistenti al methotrexate per diminuzione del trasporto dei folati (*Takimoto CH, 1996*).

NBDHEX

NBDHEX fa parte di una nuova classe di molecole che derivano dal 4-cloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl) (**Figura 14**), ed è in grado di legarsi in modo molto efficiente al GST π per la sua elevata affinità nei confronti dell'enzima, per la sua lipofilità può attraversare molto facilmente le membrane cellulari e soprattutto non è substrato delle proteine di membrana coinvolte nella farmaco-resistenza, MDR1 e MRP (*Ricci G, 2005*).

Solo pochi anni fa, è stato scoperto che NBD-Cl è un inusuale co-substrato del GST π (*Caccuri AM, 1996*) e questa proprietà è stata sfruttata per sintetizzare i suoi derivati, compreso NBDHEX (*Ricci G, 2005*).

È stato dimostrato che NBDHEX è citotossico ed è in grado di indurre apoptosi in linee cellulari tumorali diverse quando è somministrato a concentrazioni micromolari e sub-micromolari (*Turella P, 2005*). Si è visto anche che le linee cellulari con minore sensibilità al farmaco sono quelle che hanno più bassa espressione del GST π (*Filomeni G, 2003*).

NBDHEX per la sua elevata lipofilità attraversa facilmente la membrana cellulare, una volta nel citoplasma si lega al GST π complessato a JNK. Il legame di NBDHEX al GST π provoca cambiamenti conformazionali nella struttura del GST π stesso che rilascia JNK, con conseguente attivazione della cascata apoptotica mediata da JNK (*Turella P, 2005*). La dissociazione del complesso JNK-GST π è una conseguenza diretta dell'interazione tra NBDHEX legata al GST π (*Turella P, 2005*).

La cellula tumorale può rappresentare il bersaglio principale di queste molecole poiché molte di queste cellule sovraesprimono GST π e questo enzima lega con alta affinità NBDHEX. La bassa tossicità osservata *in vivo*, sembra indicarlo per un possibile uso clinico nel trattamento di quei tumori non responsivi al trattamento con il cisplatino e che sovraesprimono GST π (*Turella P, 2005*).

Fattori prognostici nell'osteosarcoma ad alto grado di malignità

Diversi studi sono stati condotti per identificare marcatori di valore prognostico per l'osteosarcoma ad alto grado di malignità.

L'osteosarcoma è un tumore che colpisce adolescenti e giovani adulti con una età media che va dai 10 ai 30 anni nel 75% dei casi. E' stato visto che pazienti con una età inferiore ai 12 anni alla diagnosi, hanno una prognosi peggiore. Una prognosi sfavorevole risulta anche in pazienti con una età compresa tra i 30 e i 40 anni (*Serra M, 2003*).

Lo stadio in cui si trova il tumore è un importante fattore prognostico. La presenza di metastasi alla diagnosi è un fattore che contribuisce ad una prognosi sfavorevole. Infatti, i pazienti metastatici alla diagnosi hanno solamente il 20-30% di probabilità di sopravvivere, anche se trattati chirurgicamente in modo da rimuovere le metastasi polmonari e con una chemioterapia aggressiva (*Bacci G, 1992*).

Nell'osteosarcoma una localizzazione del tumore diversa dalle estremità, è connessa con una prognosi sfavorevole. Questo è dovuto alla difficoltà di non poter effettuare una adeguata asportazione chirurgica della massa neoplastica (*Sæter G, 1996*).

Il volume tumorale è un altro fattore prognostico. Alcuni studi (*Bieling P, 1996*), hanno trovato che pazienti con un volume tumorale inferiore ai 150 cm³, hanno una minore probabilità di sviluppare metastasi e di conseguenza hanno una prognosi migliore. Questi risultati sono confermati da altri studi, secondo i quali, pazienti con una grandezza del tumore maggiore a 9 cm hanno un rischio tre volte maggiore di vedere una progressione della malattia, rispetto a lesioni piccole che quindi hanno una prognosi migliore (*Pakos EE, 2003*).

Alcune ricerche hanno visto che la crescita tumorale, arrestata tramite la somministrazione della doxorubicina, è inversamente proporzionale alla grandezza del tumore. Questo potrebbe indicare che tumori grandi rispondono meno alla terapia farmacologica (*Davis AM, 1994*).

Tra i sottotipi istologici di osteosarcoma ad alto grado di malignità, il tumore emorragico (o teleangectasico), è risultato essere quello con una prognosi migliore rispetto alla variante osteoblastica e condroblastica (*Taylor VF, 1985; Bacci G, 1994*).

Altro fattore prognostico, preso in considerazione nell'osteosarcoma, sono i livelli elevati di fosfatasi alcaline, che sono associate ad una prognosi sfavorevole (*Bacci G, 1993*).

La risposta istologica della lesione primaria alla chemioterapia pre-operatoria è un fattore prognostico molto importante (*Davis AM, 1994; Bieling P, 1996, Picci P, 1996*).

E' infatti stato osservato che se la risposta istologica della chemioterapia pre-operatoria, sulla lesione primaria, è favorevole, questo fatto si rispecchia positivamente anche in una diminuita o assente formazione di micrometastasi polmonari (*Bacci G, 1996*).

Fra i vari fattori biologici analizzati nell'osteosarcoma ad alto grado, nessuno è in grado di fornire delle indicazioni certe circa la prognosi. Quelli che sono risultati essere dotati di valore prognostico nell'osteosarcoma, sono la presenza di alti livelli di P-glicoproteina, elevata espressione del gene DHFR, diminuita espressione del gene RFC.

Scopo, finalità e fasi dello studio

Poiché non sono stati riportati finora studi circa l'efficacia del PNU-159548, del Trimetrexate e di NBDHEX in linee cellulari di osteosarcoma umano, si è voluta valutare l'efficacia pre-clinica *in vitro* di questi tre nuovi farmaci antitumorali in linee cellulari di osteosarcoma umano farmaco-sensibili e farmaco-resistenti.

In particolare, le linee selezionate per la resistenza alla doxorubicina presentano gradi crescenti di espressione del gene *MDR1* in relazione al livello di resistenza del farmaco di selezione; le linee selezionate per la resistenza al methotrexate presentano gradi crescenti di espressione del gene *DHFR* e/o gradi decrescenti di espressione del gene *RFC* in relazione del livello di resistenza; parte delle linee selezionate per la resistenza al cisplatino presentano gradi crescenti di espressione della proteina *GST π* in relazione al livello di resistenza.

In una prima serie di esperimenti è stata provata la sensibilità, ai singoli farmaci, sia delle linee farmaco-sensibili sia di quelle farmaco-resistenti per verificarne l'efficacia in questo particolare modello sperimentale.

In una seconda serie di esperimenti, l'efficacia dei tre nuovi composti è stata verificata impiegando schemi di trattamento di combinazione con i farmaci impiegati nella terapia convenzionale dell'osteosarcoma.

Lo scopo dello studio è stato quello di ottenere informazioni riguardanti la possibile utilizzazione clinica del PNU-159548, del Trimetrexate e di NBDHEX, a supporto ai farmaci convenzionali, per la pianificazione di nuovi schemi di trattamento di pazienti con osteosarcoma ad alto grado che sono scarsamente responsivi alla chemioterapia classica.

Materiali e Metodi

Farmaci

Doxorubicina (DX), Methotrexate (MTX) e Cisplatino (CDDP) sono stati forniti da Sigma-Aldrich (Milano, Italia). Il PNU-15948 è stato sintetizzato da Pharmacia Corporation (Milano, Italia); il Trimetrexate (TMTX) (prodotto da USB Pharma BV, Nijmegen, Olanda) è stato donato da IPSEN S.p.A. (Milano, Italia); NBDHEX è stato sintetizzato come riportato da Ricci et al (*Ricci G, 2005*). Le soluzioni madri di DX (2 mg/ml), MTX (25 mg/ml) e CDDP (500 µg/ml) sono state mantenute a 4°C; il PNU-159548 è stato ricostituito in etanolo assoluto e le aliquote (1 mg/ml) sono state conservate a -80°C; il TMTX è stato ricostituito in acqua distillata e le aliquote (12.5 mg/ml) conservate a -20°C; NBDHEX è stato ricostituito in DMSO e le aliquote (50 mM) sono state conservate a temperatura ambiente al riparo dalla luce. Per tutti i farmaci, le concentrazioni d'uso sono state preparate diluendo le soluzioni madri nel mezzo di coltura immediatamente prima dell'uso.

Modelli Sperimentali

Le linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS, Saos-2, MG-63 e HOS sono state ottenute da ATCC (Rockville, MD), mentre le altre linee di osteosarcoma umano: IOR/OS9, IOR/OS10, IOR/OS14, IOR/OS15, IOR/OS18, IOR/MOS, SARG sono state stabilizzate da campioni biotici derivanti da pazienti con osteosarcoma non trattati, nel Laboratorio di Ricerca Oncologica degli Istituti Ortopedici Rizzoli (Bologna, Italia) (*Benini S, 1999*) (**Tabella 2**).

Le varianti farmaco-resistenti sono state ottenute esponendo le linee cellulari farmaco-sensibili U-2OS e Saos-2 a concentrazioni crescenti di DX (*Serra M, 1993; Scotlandi K, 1994*), MTX (*Hattinger CM, 2003; Serra M, 2004*) o CDDP.

L'esposizione continua a ciascun farmaco ha prodotto una serie di varianti farmaco-resistenti che sono state identificate con il nome della linea cellulare parentale, seguito dal nome e dalla concentrazione del farmaco impiegato per la selezione. La concentrazione del farmaco si intende in ng/ml o quando chiaramente specificato in µg/ml (**Tabella 2**).

Tutte le linee cellulari sono state coltivate in Iscove's modified Dulbecco's medium (IMDM, Gibco Life Technologies, Invitrogen Milano, Italia), in cui sono state aggiunte penicillina (100 U/ml)/streptomicina (100 µg/ml) (Invitrogen Milano, Italia) e il 10% di siero fetale bovino inattivato (FBS; Biowhittaker Europe, Cambrex-Verviers, Belgio).

Ciascuna variante farmaco-resistente è stata sempre coltivata in terreno di coltura addizionato del farmaco alla concentrazione usata per la selezione. Tutte le linee cellulari sono state coltivate a 37° in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

Analisi della citotossicità *in vitro* dei farmaci chemioterapici

Per ogni linea cellulare la sensibilità ai farmaci chemioterapici è stata calcolata in base alla curva dose-risposta ed espressa come IC50 (concentrazione del farmaco che inibisce del 50% la crescita cellulare delle cellule trattate rispetto ai corrispondenti controlli).

Per determinare i valori di IC50, 20.000 cellule/cm² sono state seminate in IMDM al 10% di FBS e dopo 24 ore, il terreno di coltura è stato cambiato con IMDM al 10% di FBS senza (controllo) o con diverse concentrazioni del farmaco. Dopo 96 ore, le cellule sono state raccolte e contate con il metodo di colorazione vitale con Tripan blue per stimare la percentuale di inibizione della crescita paragonata al relativo controllo. I valori di IC50 sono stati calcolati da almeno tre esperimenti indipendenti.

Citotossicità *in vitro* del PNU-159548

In una prima serie di esperimenti, l'efficacia *in vitro* del PNU-159548 è stata determinata in 10 linee cellulari farmaco-sensibili determinando l'inibizione della crescita dopo 96 ore di trattamento con il farmaco a dosi comprese tra 0.01 e 0.03 μ M, che sono significativamente più basse dei livelli plasmatici raggiunti dal PNU-159548 in studi clinici di Fase I (*De Jonge MJ, 2002; Moneta D, 2003*), e paragonate all'effetto di concentrazioni equimolari di DX.

Inoltre, per ogni linea cellulare, la sensibilità al PNU-159548 è stata calcolata in base alla curva dose-risposta ed espressa come IC50.

Citotossicità *in vitro* del Trimetrexate

In una prima serie di esperimenti, l'efficacia *in vitro* del TMTX è stata determinata nelle linee cellulari di osteosarcoma umano farmaco-sensibili U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti MTX-resistenti e nelle varianti DX-resistenti e CDDP-resistenti con elevati livelli di

resistenza determinando l'inibizione della crescita dopo 96 ore di esposizione al farmaco alle dosi di 3ng/ml (0.01 μ M) e 10ng/ml (0.02 μ M).

Inoltre, nelle linee cellulari U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti MTX-resistenti la sensibilità al TMTX è stata calcolata in base alla curva dose-risposta ed espressa come IC50.

Citotossicità *in vitro* di NBDHEX

La sensibilità *in vitro* a NBDHEX è stata calcolata in base alla curva dose-risposta ed espressa come IC50 in linee di osteosarcoma umano farmaco-sensibili e in linee cellulari selezionate per la resistenza al CDDP.

Analisi delle interazioni reciproche tra i diversi farmaci

Per studiare *in vitro* le interazioni tra il PNU-159548, il TMTX e NBDHEX e i farmaci impiegati nella chemioterapia convenzionale dell'osteosarcoma, le linee cellulari di osteosarcoma umano sono state trattate con diversi schemi di combinazione tra farmaci.

In esperimenti di somministrazione simultanea di farmaci, le linee cellulari sono state trattate contemporaneamente con PNU-159548, TMTX o NBDHEX assieme a DX, MTX o CDDP. In questi esperimenti tutti i farmaci sono stati usati a dosi equitossiche, corrispondenti alle dosi risultanti nell'inibizione della crescita del 30% (IC30) dopo 96 ore di trattamento con il singolo farmaco.

In esperimenti di valutazione sequenziale di farmaci, le linee cellulari di osteosarcoma umano sono state esposte in modo sequenziale per un totale di 96 ore a concentrazioni equitossiche di PNU-159548, TMTX o NBDHEX e quindi, dopo la loro rimozione, a DX, MTX o CDDP.

Lo stesso schema di trattamento è stato ripetuto trattando le cellule con uno dei farmaci convenzionali seguito dal PNU-159548, TMTX o NBDHEX. In questi esperimenti tutti i farmaci sono stati usati a concentrazioni equitossiche, corrispondenti alle dosi risultanti nel 30% dell'inibizione della crescita (IC30) dopo 48 ore di trattamento con il singolo farmaco.

Calcolo del coefficiente di interazione tra farmaci

L'effetto delle associazioni tra farmaci è stato valutato in termini di additività, antagonismo o sinergismo confrontando i dati ottenuti dagli esperimenti di trattamento con farmaco singolo e quelli derivanti dall'uso combinato di due farmaci. Per definire il tipo di interazione, per ogni specifica associazione è stato calcolato un coefficiente di interazione (CI) utilizzando la formula seguente (*Kano Y, 1988*):

$$CI = [(D)_1/(Dx)_1] + [(D)_2/(Dx)_2]$$

dove $(Dx)_1$ e $(Dx)_2$ sono, rispettivamente, le dosi del farmaco 1 e del farmaco 2 necessarie per produrre una determinata percentuale di inibizione della crescita quando usati singolarmente; $(D)_1$ e $(D)_2$ sono, rispettivamente, le dosi del farmaco 1 e del farmaco 2 necessarie per produrre il medesimo effetto di inibizione della crescita quando usati in associazione. Quando $CI=1$ l'interazione è considerata additiva; quando $CI<1$ l'interazione è considerata sinergica; quando $CI>1$ l'interazione è considerata antagonista.

I dati sono stati ulteriormente analizzati mediante l'uso di un software (CalcuSyn, software for dose effect analysis, Biosoft, Cambridge UK), e la valutazione degli isobogrammi relativi ad ogni schema di trattamento combinato.

Analisi del ciclo cellulare

Effetti del PNU-159548 sul ciclo cellulare

La determinazione degli effetti del PNU-159548 sul ciclo cellulare è stata condotta seminando 20.000 cellule/cm² in IMDM al 10% FBS. Dopo 24 ore dalla semina, il terreno di coltura è stato cambiato con IMDM al 10% di FBS senza (controllo) o con PNU-159548 alle concentrazioni di IC₅₀ caratteristiche di ciascuna linea cellulare. Dopo 24, 48, 72 ore di trattamento con il farmaco, le cellule sono state incubate con 10µM di bromodeossiuridina (Sigma-Aldrich) per 1 ora a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂, raccolte e infine fissate in etanolo al 70% per 30 minuti.

Dopo la denaturazione del DNA con HCl 2N, le cellule sono state incubate con l'anticorpo monoclonale anti-bromodeossiuridina B44 (Becton Dickinson, San Jose, CA) diluito 1:4, seguito da un anticorpo anti-mouse FITC (Sigma-Aldrich) diluito 1:20 in soluzione salina di fosfato tamponata (PBS). Per la contemporanea determinazione del contenuto in DNA, la sospensione cellulare è stata risospesa in una soluzione di ioduro di propidio 20 µg/ml (Sigma-Aldrich). Tutti i campioni sono stati analizzati tramite citometro a flusso (FACSCalibur; Becton Dickinson) per determinare la distribuzione delle singole popolazioni nelle varie fasi del ciclo cellulare.

Determinazione dell'apoptosi

Per la determinazione e la quantificazione dell'apoptosi, 10.000 cellule/cm² sono state seminate in IMDM al 10% FBS in petri da 60 mm di diametro. Dopo 24 ore, il terreno di coltura è stato cambiato con IMDM al 10% di FBS senza (controllo) o con la concentrazione dell'IC50 caratteristica di ciascuna linea cellulare di PNU-159548, di TMTX o di NBDHEX. Per la rilevazione morfologica dei nuclei cellulari dopo 24, 48 e 72 ore di trattamento farmacologico per il PNU-159548 e 96 ore per TMTX e NBDHEX, le cellule sono state fissate in metanolo: acido acetico (3:1 vol:vol) per 15 minuti e quindi colorate con Hoechst 33258 50 ng/ml (Sigma-Aldrich).

I nuclei cellulari che mostravano tre o più corpi di cromatina addensata sono stati considerati apoptotici. Per ciascun campione, la percentuale di nuclei apoptotici è stata determinata contando 1.000 cellule.

Oltre all'aspetto morfologico dei nuclei cellulari, la determinazione e la quantificazione delle cellule apoptotiche dopo trattamento con PNU-159548 è stata determinata anche tramite il test annessina-V. Questo test, che si basa sull'analisi citometrica a flusso della marcatura annessina-V-FITC in cellule in sospensione, è stata condotta usando MBL MEBCYTO Apoptosis kit (Medical & Biological Laboratories, Naka-ku Nagoya, Japan) seguendo il protocollo fornito dal produttore.

La marcatura con 20 µg/ml di ioduro di propidio (PI) è stata usata per discriminare le cellule necrotiche (che presentano simultanea incorporazione sia di annessina sia di PI) dalle cellule apoptotiche (che incorporano solo l'annessina).

Incorporazione intracellulare di Doxorubicina e PNU-159548

Utilizzando la naturale fluorescenza rossa della DX e del PNU-159548, l'incorporazione intracellulare dei due farmaci è stata valutata e quantificata in tutte le linee cellulari farmacosensibili, e nelle varianti U-2OS e Saos-2 con elevati livelli di resistenza alla DX, MTX o CDDP.

Per definire le condizioni ottimali per l'incorporazione del PNU-159548, una sospensione di 200.000 cellule/ml in IMDM al 10% FBS delle linee cellulari U-2OS e Saos-2 è stata incubata con concentrazioni di PNU-159548 comprese tra 0.01 e 0.20 μM a 37°C per diversi tempi (variabili dai 15 minuti fino alle 4 ore). Dopo l'incorporazione del farmaco, la sospensione cellulare è stata incubata con fluoresceina diacetato 1 mg/ml (Sigma-Aldrich) per 10 minuti a 4°C, lavata con PBS e immediatamente analizzate con un microscopio a fluorescenza.

L'incorporazione del farmaco è stata valutata solo nelle cellule vitali, rilevabili dalla fluorescenza verde della fluoresceina diacetato (*Baldini N, 1992; Baldini N, 1995*).

Le condizioni ottimali per determinare l'incorporazione del PNU-159548 sono state fissate in 0.08 μM di PNU-159548 per 30 minuti a 37°C, in cui si ha invariabilmente una morte cellulare inferiore al 3%. Quindi, per ogni linea cellulare, la quantità di farmaco intracellulare incorporata è stata determinata e quantificata mediante citometro a flusso (FACSCalibur; Becton Dickinson) dopo incubazione della sospensione cellulare con 0.08 μM di PNU-159548 o DX a 37°C per 30 minuti.

Per analizzare la modalità di distribuzione intracellulare di DX e PNU-159548, l'incorporazione di farmaco è stata eseguita anche in cellule aderenti.

Nel secondo caso, 10.000 cellule/cm² sono state seminate in petri da 60 mm di diametro in IMDM 10% FBS. Dopo 24 ore dalla semina, il terreno di coltura è stato cambiato con terreno contenente 0.08 μM di PNU-159548 o di DX e le cellule sono state incubate per 30 minuti a 37°C. Dopo la rimozione del farmaco, il monostrato cellulare è stato lavato brevemente con PBS e quindi immediatamente analizzato con un microscopio a fluorescenza collegato ad un sistema di citofluorimetria statica (Photometrics Sensys charge-coupled device camera; QUIPS XL Genetic Workstations; Abbott-Vysis Inc., Downers Grove, IL). La stessa metodica

è stata impiegata per analizzare la modalità di distribuzione intracellulare di farmaco nelle cellule in sospensione.

Risultati

Citotossicità *in vitro* del PNU-159548

Un primo paragone tra l'efficacia *in vitro* del PNU-159548 e la DX è stato effettuato usando concentrazioni di farmaco comprese tra 0,01 e 0,03 μM , che sono almeno 10 volte più basse dei livelli plasmatici che il PNU-159548 ha raggiunto in studi clinici di Fase I e Fase II (De Jonge MJ, 2002; Moneta D, 2003).

Tutte le linee cellulari sono risultate essere molto sensibili sia al PNU-159548 sia alla DX, senza nessuna differenza statisticamente significativa tra questi due farmaci, nonostante la bassa concentrazione di farmaco usata in questi esperimenti (**Tabella 3**).

Per meglio paragonare l'efficacia di questi due farmaci, sono state determinate le IC50 sia del PNU-159548 sia della DX per ciascuna linea cellulare (**Tabella 4**). Il paragone tra i valori delle IC50 del PNU-159548 e della DX hanno confermato che, nelle linee cellulari di osteosarcoma farmaco-sensibili, i due farmaci presentano attività *in vitro* molto simile.

Infatti, non vi sono state differenze statisticamente diverse tra i valori di IC50 del PNU-159548 (valori compresi tra 0,002 – 0,050 μM , con un valore medio di 0,022 μM) e quelle della DX (valori compresi tra 0,003 – 0,033 μM , con un valore medio di 0,017 μM) (**Tabella 4**).

La determinazione dei valori di IC50 del PNU-159548 nelle linee cellulari di osteosarcoma farmaco-resistenti, ha rilevato una notevole sensibilità al PNU-159548 in tutte le linee cellulari, con valori di IC50 compresi tra 0,002 – 0,044 μM (valore medio di 0,015 μM) (**Tabella 5**).

In particolare, il PNU-159548 ha mostrato efficacia simile nelle linee cellulari parentali U-2OS o Saos-2 e nelle loro varianti DX- e MTX- resistenti, senza sostanziali differenze significative tra i valori delle rispettive IC50 (**Tabella 5**).

Le varianti CDDP-resistenti sono risultate essere leggermente meno sensibili al PNU-159548 rispetto alle linee cellulari parentali e a tutte le altre varianti farmaco-resistenti. Le differenze tra i valori di IC50 al PNU-159548 nelle linee cellulari CDDP-resistenti non sono risultate statisticamente diverse da quelle delle altre linee cellulari e rientrano nell'intervallo di quello delle altre linee considerate in questi studio (**Table 4 e 5**).

Considerando insieme tutti questi risultati, appare che la media dei valori di IC50 del PNU-159548 di tutte le linee cellulari considerate per questo studio sia piuttosto bassa (0,016 μM) e

che non vi siano differenze tra le medie dei valori di IC50 del PNU-159548 delle linee cellulari farmaco-sensibili (0,017 μ M) e delle linee cellulari farmaco-resistenti (0,015 μ M). Queste osservazioni hanno indicato una generale alta efficacia del PNU-159548 nelle linee cellulari di osteosarcoma e la mancanza di resistenza crociata con i farmaci convenzionali.

Analisi delle interazioni tra PNU-159548 e i farmaci chemioterapici convenzionali

L'efficacia *in vitro* del PNU-159548 in associazione con DX, MTX o CDDP è stata valutata dopo esposizione sia simultanea sia sequenziale.

Come mostrato in **Tabella 6**, la contemporanea somministrazione nelle linee cellulari farmaco-sensibili di PNU-159548 e uno dei farmaci convenzionali, ha prodotto principalmente effetti additivi o sinergici. Solo poche interazioni antagoniste sono state osservate tra il PNU-159548 e la DX (nella linea cellulare IOR/OS14), tra il PNU-159548 e il MTX (nelle linee cellulari U-2OS, Saos-2 e SARG), o tra il PNU-159548 e il CDDP (nella linea cellulare IOR/OS18).

Nel gruppo delle varianti farmaco-resistenti, la contemporanea somministrazione di due farmaci è stata effettuata somministrando il PNU-159548 insieme al farmaco di selezione.

Nelle varianti DX-resistenti, la contemporanea somministrazione del PNU-159548 e della DX è risultata in un effetto sinergico (varianti U-2OS) o additivo (varianti Saos-2) (**Tabella 6**).

Un effetto additivo è stato trovato anche quando il PNU-159548 è stato somministrato in associazione con il CDDP nelle varianti CDDP-resistenti, mentre nelle varianti MTX-resistenti sono stati osservati solamente effetti antagonisti dopo contemporanea somministrazione di PNU-159548 e MTX (**Tabella 6**).

Esperimenti di esposizione sequenziale di due farmaci sono stati eseguiti somministrando come primo farmaco il PNU-159548 seguito immediatamente da DX, MTX o CDDP, come pure è stata effettuato anche lo schema di somministrazione inverso di esposizione dei farmaci (DX, MTX o CDDP come primo farmaco, seguito da PNU-159548).

Esperimenti di esposizione sequenziale sono stati condotti nelle linee cellulari parentali (U-2OS e Saos-2) e nelle loro varianti farmaco-resistenti con elevati livelli di resistenza a DX,

MTX o CDDP, le quali sono state trattate con il PNU-159548 e il farmaco di selezione.

Come mostrato in **Tabella 7**, sia nelle linee cellulari farmaco-sensibili sia nelle linee cellulari farmaco-resistenti, gli effetti osservati sono stati additivi o sinergici quando le cellule erano trattate con il PNU-159548 come primo farmaco seguito immediatamente da DX, MTX o CDDP.

L'ordine inverso di somministrazione dei farmaci ha prodotto effetti completamente diversi, risultando sempre in interazioni antagoniste, con la sola eccezione di un effetto additivo con la DX nelle linee cellulari farmaco-sensibili (**Tabella 7**).

Effetti del PNU-159548 sul ciclo cellulare e apoptosi

L'analisi delle alterazioni delle fasi del ciclo cellulare indotte dal PNU-159548 sono state esaminate in tutte le linee cellulari di osteosarcoma farmaco-sensibili, così come nelle varianti U-2OS e Saos-2 che presentano elevati livelli di resistenza alla DX, MTX o CDDP.

Il trattamento delle linee cellulari con le loro corrispondenti dosi di IC50 del PNU-159548 ha indotto un accumulo in fase G2/M, con un parallelo decremento nella percentuale delle cellule in fase G0/G1 (**Figura 15**).

Il picco dell'accumulo in fase G2/M è stato raggiunto dopo 48-72 ore di trattamento con il farmaco, mentre tempi di incubazione più brevi non hanno prodotto nessun effetto evidente sulla distribuzione delle fasi del ciclo cellulare.

Questi dati indicano che, nelle linee cellulari di osteosarcoma umano, il PNU-159548 ha indotto un blocco parziale delle cellule in fase G2/M e un rallentamento nella progressione cellulare dalla fase G1 alla fase G2/M.

Sulle stesse linee cellulari in cui è stata effettuata l'analisi del ciclo cellulare è stato, inoltre, valutato anche l'effetto del PNU-159548 sull'apoptosi dopo trattamento con dosi di farmaco corrispondenti alle IC50 di ciascuna linea cellulare. La valutazione morfologica dell'apoptosi dopo colorazione nucleare con Hoechst 33258, non ha evidenziato aumenti statisticamente significativi nella percentuale di cellule apoptotiche se paragonata all'appropriato controllo, né in linee cellulari farmaco-sensibili né in linee cellulari farmaco-resistenti. In accordo con questi dati, anche il test con annessina-V non ha rilevato induzione di apoptosi cellulare o

necrosi.

Nel loro insieme, i dati sul ciclo cellulare e l'apoptosi, indicano che in queste condizioni sperimentali, il PNU-159548 ha un effetto citostatico piuttosto che citotossico sia nelle linee cellulari di osteosarcoma farmaco-sensibili che farmaco-resistenti.

Incorporazione intracellulare di Doxorubicina e PNU-159548

L'analisi dell'incorporazione intracellulare di farmaco mediante citometria a flusso ha mostrato che vi è stata incorporazione di PNU-159548 nella maggior parte delle cellule in tutte le linee cellulari (**Figura 16 A**).

La valutazione dell'incorporazione della DX ha riportato risultati simili, con la sola eccezione delle varianti DX-resistenti, in cui la percentuale di cellule incorporanti la DX è stata significativamente più bassa rispetto a quella di tutte le altre linee cellulari ($P < 0.05$; **Figura 16 A**).

Misurazioni effettuate mediante citofluorimetria a flusso di incorporazione del farmaco hanno evidenziato che tutte le linee cellulari incorporano quantità simili di PNU-159548 (**Figura 16 B**).

La quantificazione dell'incorporazione della DX ha mostrato risultati simili, con un lieve, statisticamente non significativo decremento di accumulo di farmaco nelle linee cellulari DX-resistenti.

L'analisi della distribuzione intracellulare dei farmaci mediante l'impiego della microscopia a fluorescenza ha messo in evidenza che tutte le linee cellulari hanno incorporato il PNU-159548 sia nel citoplasma sia nel nucleo, mentre la DX è incorporata prevalentemente nel nucleo in tutte le linee cellulari farmaco-sensibili e farmaco-resistenti con la sola eccezione delle varianti DX-resistenti in cui si ha accumulo del farmaco nel citoplasma ma non nel nucleo (**Figura 17**).

Citotossicità *in vitro* del Trimetrexate

L'efficacia *in vitro* del TMTX è risultata invariabilmente maggiore rispetto a quella del MTX sia nelle linee cellulari di osteosarcoma farmaco-sensibili U-2OS e Saos-2 che in tutte le loro varianti MTX-resistenti. Infatti, i valori di IC50 per il TMTX sono sempre più bassi rispetto a quelli del MTX in tutte le linee cellulari, a prova di una generale maggiore sensibilità a questo farmaco (**Tabella 8**).

L'analisi della sensibilità *in vitro* al TMTX ha evidenziato l'esistenza di una resistenza crociata a questo farmaco nelle varianti MTX-resistenti della linea U-2OS (con la sola eccezione della linea U2OS/MTX3) ma non in quelle della linea Saos-2 (**Tabella 8**). Questo dato indica che le varianti MTX-resistenti derivate dalla linea U-2OS possono avere sviluppato resistenza al MTX attraverso meccanismi cellulari e biomolecolari in grado di interagire anche con la sensibilità cellulare al TMTX.

La sensibilità *in vitro* al TMTX è stata analizzata nelle linee cellulari di osteosarcoma farmaco-sensibili U-2OS e Saos-2 e nelle varianti MTX-resistenti trattandole con TMTX alle concentrazioni di 3 ng/ml e 10 ng/ml per 96 ore, in cui è stato osservato che le varianti MTX-resistenti derivanti dalle U-2OS sono meno sensibili al TMTX rispetto alle varianti MTX-resistenti derivanti dalle Saos-2 (**Figura 18**) a conferma del dato ottenuto dal confronto delle IC50.

Lo stesso schema sperimentale è stato eseguito anche nelle varianti U-2OS e Saos-2 che presentano elevati livelli di resistenza alla DX o al CDDP, da cui è risultato che entrambe le varianti DX-resistenti sono risultate essere poco sensibili al TMTX (**Figura 19**) per la possibile presenza di resistenza crociata tra i due farmaci. Entrambe le varianti CDDP-resistenti, invece, sono abbastanza sensibili al TMTX indicando l'assenza di resistenza crociata tra il CDDP e il TMTX (**Figura 20**).

Analisi delle interazioni tra Trimetrexate e i farmaci chemioterapici convenzionali

L'efficacia *in vitro* del TMTX in associazione con DX o CDDP è stata valutata dopo somministrazione simultanea di due farmaci.

Come mostrato in **Tabella 9**, la contemporanea somministrazione nelle linee cellulari farmaco-sensibili e DX-resistenti di TMTX e DX, ha prodotto principalmente effetti antagonisti, con la sola eccezione della linea cellulare U-2OS in cui è stato riscontrato un effetto additivo.

Nelle linee cellulari farmaco-sensibili U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti CDDP-resistenti, la contemporanea somministrazione di TMTX e CDDP ha prodotto principalmente effetti additivi (**Tabella 9**).

Esperimenti di esposizione sequenziale sono stati eseguiti somministrando come primo farmaco il TMTX seguito da DX o CDDP, come pure è stato effettuato lo schema di trattamento inverso di somministrazione di farmaci (DX o CDDP come primo farmaco seguito da TMTX).

Gli esperimenti di esposizione sequenziale sono stati condotti nelle linee cellulari parentali U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti farmaco-resistenti con elevati livelli di resistenza alla DX e al CDDP. Come mostrato in **Tabella 10**, sia nelle linee cellulari farmaco-sensibili sia nelle linee cellulari farmaco-resistenti, gli effetti osservati sono stati additivi o sinergici quando le cellule sono state trattate con il TMTX come primo farmaco seguito immediatamente da DX o CDDP. La sequenza opposta ha invece prodotto effetti additivi nelle linee farmaco-sensibili ed effetti antagonisti nelle linee resistenti ad entrambi i farmaci (**Tabella 10**).

Effetti del Trimetrexate sull'apoptosi

È stato valutato l'effetto del TMTX sull'apoptosi in linee cellulari farmaco-sensibili U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti MTX-resistenti dopo trattamento con 30 ng/ml di farmaco per 96 ore.

La valutazione morfologica dell'apoptosi dopo colorazione nucleare con Hoechst 33258, non ha evidenziato aumenti statisticamente significativi nella percentuale di cellule apoptotiche se paragonata all'appropriato controllo nella linea cellulare U-2OS e nelle sue varianti MTX-resistenti (**Figura 21 A**), mentre nella linea cellulare Saos-2 e nelle sue varianti MTX-resistenti si evidenzia una induzione dell'apoptosi, statisticamente significativa ($p < 0,05$) rispetto all'appropriato controllo (**Figura 21 B**).

Citotossicità *in vitro* di NBDHEX

L'attività *in vitro* di NBDHEX è stata valutata su un pannello di linee cellulari di osteosarcoma umano sia farmaco-sensibili sia CDDP-resistenti derivanti dalle linee cellulari U-2OS e Saos-2. Come mostrato in **Tabella 11**, tutte le linee cellulari sono risultate essere molto sensibili al farmaco, mostrando elevati livelli di inibizione della crescita cellulare (in termini di IC50) rispetto alle basse concentrazioni di farmaco usate negli esperimenti.

Nelle linee resistenti al CDDP, NBDHEX è risultato essere più efficace nelle linee con i più elevati livelli di resistenza al CDDP (**Tabella 11**) cui corrispondono anche aumentati livelli di GST π .

Analisi delle interazioni tra NBDHEX e i farmaci chemioterapici convenzionali

L'efficacia *in vitro* di NBDHEX in associazione con CDDP è stata valutata dopo esposizione sia simultanea sia sequenziale di due farmaci.

Come mostrato in **Tabella 12**, la contemporanea somministrazione nelle linee cellulari U-2OS e Saos-2 e in tutte le loro varianti CDDP-resistenti, di NBDHEX e CDDP ha prodotto principalmente effetti additivi con la sola eccezione della linea U2/CDDP4 μ g in cui si è verificato un effetto sinergico.

Esperimenti di esposizione sequenziale sono stati eseguiti somministrando come primo farmaco NBDHEX seguito immediatamente da CDDP, come pure è stata effettuato anche lo schema inverso di somministrazione dei farmaci (CDDP come primo farmaco seguito da NBDHEX). Esperimenti di esposizione sequenziale sono stati condotti nelle linee cellulari parentali U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti CDDP-resistenti. Come mostrato in **Tabella 13** gli effetti osservati sono stati principalmente additivi in entrambi gli schemi di trattamento con qualche effetto sinergico nelle linee U2/CDDP1 μ g e Sa/CDDP1 μ g quando NBDHEX è stato somministrato come primo farmaco e, sempre nella linea cellulare U2/CDDP1 μ g, quando NBDHEX è stato somministrato come secondo farmaco (**Tabella 13**).

Effetti di NBDHEX sull'apoptosi

È stato valutato l'effetto di NBDHEX sull'apoptosi in linee cellulari farmaco-sensibili U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti resistenti con elevati livelli di resistenza al CDDP dopo trattamento con 4 μ M di farmaco per 96 ore.

La valutazione morfologica dell'apoptosi dopo colorazione nucleare con Hoechst 33258 ha evidenziato una lieve induzione dell'apoptosi in tutte le linee cellulari considerate che è risultata essere statisticamente significativa se paragonata all'appropriato controllo (**Figura 22**).

Discussione

Lo sviluppo della farmaco-resistenza è un problema clinico abbastanza comune e piuttosto rilevante che riduce significativamente l'efficacia della chemioterapia in diversi tumori umani. Nell'osteosarcoma ad alto grado, in particolare, la risposta al trattamento chemioterapico è uno dei fattori determinanti per il successo terapeutico e, di conseguenza, per la prognosi del paziente (*Baldini N, 1999; Bacci G, 2000; Bramwell VH, 2000*). L'attuale schema di trattamento dell'osteosarcoma ad alto grado associa alla rimozione chirurgica del tumore trattamenti di chemioterapia pre- e post-operatoria (chemioterapia neoadjuvante) basati principalmente sull'impiego di doxorubicina, methotrexate ad alte dosi, cisplatino e ifosfamide (*Bramwell VH, 1997; Bruland OS, 1997; Bacci G, 2000; Ferrari S, 2001; Ferrari S, 2005*). Nonostante l'impiego di protocolli chemioterapici particolarmente aggressivi, permane tuttavia un numero rilevante di pazienti (che si aggira attorno al 30-40% dei casi) che non rispondono in maniera adeguata al trattamento farmacologico e presentano, in genere, una prognosi avversa con precoce sviluppo di metastasi polmonari e rapida progressione della malattia (*Bacci G, 1993; Bramwell VH, 1997; Bruland OS 1997; Bacci G, 2000; Bacci G, 2001; Ferrari S, 2001; Ferrari S, 2005*).

Studi clinici e sperimentali volti ad identificare i parametri dotati di maggiore valore prognostico nell'osteosarcoma ad alto grado hanno evidenziato nella necrosi chemioindotta dal trattamento pre-operatorio, nel volume del tumore, nell'età del paziente e nell'espressione della P-glicoproteina al momento della diagnosi fattori in grado di predire la risposta clinica del tumore al trattamento farmacologico e/o la prognosi del singolo paziente (*Davis AM 1994; Baldini N, 1995a; Bramwell VH, 1997; Bruland OS, 1997; Chan HS, 1997; Baldini N, 1999; Bramwell VH, 2000; Ferrari S, 2001; Serra M, 2003; Serra M, 2006*).

Diversi studi hanno, infatti, dimostrato come una scarsa risposta istologica al trattamento pre-operatorio in termini di necrosi chemioindotta, un volume della massa tumorale superiore a 150ml al momento della diagnosi ed un'età pediatrica (inferiore a 12 anni) del paziente siano fattori spesso associati ad una ridotta risposta clinica al trattamento farmacologico e/o ad un'aumentata probabilità di ricaduta e conseguente cattiva prognosi (*Bacci G, 1993; Davis AM, 1994; Bramwell VH, 1997; Bruland OS, 1997; Bacci G, 2000; Ferrari S, 2001*).

Fra i marcatori biologici finora analizzati, l'aumentata espressione della P-glicoproteina al momento della diagnosi, è risultata essere il marcatore prognostico negativo più importante

nell'osteosarcoma ad alto grado, essendo correlata ad un elevato rischio di ricaduta, con sviluppo di metastasi polmonari, e ad una prognosi particolarmente sfavorevole che si traduce in una percentuale di sopravvivenza non superiore al 40% dei pazienti (*Baldini N, 1995; Chan HS, 1997; Baldini N, 1999; Serra M, 2003; Serra M, 2006*).

La P-glicoproteina è una proteina di membrana deputata al trasporto nell'ambiente extracellulare di sostanze potenzialmente tossiche per la cellula, comprese le tossine derivate dal metabolismo endocellulare ma anche farmaci chemioterapici come le antracicline (*Goldstein LJ, 1989; Gottesman MM, 1993*).

Le antracicline sono tra i farmaci più importanti nella chemioterapia dell'osteosarcoma, in particolare la doxorubicina è il farmaco che risulta essere più attivo sebbene effetti tossici (soprattutto cardiomiopatia dose-dipendente) e farmaco-resistenza naturale o acquisita (principalmente dovuta ad aumentati livelli del gene *MDR1* e del suo prodotto la P-glicoproteina) limitino la sua efficacia clinica (*Smith MA, 1991; Blaney SM, 1993; Bramwell VH, 1997; Baldini N, 1999*).

Poiché le antracicline sono ampiamente usate, non solo per il trattamento dell'osteosarcoma, ma anche di molti altri tumori umani, negli ultimi dieci anni sono state compiute ricerche nel tentativo di ridurre la tossicità e aumentare l'attività di questa potente classe di farmaci. Una di queste strategie è stata quella di sintetizzare una nuova classe di farmaci antitumorali attraverso modificazioni della struttura chimica dell'antraciclina.

Il PNU-159548 (ladirubicina) è il prototipo di una nuova classe di farmaci derivanti dalle antracicline e che possiede un duplice meccanismo d'azione: si intercala al DNA e alchila la guanina in posizione N⁷ e l'adenina in posizione N³ nel solco maggiore del DNA (*Marchini S, 1995*).

D'altra parte, è interessante notare che negli animali, a dosi equimielotossiche, il PNU-159548 è risultato essere meno cardiotossico della doxorubicina (*Geroni C, 2001*), dato che è stato confermato in studi di Fase I in pazienti con diversi tumori solidi in cui non è stata riscontrata cardiotossicità al PNU-159548 somministrando dosi comprese tra 1 e 16 mg/m² (la C_{max} raggiunta era compresa tra 0.5 e 1.5 µM) (*De Jonge MJ, 2002; Moneta D, 2003*).

La combinazione dell'attività intercalante e alchilante nella stessa molecola, senza l'effetto cardiotossico delle antracicline, ha ulteriormente indicato il PNU-159548 come eccellente candidato per lo sviluppo clinico in oncologia, con particolare riguardo per quelle neoplasie in cui, come per l'osteosarcoma, le antracicline svolgono un ruolo essenziale nel trattamento

chemioterapico della malattia.

Finora non sono stati riportati dati che riguardino l'attività del PNU-159548 nell'osteosarcoma, perciò in questo studio, è stata valutata la sua tossicità ed efficacia in un ampio pannello di linee cellulari di osteosarcoma umano farmaco-sensibili e farmaco-resistenti.

Nel modello sperimentale impiegato, il PNU-159548 è risultato essere molto efficace sia nelle linee cellulari farmaco-sensibili sia in quelle farmaco-resistenti. Di particolare interesse è stata l'osservazione che questo farmaco mantiene la sua efficacia anche in linee cellulari di osteosarcoma resistenti, che presentano un fenotipo farmaco-resistente come conseguenza dell'amplificazione/sovraespressione del gene *MDR1* e aumentati livelli della P-glicoproteina (*Serra M, 1993; Scotlandi K, 1994*).

In accordo con questi risultati, l'incorporazione intracellulare del PNU-159548 non è risultata essere influenzata dalla presenza di elevati livelli della P-glicoproteina, essendo il PNU-159548 in grado di accumularsi allo stesso modo sia nelle linee cellulari farmaco-sensibili sia resistenti alla doxorubicina.

Questi dati indicano che la presenza simultanea di uno scheletro antraciclino e un gruppo con proprietà alchilanti nella stessa molecola del PNU-159548 può generare un meccanismo d'azione e resistenza diverso da quello delle antracicline classiche.

Nel modello sperimentale di questo studio, il PNU-159548 è risultato essere attivo anche in linee cellulari di osteosarcoma resistenti al methotrexate o al cisplatino, con un'efficacia simile a quella sulle linee cellulari farmaco-sensibili. Questi dati sono indicativi della mancanza di un meccanismo di resistenza crociata tra il PNU-159548 e il methotrexate o il cisplatino, che insieme alla doxorubicina, sono i farmaci antitumorali maggiormente impiegati nella chemioterapia dell'osteosarcoma.

Di particolare interesse è stata l'osservazione che tutte le linee cellulari di osteosarcoma presentano valori di IC50 del PNU-159548 che sono almeno 10 volte inferiori a quelli della concentrazione plasmatica massima raggiunta dal PNU-159548 in clinica in studi di Fase I (*De Jonge MJ, 2002; Moneta D, 2003*), suggerendo che il trattamento di pazienti con osteosarcoma con il PNU-159548 può essere possibile ed effettuabile a dosaggi clinicamente utilizzabili.

Per verificare la possibilità di effettuare trattamenti combinati con il PNU-159548 e i farmaci antitumorali convenzionali, sono state studiate le interazioni tra il PNU-159548 e

doxorubicina, methotrexate e cisplatino, sia in linee cellulari farmaco-sensibili sia in linee cellulari farmaco-resistenti.

La contemporanea somministrazione del PNU-159548 e doxorubicina, methotrexate o cisplatino in linee cellulari farmaco-sensibili, ha prodotto principalmente interazioni additive o sinergiche. I dati ottenuti nelle varianti farmaco-resistenti hanno mostrato che il PNU-159548 può essere efficacemente impiegato in combinazione con la doxorubicina o il cisplatino, ma non con il methotrexate.

Infatti, la contemporanea somministrazione del PNU-159548 e doxorubicina o cisplatino ha prodotto effetti additivi o sinergici, mentre nelle varianti MTX-resistenti la combinazione del PNU-159548 e il methotrexate ha prodotto invariabilmente effetti antagonisti.

Sono disponibili solamente pochi dati per poter spiegare la possibile causa dei diversi effetti della combinazione tra questi farmaci.

La capacità del PNU-159548 di intercalare e alchilare il DNA può spiegare la sua interazione positiva con gli altri farmaci che hanno come bersaglio il DNA ma con diversi meccanismi d'azione come la doxorubicina o il cisplatino, anche in linee cellulari che sono resistenti a questi farmaci.

L'interazione antagonista del PNU-159548 con il methotrexate, che è stata osservata in tre linee cellulari farmaco-sensibili e in tutte le varianti MTX-resistenti, può parzialmente essere spiegata dall'effetto del PNU-159548 sul ciclo cellulare. Infatti, l'efficacia del methotrexate è strettamente legata alla presenza di cellule in attiva proliferazione (*Calvert H, 1999*). Quindi il parziale blocco del ciclo cellulare indotto dal PNU-159548, che è più pronunciato nelle tre linee cellulari farmaco-sensibili in cui l'interazione con il methotrexate è stata antagonista rispetto alle altre linee, può essere responsabile della simultanea riduzione dell'efficacia del methotrexate e del conseguente effetto antagonista di questa combinazione.

D'altra parte, dal momento che lo stesso effetto del PNU-159548 sul ciclo cellulare era presente anche nelle varianti MTX-resistenti, la contemporanea somministrazione di entrambi i farmaci può aver annullato completamente la bassa efficacia che il methotrexate ancora manteneva in queste cellule, risultando nell'effetto antagonista osservato.

Interessanti osservazioni aggiuntive sono derivate da esperimenti di somministrazione sequenziale.

La più alta efficacia *in vitro* è stata raggiunta quando il PNU-159548 è stato somministrato come primo farmaco, seguito immediatamente da doxorubicina, methotrexate o cisplatino.

Questa sequenza di somministrazione ha prodotto invariabilmente effetti additivi o sinergici sia nelle linee cellulari farmaco-sensibili che resistenti.

Questi risultati possono essere spiegati considerando l'alta sensibilità al PNU-159548 sia delle linee cellulari farmaco-sensibili sia delle linee cellulari resistenti, la notevole risposta al farmaco osservata in tutte le linee cellulari dopo esposizione al PNU-159548 può essere anche responsabile di una conseguente aumentata sensibilità o ridotta resistenza delle stesse cellule ai farmaci convenzionali.

In altre parole, è possibile che l'efficacia dei farmaci convenzionali sia potenziata nelle cellule che sono state precedentemente danneggiate dall'attività del PNU-159548 di alchilare il DNA. D'altra parte, è stato trovato che, nelle varianti farmaco-resistenti, tutte le altre sequenze di somministrazione di farmaci sono risultate avere effetti antagonisti.

Questo potrebbe dipendere dal fatto che, la prima esposizione al farmaco alla quale le cellule sono resistenti ha un effetto negativo o compromette la loro conseguente sensibilità al PNU-159548 attraverso meccanismi che rimangono ancora da determinare.

In conclusione, il nuovo farmaco antitumorale PNU-159548 ha mostrato elevata efficacia in un ampio pannello di linee cellulari di osteosarcoma farmaco-sensibili e farmaco-resistenti.

Queste osservazioni, insieme con quelle osservate in assenza di resistenza crociata con la doxorubicina, il methotrexate o il cisplatino e la possibilità di essere usato con successo in combinazione con questi farmaci, indicano che il PNU-159548 può essere considerato un promettente candidato per la pianificazione di nuovi schemi terapeutici per i pazienti con osteosarcoma, sebbene i protocolli di trattamento devono essere pianificati attentamente sulla base di queste osservazioni pre-cliniche.

Lo studio di modelli sperimentali e serie cliniche di pazienti affetti da diverse neoplasie, ha dimostrato che la resistenza al methotrexate nei tumori umani può svilupparsi in seguito a diversi meccanismi cellulari e/o biomolecolari, che possono variare da tumore a tumore ed anche fra le diverse popolazioni cellulari che sono presenti all'interno della stessa neoplasia (*Bertino JR, 1993; Bertino JR, 1996*).

E' stato dimostrato come in pazienti affetti da leucemia mielocitica acuta, una neoplasia spesso poco responsiva al trattamento con il methotrexate, il fattore responsabile della resistenza naturale delle cellule neoplastiche al methotrexate è la ridotta poli-glutammazione,

che comporta una conseguente riduzione dell'accumulo intracellulare del farmaco (*Lin JT, 1991*). In un altro studio in cui invece, sono stati considerati pazienti affetti da leucemia linfocitica acuta, la resistenza al methotrexate è risultata essere dovuta ad una ridotta incorporazione intracellulare del farmaco, dovuta ad una diminuzione dei livelli del trasportatore di membrana RFC, assieme ad un'amplificazione del gene *DHFR* (*Gorlick R, 1996*).

I dati riportati sull'analisi dei meccanismi di resistenza al methotrexate nelle cellule di osteosarcoma sembrerebbero indicare nell'amplificazione e/o iperespressione del gene *DHFR* e nella ridotta espressione del gene *RFC*, i principali meccanismi responsabili della resistenza naturale e acquisita al methotrexate nelle cellule di osteosarcoma (*Serra M, 2004*). L'analisi di una serie di campioni clinici di osteosarcoma ad alto grado ha, infatti, messo in evidenza una correlazione fra ridotta espressione del gene *RFC* e/o amplificazione del gene *DHFR* con una scarsa risposta istologica al trattamento chemioterapico valutata in termini di necrosi chemioindotta (*Guo W, 1999*). Lo stesso studio ha anche suggerito, ma non completamente dimostrato, che mentre la ridotta espressione del gene *RFC* sembra essere principalmente responsabile della resistenza naturale al methotrexate nelle cellule di osteosarcoma l'amplificazione e/o iperespressione del gene *DHFR* sembra essere invece coinvolta nella determinazione della resistenza acquisita al farmaco, ritrovandosi più frequentemente nelle metastasi polmonari insorte dopo il trattamento chemioterapico che non nei tumori primitivi non trattati (*Guo W, 1999*). Questi dati confermano quindi la contemporanea presenza di entrambi questi meccanismi nelle cellule di osteosarcoma MTX-resistenti e quindi il coinvolgimento di entrambi questi fattori nella determinazione della resistenza al methotrexate nelle cellule di osteosarcoma.

I dati ottenuti finora su campioni clinici di osteosarcoma hanno dimostrato che non solo la diminuita espressione del gene *RFC* (*Guo W, 1999; Serra M, 2004*), ma anche l'amplificazione del gene *DHFR* può essere già presente al momento della diagnosi anche in pazienti non trattati in precedenza con farmaci chemioterapici (*Serra M, 2004*), suggerendo che entrambi i meccanismi molecolari possono essere responsabili sia della resistenza acquisita sia di quella naturale al methotrexate. Questo è un dato di assoluta importanza e di cui bisogna necessariamente tenere conto nella eventuale pianificazione di schemi di trattamento alternativi basati sull'impiego di farmaci in grado di aggirare parzialmente i meccanismi di farmaco-resistenza verso il methotrexate.

Uno tra i tanti tentativi compiuti per cercare di aggirare la resistenza al methotrexate è rappresentato dall'impiego di un altro farmaco antimetabolita dei folati, il trimetrexate, che in molti tumori che non rispondevano al trattamento con il methotrexate, ha dato risultati promettenti e che è già in uso nella pratica clinica (*Chou AJ, 2006*).

Il trimetrexate è un potente inibitore della DHFR che, contrariamente al methotrexate, penetra passivamente all'interno della cellula senza ricorrere al sistema di trasporto di membrana mediato da RFC e non risente neppure di eventuali meccanismi di resistenza dovuti ad una diminuzione della poligluttammazione.

Sebbene l'efficacia di questo composto sia stata studiata in varie neoplasie, in diverse delle quali viene anche attualmente incluso in protocolli di chemioterapia sperimentali per pazienti non-responsivi agli schemi di trattamento convenzionali (*Haller DG, 1997*), non esistono tuttora dati riguardanti la sua attività in cellule di osteosarcoma umano.

Lo scopo di questo studio è stato di valutare l'efficacia pre-clinica del trimetrexate in linee cellulari di osteosarcoma umano sia farmaco-sensibili sia farmaco-resistenti.

Nel modello sperimentale impiegato in questo studio, l'efficacia del trimetrexate è risultata maggiore, se paragonata a quella del methotrexate, in tutte le linee cellulari considerate, sia farmaco-sensibili sia resistenti. In particolare, si è potuto notare l'esistenza di resistenza crociata tra questo farmaco ed il methotrexate nelle varianti MTX-resistenti derivanti dalla linea cellulare U-2OS, ma non in quelle derivanti dalla linea cellulare Saos-2. Questo dato è ulteriormente confermato da quelli ottenuti in esperimenti di valutazione dell'apoptosi del trimetrexate sulle stesse linee cellulari, dove si è osservato che vi è stata induzione dell'apoptosi solamente nelle linee MTX-resistenti derivanti dalla linea cellulare Saos-2, ma non in quelle derivanti dalla linea cellulare U-2OS.

Questo si può spiegare con il fatto che le varianti MTX-resistenti della linea cellulare U-2OS, presentano gradi di espressione crescenti del gene che codifica per la *DHFR*, e poiché l'aumentata espressione di tale enzima è anche il principale meccanismo di resistenza al trimetrexate, la sua elevata espressione è causa anche della ridotta risposta a questo farmaco.

Nelle varianti MTX-resistenti derivanti dalla linea Saos-2, invece, la mancata risposta al methotrexate è dovuta al decremento dell'espressione del gene che codifica per *RFC*, e poiché il trimetrexate non utilizza questo trasportatore per entrare nella cellula, non è influenzato da questo meccanismo di farmaco-resistenza. L'efficacia del trimetrexate è stata valutata anche in linee cellulari di osteosarcoma resistenti alla doxorubicina e al cisplatino, da cui è emerso

che le varianti CDDP-resistenti sono abbastanza sensibili al trimetrexate indicando la mancanza di resistenza crociata tra il trimetrexate ed il cisplatino, mentre le varianti DX-resistenti sono risultate essere poco sensibili al trimetrexate.

Questo si può spiegare con il fatto che il trimetrexate è un farmaco idrofobico, al contrario del methotrexate che è idrofilo, per tanto, come la maggior parte delle sostanze idrofobiche è substrato della P-glicoproteina (*Zhao R, 2003*). Poiché le linee cellulari U2/DX580 e Sa/DX580 sono caratterizzate dall'aver elevati livelli di espressione di P-glicoproteina, questo può influenzare anche la risposta al trattamento con il trimetrexate, questo spiega perché cellule selezionate per la resistenza alla doxorubicina che sovraesprimono la P-glicoproteina presentano resistenza crociata al trimetrexate, ma non al methotrexate.

Per verificare se è possibile effettuare combinazioni con il trimetrexate e i farmaci antitumorali convenzionali della terapia dell'osteosarcoma, sono state studiate le interazioni tra il trimetrexate e la doxorubicina o il cisplatino sia in linee cellulari farmaco-sensibili sia farmaco-resistenti.

L'efficacia del trimetrexate non è stata provata in combinazione con il methotrexate perché si era pensato di sostituirlo con il trimetrexate qualora fosse risultato efficace.

La contemporanea somministrazione di trimetrexate e doxorubicina o cisplatino in linee cellulari farmaco-sensibili, ha prodotto principalmente effetti additivi con la sola eccezione della linea Saos-2, dove la combinazione con la doxorubicina è risultata in un'interazione antagonista. I dati ottenuti nelle varianti farmaco-resistenti hanno mostrato che il trimetrexate può essere efficacemente somministrato in combinazione con il cisplatino ma non con la doxorubicina.

Infatti, la contemporanea somministrazione del trimetrexate e cisplatino, nelle varianti CDDP-resistenti, ha prodotto effetti additivi o sinergici, mentre nelle varianti DX-resistenti la combinazione del trimetrexate con la doxorubicina ha prodotto invariabilmente effetti antagonisti.

La possibile causa dei diversi effetti della combinazione tra questi farmaci, può essere spiegata tenendo conto dei loro meccanismi d'azione. Infatti, i due farmaci possiedono meccanismi d'azione estremamente diversi, avendo il cisplatino come bersaglio il DNA e il trimetrexate la sua sintesi, che li porta ad interagire positivamente.

L'interazione antagonista, invece, del trimetrexate e la doxorubicina, può dipendere probabilmente dal fatto che anche il trimetrexate è substrato della P-glicoproteina come la

doxorubicina, e la somministrazione contemporanea di due farmaci che sono soggetti ad uno stesso meccanismo di farmaco-resistenza, può non essere in grado di aggirarlo.

Interessanti osservazioni aggiuntive sono derivate da esperimenti di somministrazione sequenziale. La più alta efficacia *in vitro* è stata raggiunta quando il trimetrexate è stato somministrato come primo farmaco seguito immediatamente da doxorubicina o da cisplatino. Questa sequenza di somministrazione ha prodotto invariabilmente effetti additivi o sinergici sia nelle linee cellulari farmaco-sensibili che resistenti.

Questi risultati, nelle linee cellulari CDDP-resistenti, possono esser spiegati considerando la sensibilità al trimetrexate di queste linee cellulari. Infatti, è possibile che il trimetrexate bloccando la sintesi del DNA renda queste cellule maggiormente sensibili all'attacco del cisplatino. La somministrazione inversa, ossia cisplatino come primo farmaco, potrebbe avere un effetto negativo sulla sensibilità al trimetrexate attraverso meccanismi che non sono noti.

Gli effetti, additivo e sinergico, che si ottengono dalla somministrazione sequenziale del trimetrexate e doxorubicina si possono spiegare con il fatto che il trimetrexate somministrato come primo farmaco vada ad occupare tutti i siti di legame della P-glicoproteina che rimangono ancora occupati al momento della somministrazione della doxorubicina, la quale non venendo espulsa, può esplicare la sua azione citotossica. Fenomeno che non si verifica se invece viene somministrata la doxorubicina come primo farmaco, perché probabilmente l'espulsione della doxorubicina dalla cellula è talmente rapida che i siti di legame sulla P-glicoproteina sono già subito disponibili quando il trimetrexate viene somministrato subito dopo.

Nel loro insieme queste osservazioni stanno ad indicare che il trimetrexate non è un farmaco particolarmente adatto al trattamento dell'osteosarcoma, essendo soggetto ai meccanismi di resistenza più comuni e meglio caratterizzati in questo tipo di neoplasia (espressione/amplificazione di *MDR1* e espressione del gene *DHFR*).

L'eventuale pianificazione di protocolli di chemioterapia basati sull'impiego del trimetrexate dovrebbero necessariamente basarsi sulla valutazione a priori dello stato del gene *DHFR* e del gene *MDR1* (espressione di P-glicoproteina) della singola neoplasia, onde identificare i casi che, a causa dell'iperespressione e/o amplificazione di questi geni e dei loro prodotti presentano già un certo livello di resistenza naturale a questo antifolato e, di conseguenza, un'elevata probabilità di scarsa risposta verso questo farmaco.

I meccanismi che causano la resistenza al cisplatino nelle cellule tumorali sono molteplici e alcuni dei quali non ancora ben definiti (*Siddik ZH, 2003*). Ciò che è certo è che la mancata risposta al trattamento farmacologico con il cisplatino, non è mai dovuta ad uno solo di essi, ma è il verificarsi di più meccanismi contemporaneamente in una stessa cellula a sviluppare la resistenza al cisplatino nei tumori umani (*Siddik ZH, 2003*).

È ormai accertato che la mancata risposta al cisplatino può dipendere dall'aumentata espressione del GST, in particolare del GST π (*Siddik ZH, 2003*), inoltre è stato ampiamente dimostrato che la iperespressione del GST π è associata all'insorgenza della farmacoresistenza nella maggior parte dei tumori umani (*Goto S, 1999; Goto S, 2002; Su F, 2003*).

Per quanto riguarda l'osteosarcoma, i pochi dati finora riportati sull'analisi dei meccanismi di resistenza al cisplatino, sembrano indicare nell'iperespressione del GST π un probabile meccanismo responsabile della resistenza naturale e/o acquisita al cisplatino nelle cellule di osteosarcoma. Infatti, è stato riportato un aumento di attività di questo enzima in cellule di osteosarcoma canino rese resistenti al cisplatino (*Shoieb AM, 1998*). Inoltre in uno studio condotto in campioni biotipici di pazienti con osteosarcoma, è stato visto che la sovraespressione del GST π è associata all'insuccesso della chemioterapia pre-operatoria (*Uozaki H, 1997*).

Dati preliminari su linee cellulari di osteosarcoma umano derivanti dalla linea U-2OS e Saos-2, impiegate in questo studio, selezionate per la resistenza al cisplatino, hanno mostrato gradi crescenti di espressione del GST π in relazione al livello di resistenza al farmaco.

Recentemente è stata dimostrata un'attività antiapoptotica svolta dal GST π , che agirebbe inibendo la via di trasduzione del segnale mediata da MAPK formando un complesso con la proteina JNK (*Townsend DM, 2003*).

Per cercare di aggirare il meccanismo di resistenza al cisplatino dovuta ad un'iperespressione del GST π , sono state sintetizzate molecole in grado di inibirne l'azione (*Ricci G, 2005*).

Questi nuovi composti sono i derivati dell'NBD-Cl e tra tutti quelli testati, quello che ha mostrato maggior efficacia *in vitro* in linee cellulari leucemiche umane, linee cellulari di carcinoma epatico umano e linee cellulari di carcinoma polmonare a piccole cellule umano, è stato l'NBDHEX (*Turella P, 2005*).

I risultati ottenuti in sperimentazioni preliminari *in vitro* hanno dimostrato che questo farmaco:

- è caratterizzato da una estrema lipofilicità che gli permette di diffondere molto velocemente attraverso la membrana di cellule di osteosarcoma indipendentemente dal fenotipo espresso,
- non è substrato delle proteine di membrana MDR1,
- presenta una ottima affinità per la proteina bersaglio GST π che ne permette l'utilizzo a basse dosi anche in cellule di osteosarcoma MDR,
- induce morte cellulare attivando un processo apoptotico mediato da JNK.

Esperimenti di tossicità condotti *in vivo* in topi hanno confermato una relativa bassa tossicità di questa nuova molecola, indicandola come promettente candidato per un possibile impiego clinico (Turella P, 2005).

Poiché non sono stati riportati dati che riguardino l'attività di NBDHEX nell'osteosarcoma, è stata valutata la sua tossicità ed efficacia in un pannello di linee cellulari di osteosarcoma umano farmaco- sensibili e resistenti al cisplatino.

Dai risultati ottenuti si può osservare che questo farmaco è estremamente efficace in tutte le linee cellulari considerate. È interessante notare che nelle linee cellulari CDDP-resistenti, l'efficacia sembra aumentare all'aumentare dei livelli di resistenza al cisplatino.

Nelle varianti CDDP-resistenti della linea cellulare U-2OS, si ha un progressivo incremento del grado di espressione del GST π in relazione al livello di resistenza al cisplatino e questo renderebbe le cellule più sensibili al trattamento con NBDHEX che lega con altissima affinità il GST π .

Nelle varianti CDDP-resistenti della linea cellulare Saos-2, l'espressione del GST π non aumenta all'aumentare dei livelli di resistenza al cisplatino, ma probabilmente la quantità di GST π è comunque sufficiente a rendere queste cellule sensibili al trattamento con NBDHEX. Questo dato è pure confermato dagli esperimenti di valutazione dell'apoptosi indotta da NBDHEX in cellule sensibili e resistenti al cisplatino.

Il fatto che NBDHEX sia oltremodo attivo anche in linee cellulari che non sovraesprimono il GST π , si spiega con il fatto che questa molecola è essa stessa tossica per la cellula e probabilmente non agisce solamente in modo strettamente collegato all'attività del GST π .

Per verificare se è possibile l'uso combinato di NBDHEX e cisplatino, sono state studiate le interazioni tra questi due farmaci in linee cellulari farmaco-sensibili e CDDP-resistenti di osteosarcoma umano.

Sia la contemporanea somministrazione sia la somministrazione sequenziale dei due farmaci ha prodotto effetti additivi o sinergici.

Questo si spiega probabilmente con il fatto che NBDHEX, essendo estremamente tossico per le cellule già a basse concentrazioni, vada a danneggiarle a tal punto da renderle maggiormente sensibili al trattamento con il cisplatino e nel caso in cui venga somministrato come secondo farmaco, la sua elevata affinità nel legare il GST π , sia in grado di innescare la cascata apoptotica mediata da JNK, necessaria per l'espletamento dell'effetto tossico del cisplatino.

I dati ottenuti, nel loro insieme, supportano il possibile uso dell'NBDHEX con il cisplatino e la sua bassa tossicità riscontrata *in vivo*, in lavori recentemente pubblicati in altri modelli sperimentali, sembrano indicarlo per un possibile impiego clinico come farmaco antitumorale (Turella P, 2005).

Conclusioni

Dai dati ottenuti in questo studio, in cui è stata provata l'efficacia pre-clinica di tre farmaci antitumorali, PNU-159548, Trimetrexate e NBDHEX, in linee cellulari di osteosarcoma umano, per un loro possibile impiego clinico a supporto dei trattamenti convenzionali per la cura dei pazienti non responsivi, è emerso che:

- il PNU-159548 rappresenta un buon farmaco da usare a supporto della terapia convenzionale, soprattutto in quei pazienti che non sono responsivi al trattamento farmacologico per la presenza di elevata espressione della P-glicoproteina;
- il Trimetrexate non è il farmaco più adatto da usare in sostituzione o a supporto dell'attuale terapia in quanto soggetto a quegli stessi meccanismi di resistenza degli attuali farmaci impiegati (sovraespressione del gene *DHFR* e sovraespressione di P-glicoproteina);
- NBDHEX, in base ai dati qui riportati e presenti in letteratura, sembra un farmaco promettente in quanto è in grado di aggirare la mancata risposta al trattamento con cisplatino dovuta alla sovraespressione di GST π , anche se nei confronti di questo nuovo composto gli studi devono ancora essere completati.

In linea generale, per il trattamento di pazienti con osteosarcoma ad alto grado con ognuno di questi farmaci, diventa di assoluta importanza la conoscenza per ogni singola neoplasia, la presenza o meno dei fattori prognostici (sovraespressione del gene *DHFR* e *RFC*, sovraespressione della P-glicoproteina e sovraespressione di GST π) che sono la causa della mancata o ridotta risposta al trattamento farmacologico, in modo da identificare i pazienti che potrebbero realmente beneficiare del trattamento con queste molecole.

Bibliografia

Publicazioni inerenti questo studio

I dati presentati in questo studio sono già stati parzialmente pubblicati nei seguenti lavori:

Serra M, Reverter-Branchat G, Maurici d, Benini S, Shen JN, Chano T, Hattinger CM, Manara MC, **Pasello M**, Scotlandi K and Picci P. “Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in OS cells”. *Ann. Oncol.* 15 (1): 151 – 160, 2004.

Pasello M, Hattinger CM, Stoico G, Manara MC, Benini S, Geroni C, Mercuri M, Scotlandi K, Picci P and Serra M. “4-Demethoxy-3'-deamino-3'-aziridinyl-4'-methylsulphonyl-daunorubicin (PNU-159548): a promising new candidate for chemotherapeutic treatment of osteosarcoma patients”. *Eur. J. Cancer.* 41 (14): 2184 – 2195, 2005.

Serra M, **Pasello M**, Manara MC, Scotlandi K, Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, Alvegard TA, Picci P, Bacci G and Smeland S. “May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol”. *Int. J. Oncol.* 29 (6): 1459 – 1468, 2006.

Riferimenti bibliografici nel testo

Adler V, Yin Z, Fuchs SY, Benezra M, Rosario L, Tew KD, Pincus MR, Sardana M, Henderson CJ, Wolf CR, Davis RJ, Ronai Z. “Regulation of JNK signaling by GSTpi”. *EMBO J.* 18 (5): 1321 – 1334, 1999.

Allen IM and Creaven PJ. “In vitro liver activation of ifosfamide (NSC – 109724): A new oxazaphosphorine”. *Cancer Chemoter. Rep.* 56: 603 – 610, 1972.

Andrews PA, Howell SB. “Cellular pharmacology of cisplatin: perspectives on mechanisms of acquired resistance”. *Cancer Cells.* 2(2):35-43, 1990.

Arndt C, Morgenstern B, Hawkins D, et al. “Renal function following combination chemotherapy with ifosfamide and cisplatin in patient with osteogenic sarcoma”. *Med. Pediatr. Oncol.* 32: 93 – 96, 1999.

Aung L, Gorlick RG, ShiW, et al. “Second malignant neoplasms in long-term survivors of osteosarcoma: Memorial Sloan-Kettering Cancer Experience”. *Cancer.* 95: 1728 – 1734, 2002.

Avella M, Bacci G and Mc Donald DJ. “Adjuvant chemotherapy with six drugs (adriamycin, methotrexate, cisplatin, bleomycin, cyclophosphamide and dactinomycin) for non metastatic high grade osteosarcoma of the extremities. Results of 32 patients and comparison to 127 patients concomitantly treated with the same drugs in neoadjuvant form”. *Chemioterapia.* 7: 133- 137, 1988.

Bacci G, Picci P, Briccoli A et al. “Osteosarcoma of the extremity metastatic at presentation: results achieved in 26 patients treated with combined therapy (primary chemotherapy followed by simultaneous resection of the primary and metastatic lesions)”. *Tumori.* 78: 200 – 206, 1992.

Bacci G, Picci P, Ferrari S et al. “Prognostic significance of serum alkaline phosphatase measurements in patients with OS treated with adjuvant or neoadjuvant chemotherapy”. *Cancer.* 71: 1224 – 1230, 1993.

Bacci G, Picci P, Ferrari S et al. “Primary chemotherapy and delayed surgery for non-metastatic telangiectatic osteosarcoma of the extremities. Results in 28 patients”. *Eur. J. Cancer.* 30: 620 – 626, 1994.

Bacci G, Figus E, Briccoli A et al. “Osteogenic sarcoma of the extremity with detectable lung metastases at presentation (OEM): results in 23 patients treated with chemotherapy followed by simultaneous resection of primary and metastatic lesions (SRPSL)”. *Proc 9th Meeting of European Musculoskeletal Oncology Society*, 1996.

Bacci G, Ferrari S, Bertoni F, Ruggieri P, Picci P, Longhi A, Casadei R, Fabbri N, Forni C, Versari M and Campanacci M. “Long-term outcome for patients with nonmetastatic osteosarcoma of the extremity treated at the Istituto Ortopedico Rizzoli according to the Istituto Ortopedico Rizzoli/osteosarcoma-2 protocol: an updated report”. *J. Clin. Oncol.* 18: 4016-4027, 2000.

Bacci G, Ferrari S, Longhi A, et al. “High dose ifosfamide in combination with high-dose methotrexate, doxorubicin and cisplatin in the neoadjuvant treatment of the extremity osteosarcoma: preliminary results of an Italian Sarcoma/Scandinavian Group Pilot study”. *J. Chemother.* 14: 198 – 206, 2002.

Bacci G, Bertoni F, Longhi A, Ferrari S, Forni C, Biagini R, et al. “Neoadjuvant chemotherapy for high-grade central osteosarcoma of the extremity. Histologic response to preoperative chemotherapy correlates with histologic subtype of the tumour”. *Cancer.* 97: 3068 – 3075, 2003.

Baldini N, Scotlandi K, Serra M, Kusuzaki K, Shikita T, Manara MC, et al. “Adriamycin binding assay: a valuable chemosensitivity test in human osteosarcoma”. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 119: 121 - 126, 1992.

- Baldini N**, Scotlandi K, Serra M, Shikita T, Zini N, Ognibene A, et al. "Nuclear immunolocalization of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines showing similar mechanisms of doxorubicin distribution". *Eur. J. Cell Biol.* 68: 226 - 239, 1995.
- Baldini N**, Scotlandi K, Barbanti-Bròdano G, Manara MC, Maurici D, Bacci G, Bertoni F, Picci P, Sottili S, Campanacci M and Serra M. "Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome". *N. Eng. J. Med.* 333: 1380-1385, 1995a.
- Baldini N**, Scotlandi K, Serra M, Picci P, Bacci ., Sottili S, and Campanacci M. "P-glycoprotein expression in osteosarcoma: a basis for risk-adapted adjuvant chemotherapy". *J. Orthop. Res.* 17: 629 - 632, 1999.
- Banerjee D**, Mayer-Kuckuk P, Capiiaux G, Budak-Alpdogan T, Gorlick R and Bertino JR. "Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase". *Biochim. Biophys. Acta.* 1587: 164 – 173, 2002.
- Bates SE**. "Drug resistance: still on the learning curve". *Clin. Cancer Res.* 5: 3346 – 3348, 1999.
- Benini S**, Baldini N, Manara MC, Chano T, Serra M, Rizzi S, et al. "Redundancy of autocrine loops in human osteosarcoma cells". *Int. J. Cancer.* 80: 581 - 588, 1999.
- Bertino JR**. "Ode to methotrexate". *J. Clin. Oncol.* 11: 5 - 14, 1993.
- Bertino JR**, Góker E, Gorlick R, Li W., and Banerjee D. "Resistance mechanisms to methotrexate in tumors". *Stem Cells.* 14: 5 - 9, 1996.
- Bielack SS**, Kempf-Bielack B, Delling G, et al. "Prognostic factors in high-grade osteosarcoma of the extremities and trunk: an analysis of 1702 patients treated with neoadjuvant Cooperative Osteosarcoma Study Group Protocols". *J. Clin. Oncol.* 20: 776 – 790, 2002.
- Bieling P**, Rehan N, Winkler P et al. "Tumor size and prognosis in aggressively treated osteosarcoma". *J. clin. Oncol.* 14: 848 – 858, 1996.
- Binaschi M**, Bigioni m, CipolloneA, Rossi C, Goso G, Maggi GA, Capranico G, and Animati F. "Anthracycline: selected new developments". *Curr. Med. Chem.* 1: 113 – 130, 2001.
- Blaney SM**, Smith MA, and Grem JL. "Osteosarcoma in adolescents and young adults: new developments and controversies. Doxorubicin: role in the treatment of osteosarcoma". Boston, Kluwer Academic Publishers, 55-73, 1993.
- Bradley G** and Ling V. "P-glycoprotein, multidrug resistance and tumor progression". *Cancer Metastasis. Rev.* 13: 223 – 233, 1994.
- Bramwell VH**. "The role of chemotherapy in the management of non-metastatic operable extremity osteosarcoma". *Semin. Oncol.* 24: 561-571, 1997.
- Bramwell VH**. "Osteosarcomas and other cancers of bone". *Curr. Opin. Oncol.* 12: 330-336, 2000.
- Brock N**. "Oxazaphosphorine cytostatics:Past – present – future. Seventh Cain Memorial Award Lecture". *Cancer Res.* 49: 1 – 7, 1989.
- Broxterman HJ**, Sonneveld P, van PuttenWJ et al. "P-glycoprotein in primary acute myeloid leukemia and treatment outcome of idarubicin/cytosine arabinoside-based induction therapy". *Leukemia.* 14: 1018 – 1024, 2000.

Bruland OS and Pihl A. "On the current management of osteosarcoma". A critical evaluation and a proposal for a modified treatment strategy". *Eur. J. Cancer.* 33: 1725-1731, 1997.

Caccuri AM, Ascenzi P, Antonini G, Parker MW, Oakley AJ, Chiessi E, Nuccetelli M, Battistoni A, Bellizia A and Ricci G. "Structural flexibility modulates the activity of human glutathione transferase P1-1. Influence of a poor co-substrate on dynamics and kinetics of human glutathione transferase". *J. Biol. Chem.* 271 (27): 16193 - 16198, 1996.

Calvert H. "An overview of folate metabolism: features relevant to the action and toxicities of antifolate anticancer agents". *Semin. Oncol.* 26, 3-10, 1999.

Campanacci M, Bacci G, Bertoni F et al. "The treatment of osteosarcoma of the extremities: Twenty year's experience at Istituto Rizzoli". *Cancer.* 48: 1569 – 1581, 1981.

Campanacci M. "Bone and soft tissue tumors". 2nd Edition, Wien: Springer-Verlag, 1999.

Capranico G, Zunino F, Kohn KW and Pommier Y. "Sequence-selective topoisomerase II inhibition by anthracycline derivatives in SV40 DNA: relationship with DNA binding affinity and cytotoxicity". *Biochem.* 29: 562 – 569, 1990.

Capranico G, Supino R, Binaschi M, Capolongo L, Grandi M, Suarato A and Zunino F. "Influence of structural modifications at the 3' and 4' positions of doxorubicin on the drug ability to trap topoisomerase II and to overcome multidrug resistance". *Mol. Pharmacol.* 45: 908 – 915, 1994.

Carli M, Passone E, Perilongo G and Bisogno G. "Ifosfamide in Pediatric Solid Tumors". *Oncology.* 65 (2): 99 – 104, 2003.

Cersosimo RJ. "Idarubicin: an anthracycline antineoplastic agent". *Clin. Pharm.* 11: 152 – 167, 1992.

Chan HS, Grogan TM, Haddad G, DeBoer G and Ling V. "P-glycoprotein expression: critical determinant in the response to osteosarcoma chemotherapy". *J. Natl. Cancer Inst.* 89: 1706 – 1715, 1997.

Chaney SG, Vaisman A. "Specificity of platinum-DNA adduct repair". *J. Inorg. Biochem.* 77 (1 - 2): 71 – 81, 1999.

Chano T, Saeki Y, Serra M, Matsumoto K and Okabe H. "Preferential expression of RB1-inducible coiled-coil 1 terminal differentiated musculoskeletal cells". *Am. J. Pathol.* 1961 (2): 359 – 364, 2002.

Chou AJ and Gorlick R. "Chemotherapy resistance in osteosarcoma: current challenges and future directions". *Exp. Rev. Anticancer Ther.* 6 (7): 1075 – 1085, 2006.

Chu E and Allegra CJ. In *Cancer Chemotherapy and biotherapy*; 2nd ed. Chabner BA, Longo DL, Eds Lippincott-Raven: Philadelphia, 1996.

Cordon-Cardo C et al. "Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues". *J. Histochem. Cytochem.* 38: 1277 – 1287, 1990.

Cvitkovic E. "cumulative toxicity from Cisplatin therapy and current cytoprotective measures". *Cancer Treat. Rev.* 24: 265 – 281, 1998.

Damia G, Filiberti L, Vikhanskaya F, Carrassa L, Taya Y, D'incalci M, Brogginini M. "Cisplatin and taxol induce different patterns of p53 phosphorylation". *Neoplasia.* 3 (1): 10-16, 2001.

- Davis AM**, Bell RS and Goodwin PJ. "Prognostic factors in osteosarcoma: A critical review". *J. clin. Oncol.* 12: 423 – 431, 1994.
- Davis RJ**. "Signal transduction by the JNK group of MAP kinases". *Cell.* 103 (2): 239 - 252, 2000.
- De Jonge MJ**, Verweij J, Van Der Gaast A, Valota O, Mora O, Planting AS, et al. "Phase I and pharmacokinetic studies of PNU-159548, a novel alkylating agent, administered intravenously to patients with advanced solid tumours". *Eur. J. Cancer.* 38: 2407 - 2415, 2002.
- De Kraker J** and Voute PA. "Ifosfamide, mesna and vincristine in paediatric oncology". *Cancer Treat. Rev.* 10 (A): 165 – 166, 1983.
- De Pas T**, Curigliano G, Masci G, Ctania C, Comandone A, Boni C, Tucci A, Pagani A, Marrocco E and de Braud F. "Phase I study of twelve-day prolonged infusion of high-dose ifosfamide and doxorubicin as first-line chemotherapy in adult patients with advanced soft tissue sarcomas". *Ann. Oncol.* 13: 161 – 166, 2002.
- Della Torre P**, Podesta A, Imondi AR, Moneta D, Sammartini U, Arrigoni C, et al. "PNU-159548, a novel cytotoxic antitumor agent with a low cardiotoxic potential". *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47: 355 - 360, 2001.
- Donahue BA**, Augot M, Bellon SF, Treiber DK, Toney JH, Lippard SJ, Essigmann JM. "Characterization of a DNA damage-recognition protein from mammalian cells that binds specifically to intrastrand d(GpG) and d (ApG) DNA adducts of the anticancer drug cisplatin". *Biochem. J.* 259 (2): 587-594, 1990.
- Draper GJ**, Sanders BM and Kingston JE. "Second primary neoplasms in patients with retinoblastoma". *Br. J. Cancer.* 53 (5): 661 –671, 1986.
- Duch DS**, Edelstein MP, Bowers SW and Nichol CA. "Biochemical and chemotherapeutic studies on 2,4-diamino-6-(2,5-dimethoxybenzyl)-5-methylpyrido[2,3-d]pyrimidine (BW 301U), a novel lipid-soluble inhibitor of dihydrofolate reductase". *Cancer Res.* 42 (10): 3987 - 3994, 1982.
- Duvoix A**, Morceau F, Delhalle S et al. "Induction of apoptosis by curcumin mediated by glutathione S-transferase P1-1 inhibition". *Biochem. Pharmacol.* 66: 1475 – 1483, 2003.
- Eastman A**. "The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes". *Pharmacol. Ther.* 34 (2): 155 – 166, 1987.
- Enneking WF**. "Advances and treatment of primary bone tumors". *J. Fla. Med. Assoc.* 66: 28 –30, 1979.
- Farber S**, Diamond L, Mercer R et al. "Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic antagonist 4-amino-pteroyl-glutamic acid (aminopterin)". *N. Engl. J. Med.* 238: 787 – 793, 1948.
- Ferrari S**, Bertoni F, Mercuri M, Picci P, Giacomini S, Longhi A and Bacci G. "Predictive factors of disease-free survival for non-metastatic osteosarcoma of the extremity: An analysis of 300 patients treated at the Rizzoli Institute". *Annals Oncol.* 12: 1145-1150, 2001.
- Ferrari S**, Smeland S, Mercuri M, Bertoni F, Longhi A, Ruggieri P, Alvegard TA, Picci P, Capanna R, Bernini G, Muller C, Tienghi A, Wiebe T, Comandone A, Bohling T, Del Prever AB, Brosjo O, Bacci G and Saeter G; Italian and Scandinavian Sarcoma Groups. "Neoadjuvant chemotherapy with high-dose Ifosfamide, high-dose methotrexate, cisplatin, and doxorubicin for patients with localized osteosarcoma of the extremity: a joint study by the Italian and Scandinavian Sarcoma Groups". *J. Clin. Oncol.* 23 (34): 8845 – 8852, 2005.
- Feugeas O**, Guriec N, Babin-Boilletot ., Marcellin L, Simon P, Babin S, Thyss A, Hofman P, Terrier P, Kalifa C, Brunat-Mentigny M, Patricot LM and Oberling F. "Loss of heterozygosity of the RB gene is a poor prognostic factor in patients with osteosarcoma". *J. Clin. Oncol.* 14: 467 - 472, 1996.

- Fields SM** and Koeller JM. "Idarubicin: a second –generation anthracycline". *DICP*. 25: 505 – 517, 1991.
- Filomeni G**, Aquilani K, Rotilio G and Ciriolo MR. "Reactive oxygen species-dependent c-jun NH₂-terminal kinase/c-Jun signaling cascade mediates neuroblastoma cell death induced by diallyl disulfide". *Cancer Res*. 63: 5940 – 5949, 2003.
- Fink D**, Aebi S, Howell SB. "The role of DNA mismatch repair in drug resistance". *Clin. Cancer Res*. 4 (1):1 – 6, 1998.
- Finkel MP**, Reilly CA. "Observations Suggesting Viral Etiology of Radiation-Induced Tumors, Particular Osteogenic Sarcomas". In Sanders CL, Busch RH, Ballou JE, Mahlum DD (eds). *Radionuclide Carcinogenesis*. Oak Ridge, TN, United States Atomic Energy Commission 278 – 288, 1973.
- Fuertes MA**, Alonso C, Perez JM. "Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance". *Chem Rev*. 103(3): 645-662, 2003.
- Galanski M**, Jakupec MA and Keppler BK. "Update of the Preclinical Situation of Anticancer Platinum Complexes: Novel Design Strategies and Innovative Analytical Approaches". *Curr. Med. Chem*. 12: 2075 – 2094, 2005.
- Gately DP**, Howell SB. "Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review". *Br J Cancer*. 67(6): 1171 – 1176, 1993.
- Geroni C**, Ripamonti M, Arrigoni C, Fiorentini F, Capolongo L, Moneta D, et al. "Pharmacological and toxicological aspects of 4-demethoxy-3'-deamino-3'-aziridinyl-4'-methylsulphonyl-daunorubicin (PNU-159548): a novel antineoplastic agent". *Cancer Res*. 61: 983 – 1990, 2001.
- Gewirtz DA**. "A critical evaluation of the mechanism of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin". *Biochem. Pharmacol*. 57: 727 – 741, 1999.
- Glaser DB**, Lane JM, Huvos AG, et al. "Survival, prognosis, and therapeutic response in osteogenic sarcoma. The Memorial Hospital experience". *Cancer*. 69: 698 – 708, 1992.
- Goldstein LJ** et al. "Expression of a multidrug resistance gene in human cancers". *J. Natl. cancer Inst*. 81: 116 – 124, 1989.
- Gong JG**, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr, Levrero M, Wang JY. "The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage". *Nature*. 399 (6738): 806-809, 1999.
- Gorlick R**, Goker E, Trippet TM, Wealtham M, Banerjee D and Bertino JR. "Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia". *N. Engl. J. Med*. 335: 1041 - 1048, 1996.
- Goto S**, Iida T, Cho S, Oka M, Kohno S, Kondo T. "Overexpression of glutathione S-transferase pi enhances the adduct formation of cisplatin with glutathione in human cancer cells". *Free Radic. Res*. 31 (6): 549 – 558, 1999.
- Goto S**, Kamada K, Soh Y, Ihara Y, Kondo T. "Significance of nuclear glutathione S-transferase pi in resistance to anti-cancer drugs". *Jpn. J. Cancer Res*. 93 (9): 1047 – 1056, 2002.
- Gottesman MM** and Pastan I. "Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter". *Annu. Rev. Biochem*. 62: 385-427, 1993.
- Gottesman MM**. "Mechanisms of cancer drug resistance". *Annu. Rev. Med*. 53: 615 – 627, 2002.

- Guano F**, Pourquier P, Tinelli S, Binasch M, Bigioni M, Animati F, Manzini S, Zunino F, Kohlhagen G, Pommier Y and Capranico G. "Topoisomerase poisoning activity of novel disaccharide anthracycline". *Mol. Pharmacol.* 56: 77 – 84, 1999.
- Guo W**, Healey .H, Meyers PA, Ladanyi,M, Huvos AG, Bertino JR, and Gorlick R. "Mechanisms of methotrexate resistance in osteosarcoma". *Clin. Cancer Res.* 5: 621 - 627, 1999.
- Haller DG**. "Trimetrexate: experience with solid tumors". *Semin. Oncol.* 24: 71.-76, 1997.
- Hansen MF**. "Molecular genetic considerations in osteosarcoma". *Clin. Orthop. Relat. Res.* 270: 237 – 246, 1991.
- Hattinger CM**, Reverter-Branchat G, remondini D, Castellani CG, Benini S, Pasello M, Manara MC, Scotlandi K, Picci P and Serra M. "Genomic imbalances associated with methotrexate resistance in human OS cell lines detected by comparative genomic hybridization-based techniques". *Eur. J. Cell Biol.* 82 (9): 483 – 493, 2003.
- Hawkins MM**, draper GJ, Kingston JE, et al. "Incidence of second primary tumours among childhood cancer survivors". *Br. J. Cancer.* 56: 339- 347, 1984.
- Henderson CJ**, Wolf CR, Davis RJ and Ronai Z. "Regulation of JNK signaling by GSTp". *EMBO J.* 18 (5): 1321-1334, 1999.
- Hill DL**, Laster WF Jr, Kirk MC, el-Dareer S and Struck RF. "Metabolism of ifosfamide (2-(2-chloroethylamino)-3-(2-cloroethyl)tetrahydro-2H-1,2,3-oxazaphosphorine-2-oxide) and production of a toxic ifosfamide metabolite". *Cancer Res.* 33: 1016 – 1022, 1973.
- Hjalmarson A** and Waagstein F. "The role of β -blockers in the treatment of cardiomyopathy and ischaemic heart failure". *Drugs.* 47 (4): 31 – 39, 1994.
- Huvos A**. "Bone tumors: diagnosis, treatment and prognosis". 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1991.
- Jamieson ER**, Lippard SJ. "Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts". *Chem Rev.* 99 (9): 2467 – 2498, 1999.
- Jayaraman L**, Moorthy NC, Murthy KG, Manley JL, Bustin M, Prives C. "High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53". *Genes Dev.* 12 (4): 462-472, 1998.
- Juliano RL** and ling V. "A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants". *Biochem. Biophys. Acta.* 455: 152 – 162, 1976.
- Kamen BA**, Eibl B, Cashmore A and Bertino J. Uptake and efficacy of trimetrexate (TMQ, 2,4-diamino-5-methyl-6-[(3,4,5-trimethoxyanilino)methyl] quinazoline), a non-classical antifolate in methotrexate-resistant leukemia cells in vitro". *Biochem. Pharmacol.* 33 (10): 1697 - 1699, 1984.
- Kano Y**, Ohnuma T, Okano T, Holland JF. "Effects of vincristine in combination with methotrexate and other antitumor agents in human acute lymphoblastic leukemia cells in culture". *Cancer Res* 48: 351 - 356, 1988.
- Kelland LR**, Mistry P, Abel G, Loh SY, O'Neill CF, Murrer BA, Harrap KR. "Mechanism-related circumvention of acquired cis-diamminedichloroplatinum(II) resistance using two pairs of human ovarian carcinoma cell lines by ammine/amine platinum(IV) dicarboxylates". *Cancer Res.* 52 (14): 3857-3864, 1992.
- Kelland LR**. "Preclinical perspectives on platinum resistance". *Drugs.* 59 (4) :1 – 8, 2000.

- Kraker J** and Voute PA: “Experience with ifosfamide in paediatric tumors”. *Cancer Chemother Pharmacol.* 24: S28 – S29, 1989.
- Kremer LC**, van Dalen EC, Offringa M, et al. “Frequency and risk factors of anthracycline-induced clinical heart failure in children. A systematic review”. *Ann. Oncol.* 13: 503 – 512, 2002.
- Lacerda JF**, Goker E, Kheradpour A, Dennig D, Elisseyeff Y, Jagiello C, O’reilly RJ and Bertino JR. “Selective treatment of SCIDmice bearing methotrexate-transport-resistant human acute lymphoblastic leukemia tumors with trimetrexate and leucovorin protection”. *Blood.* 85: 2675 – 2678, 1995.
- Lai GM**, Ozols RF, Smyth JF, Young RC, Hamilton TC. “Enhanced DNA repair and resistance to cisplatin in human ovarian cancer”. *Biochem. Pharmacol.* 37 (24): 4597-4600, 1988.
- Leonard GD**, Fojo T and Bates SE. “The role of ABC Transporters in Clinical Practice”. *The Oncologist.* 8: 411 – 424, 2003.
- Li FP**, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA and Miller RW. “A cancer family syndrome in twenty-four kindreds”. *Cancer Res.* 48 (18): 5358 – 5362, 1988.
- Li W**, Fan J, Hochhauser D, Banerje, D, Zielinski Z, Almasan A, Yin Y, Kelly R, Wahl GM and Bertino JR. “Lack of functional retinoblastoma protein mediates increase resistance to antimetabolites in human sarcoma cell lines”. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 10436 - 10440, 1995.
- Lin JT** and Bertino JR. “Trimetrexate: a second generation folate antagonist in clinical trial”. *J. Clin. Oncol.* 5 (12): 2032 - 2040, 1987.
- Lin JT**, Tong W, Trippet TM, Niedzwiecki D, Tao Y, Tan C, Steinherz B., and Bertino JR. “Basis for natural resistance to methotrexate in human acute non-lymphocyte leukemia”. *Leukemia Res.* 15: 1191 - 1196, 1991.
- Lipsultz SE**, Stuart SR, Lipsitz SR, et al. “Female sex and higher drug dose as risk factors for late cardiotoxic effects of doxorubicin therapy for childhood cancer”. *NEJM.* 332 (26): 1738 – 1743, 1995.
- Lonardo F**, Ueda T, Huvos AG, Healey J and Ladanyi M. “p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathologic features and proliferative rate”. *Cancer* 79 (8): 1541 – 1547, 1997.
- Longhi A**, Porcu E, Petracchi S et al. “Reproductive functions in female patients treated with adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for localized osteosarcoma of the extremity”. *Cancer.* 89 (9): 1961 – 1965, 2000.
- Longhi A**, Ferrari S, Ferrari C, et al. “Late side effects of osteosarcoma neoadjuvant chemotherapy: the experience at Rizzoli Institute. In: Proceeding of the Annual Meeting of ASCO 2006, Abstract 9508.
- Lothstein L**, Israel M and Sweatman TW. “Anthracycline drug targeting: cytoplasmic versus nuclear – a fork in the road”. *Drug Resist. Updat.* 4 (3): 169 – 177, 2001.
- Marchini S**, Gonzales Paz O, ripamonti M, geroni C, Bargiotti A, caruso M, Todeschi S, D’incalci M and Brogginini M. “Sequence-specific, DNA interactions by novel alkylating anthracycline derivatives”. *Anticancer Drug Des.* 10: 641 – 653, 1995.
- Marchini S**, Damia G, Brogginini M, Pennella G, Ripamonti M, Marsiglio A, et al. “4-Demethoxy-3'-deamino-3'-aziridinyl-4'-methylsulphonyl-daunorubicin (PNU-159548), a novel anticancer agent active against tumor cell lines with different resistance mechanisms”. *Cancer Res.* 61: 1991 – 1995, 2001.
- Marshall JL** and DeLap RJ. “Clinical pharmacokinetics and pharmacology of trimetrexate”. *Clin. Pharmacokinet.* 26: 190 – 200, 1994.

- McGuire JJ.** “Anticancer Antifolates: Currents Status and Future Directions”. *Curr. Pharmacol. Des.* 9: 2593 – 2613, 2003.
- Meadows AT,** Baum E, Fossati-bellani F, et al. “Second malignant neoplasms in children: an update from Late Effects Study Group”. *J. Clin. Oncol.* 3 (4): 532 – 538, 1985.
- Meyers PA,** Heller G, Healey J et al. “Chemoterapy for non metastatic osteogenic sarcoma: the MSKCC experience”. *J. Clin. Oncol.* 10: 5 – 15, 1992.
- Miller CW,** Aslo A, Tsay C, Slamon D, Ishizaki K, Toguchida J, Yamamuro T, Lampkin B and Koeffler HP. “Frequency and structure of p53 rearrangements in human osteosarcoma”. *Cancer Res.* 50 (24): 7950 – 7954, 1990.
- Minotti G,** Menna P, Salvatorelli E, Cairo G and Gianni L. “Anthracycline: molecular Advances and Pharmacologic developments in Antitumor Activity and cardiotoxicity”. *Pharm. Rev.* 56 (2): 185 – 229, 2004.
- Misiura K.** “Ifosfamide. Metabolic Studies, New Therapeutic Approaches and New Analogs”. *Med. Chem.* 6: 396 – 400, 2006.
- Moneta D,** Geroni C, Valota O, Grossi P, De Jonge MJ, Brughera M, et al. “Predicting the maximum-tolerated dose of PNU-159548 (4-demethoxy-3'-deamino-3'-aziridinyl-4'-methylsulphonyl-daunorubicin) in humans using CFU-GM clonogenic assays and prospective validation”. *Eur. J. Cancer.* 39 : 675 - 683, 2003.
- Morgan LR,** Harrison EF, Hawake JE, Hunter HL, Costanzi JJ, Plotkin D, Tucker WG and Worrall PM. “Toxicity of single vs fractioned dose ifosfamide in non-small cell lung cancer. A multi-center study”. *Semin. Oncol.* 9 (1): 66 – 70, 1982.
- Muller M,** Meijer C, Zaman GJ, Borst P, Scheper RJ, Mulder NH, de Vries EG, Jansen PL. “Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 91 (26): 13033 - 13037, 1994.
- Nagourney RA,** Messenger JC, Kern DH and Weisenthal LM. “Enhancement of anthracycline and alkylator cytotoxicity by ethacrynic acid in primary cultures of human tissues”. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 26: 318 – 322, 1990.
- Nitiss JL.** “A copper connection to the uptake of platinum anticancer drugs”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99 (22): 13963-13965, 2002.
- Norpoth K.** “Studies on the metabolism of ifosfamide (NSC-109724) in man”. *Cancer Treat. Rep.* 60: 437 – 443, 1976.
- Offinger KC** and Hudson MM. “Long term complications following childhood and adolescent cancer: foundations for providing Risk-based health care for survivors”. *J. Clin. Cancer.* 54: 208 – 236, 2004.
- Ono K** and Han J. “The p38 signal transduction pathway: activation and function”. *Cell Signal.* 12 (1): 1 – 13, 2000.
- Pakos EE** and Ioannidis JP. “The association of P-glycoprotein with response to chemotherapy and clinical outcome in patients with osteosarcoma. A meta-analysis”. *Cancer.* 98: 581 – 589, 2003.
- Perego P,** Corna E, De Cesare M, Gatti L, Polizzi D, Pratesi G, Supino R and Zunino F. “Role of apoptosis and apoptosis-related genes in cellular response and antitumor efficacy of anthracycline”. *Curr. Med. Chem.* 8: 31 – 37, 2001.

- Picci P**, Bacci G, Rosito P, et al. "The importance of chemotherapy-induced necrosis as prognostic factor in localized Ewing's sarcoma (ES) of the extremities". *Med. Ped. Oncol.* 27: 255 - 260, 1996.
- Pinkerton CR**, Rogers H, James C, Bowman A, Barbor PR, Eden OB and Pritchard J. "A phase II study of ifosfamide in children with recurrent solid tumours". *Cancer Chemoter. Pharmacol.* 15: 258 – 262, 1985.
- Ploemen JH**, van Ommen B and van Bladeren PJ. "Inhibition of rat and human glutathione S-transferase isoenzymes by ethacrynic acid and its glutathione conjugate". *Biochem. Pharmacol.* 40: 1631 – 1635, 1990.
- Potapova O**, Haghghi A, Bost F, Liu C, Birrer MJ, Gjerset R, Mercola D. "The Jun kinase/stress-activated protein kinase pathway functions to regulate DNA repair and inhibition of the pathway sensitizes tumor cells to cisplatin". *J. Biol. Chem.* 272 (22): 14041 - 14044, 1997.
- Priebe W**, Van NT, Burke TG and Perez-Soler R. "Removal of the basic center from doxorubicin partially overcomes multidrug resistance and decreases cardiotoxicity". *Anticancer Drugs.* 4: 37 – 48, 1993.
- Reedijk J**. "Why does Cisplatin reach Guanine-n7 with competing s-donor ligands available in the cell?". *Chem Rev.* 99(9): 2499-2510, 1999.
- Ricci G**, De Maria F, Antonini G, Turella P, Bullo A, Stella L, Filomeni G, Federici G and Caccuri AM, "7-Nitro-2,1,3-benzoxadiazole derivatives, a New Class of Suicide Inhibitors for Glutathione S-Transferase". *J. Biol. Chem.* 280 (28): 26397 – 26405, 2005.
- Rosemburg SA**, Chabner BA and Young RC. "Treatment of osteogenic sarcoma. Effect of adjuvant high-dose Methotrexate after amputation". *Cancer Treat. Rep.* 63: 739 – 751, 1979.
- Rosen G**, Caparros B, Huvos AG, Kosloff C, Nirenberg A, Cacavio A, et al. "Preoperative chemotherapy for osteogenic sarcoma: selection of postoperative adjuvant chemotherapy based on the response of the primary tumour to preoperative chemotherapy". *Cancer.* 49 (6): 1221 – 1230, 1982.
- Rosenberg B**, VanCamp L, Trosko JE, Mansour VH. "Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents". *Nature.* 222(5191): 385 – 386, 1969.
- Sæter G**, Bruland OS, Folleras G et al. "Extremity and non-extremity high-grade osteosarcoma. The Norwegian Radium Hospital experience during the modern chemotherapy era". *Acta Oncol.* 35 (8): 129 – 134, 1996.
- Safaei R**, Holzer AK, Katano K, Samimi G, Howell SB. "The role of copper transporters in the development of resistance to Pt drugs". *J. Inorg. Biochem.* 98 (10): 1607-1613, 2004.
- Schultz M**, Dutta S and Tew KD. "Inhibitors of glutathione S-transferase as therapeutic agents". *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26: 91 – 104, 1997.
- Scotlandi K**, Serra M, Manara MC, Lollini PL, Maurici D, Del Bufalo D, et al. "Pre-treatment of human osteosarcoma cells with N-methylformamide enhances P-glycoprotein expression and resistance to doxorubicin". *Int. J. Cancer.* 58: 95 - 101, 1994.
- Serra M**, Scotlandi K, Manara MC, Maurici D, Lollini PL, De Giovanni C, et al. "Establishment and characterization of multidrug-resistant human osteosarcoma cell lines". *Anticancer Res.* 13: 323 - 329, 1993.
- Serra M**, Scotlandi K, Reverter-Branchat G, Ferrari S, manara MC, Benini S, Incaprera M, Bertoni F, Mercuri M, Briccoli A, Bacci G and Picci P. "Value of P-glycoprotein and clinicopathologic factors as the basis for new treatment strategies in high-grade osteosarcoma of the extremities". *J. Clin. Oncol.* 21 (3): 536 – 542, 2003.

Serra M, Reverter-Branchat G, Maurici d, Benini S, Shen JN, Chano T, Hattinger CM, Manara MC, Pasello M, Scotlandi K and Picci P. "Analysis of dihydrofolate reductase and reduced folate carrier gene status in relation to methotrexate resistance in OS cells". *Ann. Oncol.* 15 (1): 151 – 160, 2004.

Serra M, Pasello M, Manara MC, Scotlandi K, Ferrari S, Bertoni F, Mercuri M, Alvegard TA, Picci P, Bacci G and Smeland S. "May P-glycoprotein status be used to stratify high-grade osteosarcoma patients? Results from the Italian/Scandinavian Sarcoma Group 1 treatment protocol". *Int. J. Oncol.* 29 (6): 1459 – 1468, 2006.

Shoieb AM, Hahn KA, Van Laack RL and Barnhill MA. "In vitro reversal of glutathione-S-transferase-mediated resistance in canine osteosarcoma (COS31) cells". *In Vivo.* 12 (5): 455 – 462, 1998.

Siddik ZH. "Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance". *Oncogene.* 22: 7265 – 7279, 2003.

Singal PK and Iliskovic N. "Adriamycin cardiomyopathy". *N. Engl. J. Med.* 339: 900 – 905, 1998.

Smith MA, Ungerleider RS, Horowitz ME and Simon R. "Influence of doxorubicin dose intensity on response and outcome for patients with osteogenic sarcoma and Ewing's sarcoma". *J. Natl. Cancer Inst.* 83: 1460 – 1470, 1991.

Steinherz LJ, Steinherz PG, Tan CTC, Heller G and Murphy L. "Cardiac toxicity 4 to 20 years after completing anthracycline therapy". *J. Am. Med. Ass.* 266: 1672 – 1677, 1991.

Su F, Hu X, Jia W, Gong C, Song E and Hamar P. "Glutathione S transferase pi indicates chemotherapy resistance in breast cancer". *J. Surg. Res.* 113 (1): 102 – 108, 2003.

Suarato A, Angelucci F and Geroni C. "Ring-B modified anthracycline". *Curr. Pharm. Des.* 5: 217 – 227, 1999.

Takimoto CH. "New Antifolates: Pharmacology and Clinical Applications". *The Oncologist.* 1: 68 – 81, 1996.

Taylor WF, Ivins JC, Pritchard DJ et al. "Trends and variability in survival among patients with osteosarcoma: a 7-year update". *Mayo clin. Proc.* 60: 91 – 104, 1985.

Tew KD. "Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance". *Cancer Res.* Aug 54 (16): 4313-4320, 1994.

Tew KD, Dutta S, Schultz M. "Inhibitors of glutathione S-transferases as therapeutic agents". *Adv. Drug Deliv. Rev.* 26 (2-3): 91 – 104, 1997.

Thomas X, Le QH and fiere D. "Anthracycline-related toxicity requiring cardiac transplantation in long-term disease-free survivors with acute promyelocytic leukaemia". *Ann. Hematol.* 81: 504 – 507, 2002.

Toguchida J, Yamaguchi T, Ritchie B, Beauchamp RL, Dayton SH, Herrera GE, Yamamuro T, Kotoura Y, Sasaki MS, Little JB, et al. "Mutation spectrum of the p53 gene in bone and soft tissue sarcomas". *Cancer Res.* 52 (22): 6194 – 6199, 1992.

Townsend DM and Tew KD. "The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance". *Oncogene.* 22: 7369 – 7375, 2003.

Turella P, Cerella C, Filomeni G, Bullo A, De Maria f, Ghibelli L, Ciriolo MR, Cianfriglia M, Mattei M, Federici G, Ricci G and Caccuri AM. "Proapoptotic activity of new glutathione S-transferase inhibitors". *Cancer Res.* 65 (9): 3751 – 3761, 2005.

Ueda K, Clark DP, Chen CJ et al. "The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation". *J. Biol. Chem.* 262: 505 – 508, 1987.

Uozaki H, Horiuchi H, ishida T, Lijima T, Imamura T and Machinami R. "Overexpression of resistance-related proteins (metallothioneins, glutathione-S-transferase π , heat shock protein 27, and lung resistance-related protein) in osteosarcoma". *Cancer*. 79: 2336 – 2344, 1997.

van Kalken CK et al. "Multidrug resistance gene (P-glycoprotein) expression in the human fetus". *Am. J. Pathol.* 141: 1063 – 1072, 1992.

Verdeguer A, Castel V, Esquembre C, Ferris J, Fernandez JM, Ruiz JG. "Fatal encephalopathy with ifosfamide-mesna". *Pediatr. Hematol. Oncol.* 6: 383 – 385, 1989.

Wadayama B, Toguchida J, Shimizu T, Ishizaki K, Sasaki MS, Kotoura Y and Yamamuro T. "Mutation spectrum of the retinoblastoma gene in osteosarcomas". *Cancer Res.* 54 (11): 3042 – 3048, 1994.

Wang X, Martindale JL, Holbrook NJ. "Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis". *J. Biol. Chem.* 275 (50): 39435-39443, 2000.

Weiss RB. "The anthracycline: will we ever find a better doxorubicin?". *Sem. Oncol.* 19: 670 – 686, 1992.

Yang R, Sowers R, Mazza B, Healey JH, Huvos A, Grier H, Bernstein M, Beardsley GP, Krailo MD, Devodas M, Bertino JR, Meyers PA and Gorlick R. "Sequence alterations in the reduced folate carrier are observed in osteosarcoma tumor sample". *Clin. Cancer Res.* 9: 837 – 844, 2003.

Yin Z, Ivanov VN, Habelhah H, Tew K, Ronai Z. "Glutathione S-transferase p elicits protection against H₂O₂-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases". *Cancer Res.* 60 (15): 4053 – 4057, 2000.

Zaman GJ, Cnubben NH, van Bladeren PJ, Evers R, Borst P. "Transport of the glutathione conjugate of ethacrynic acid by the human multidrug resistance protein MRP". *FEBS Lett.* 391 (1-2): 126 – 130, 1996.

Zhao R and Goldman ID. "Resistance to antifolates". *Oncogene.* 22: 7431 – 7457, 2003.

Zunino F, Pratesi G and Perego P. "Role of the sugar moiety in the pharmacological activity of anthacyclines: development of a novel series of disaccharide analogs". *Biochem. Pharmacol.* 61: 933 – 938, 2001.

Figure

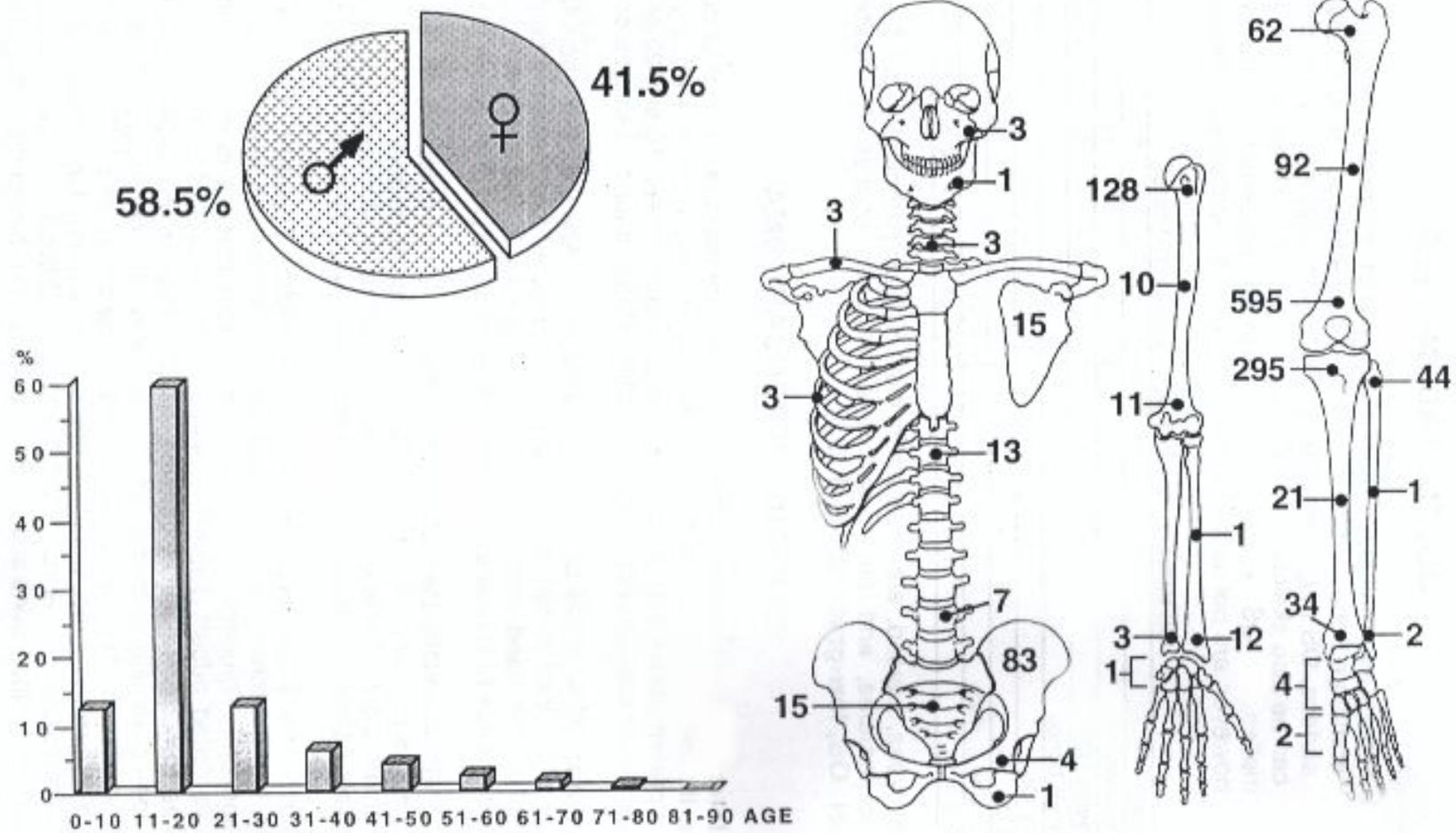
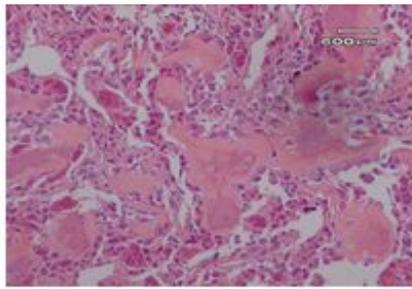
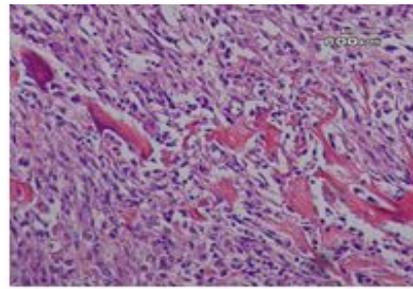


Figura 1: Osteosarcoma classico.

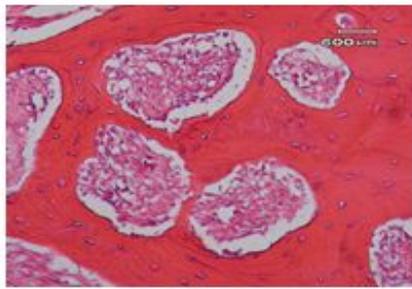
Sesso, età e localizzazione in 1469 casi di osteosarcoma (Tratta da Campanacci M, 1999).



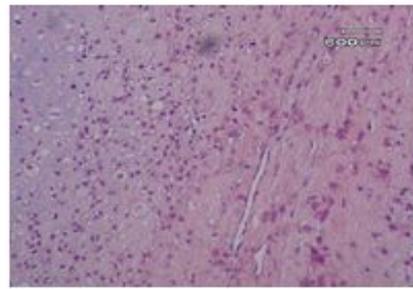
A. Osteosarcoma osteoblastico



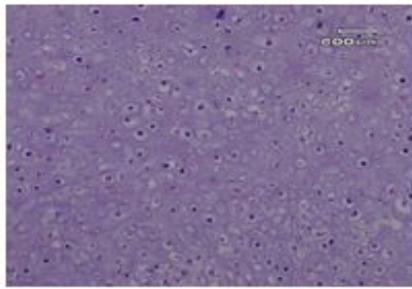
B. Osteosarcoma fibroblastico



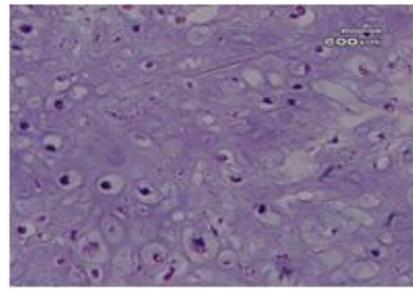
C. Osteosarcoma parostale



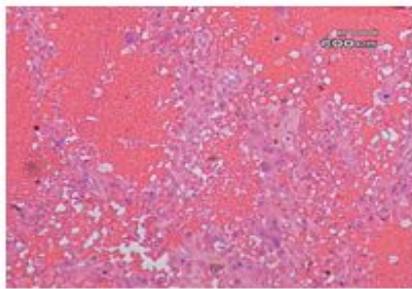
D. Osteosarcoma periosteal



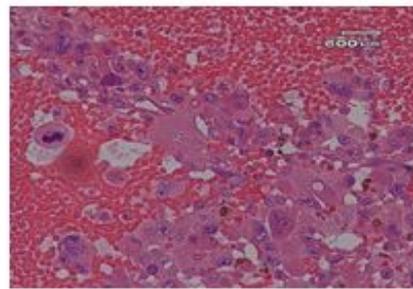
E. Osteosarcoma condroblastico



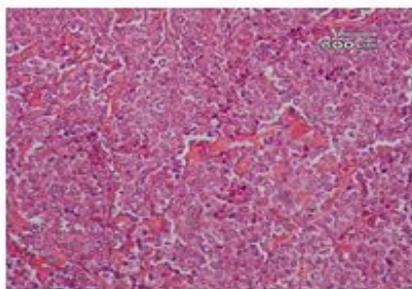
EI. Osteosarcoma condroblastico



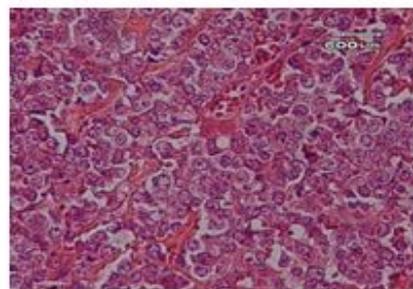
F. Osteosarcoma teleangectasico



FI. Osteosarcoma teleangectasico



G. Osteosarcoma a piccole cellule



GI. Osteosarcoma a piccole cellule

Figura 2: Sottotipi istologici di osteosarcoma ad alto grado.

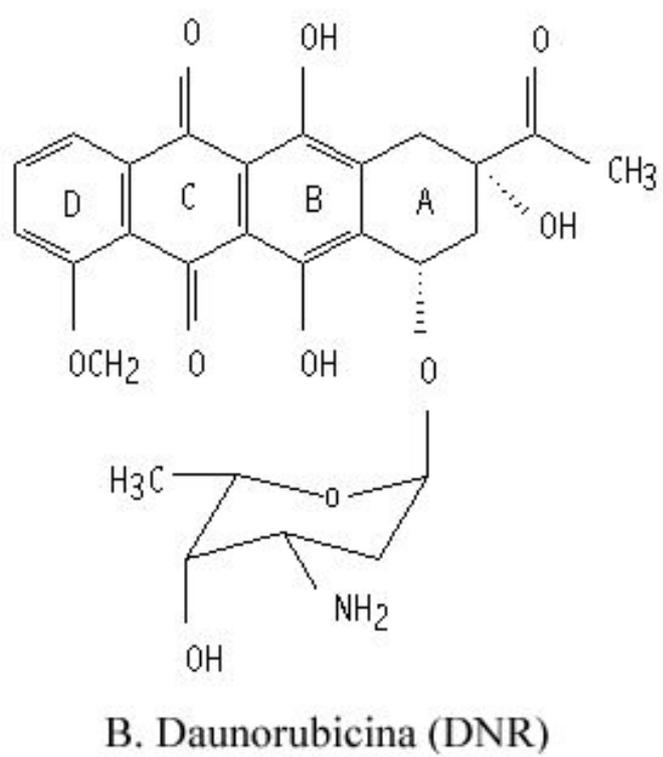
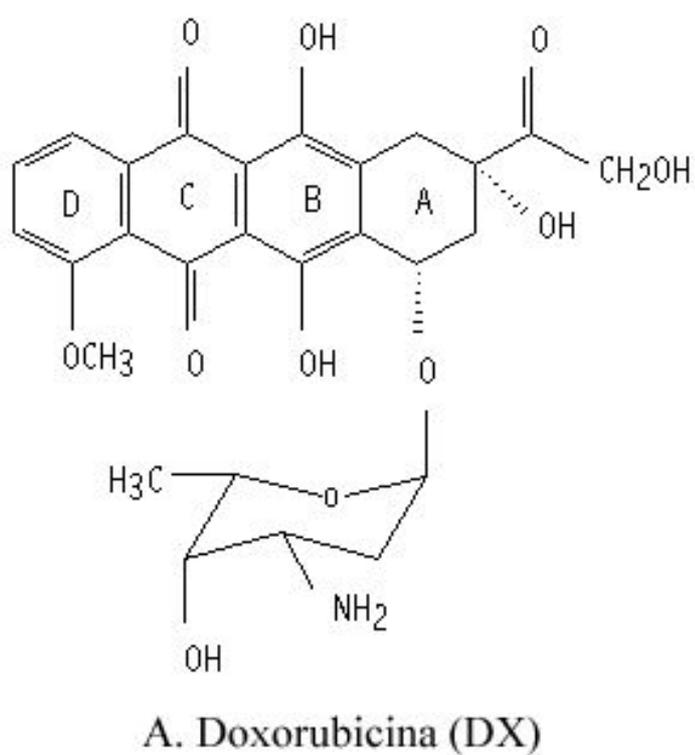


Figura 3: Struttura molecolare della doxorubicina e della daunorubicina.

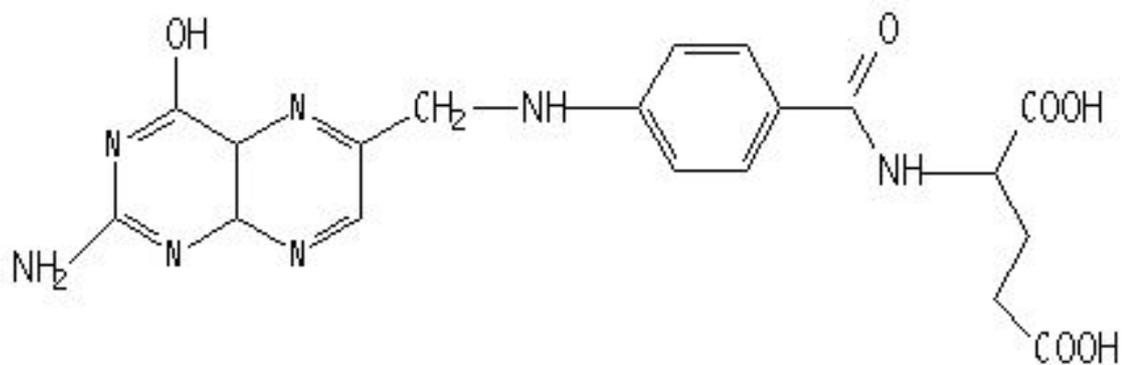
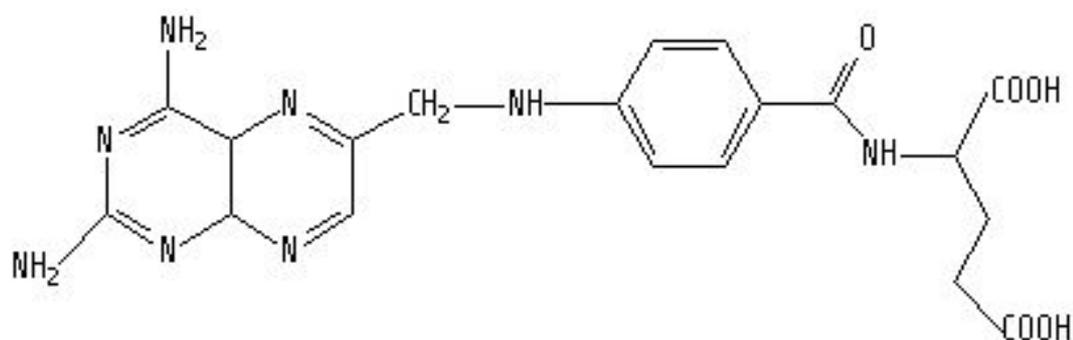
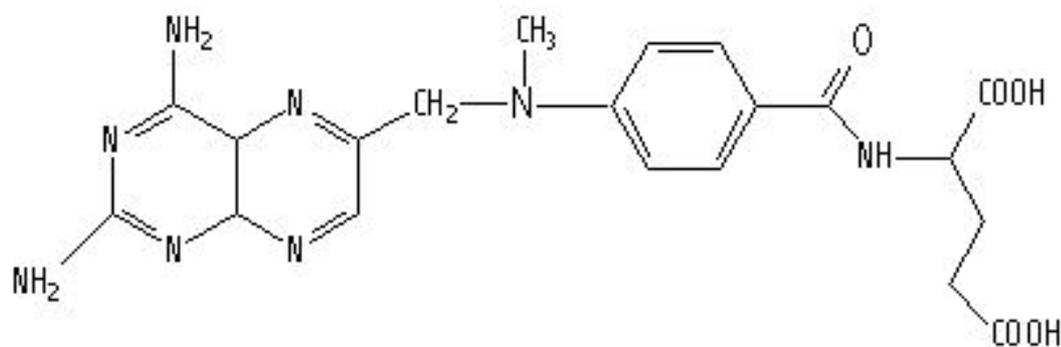
**A. Acido Folico****B. Aminopterina****C. Methotrexate**

Figura 4: Struttura molecolare dell'acido folico e degli antifolati aminopterina e methotrexate.

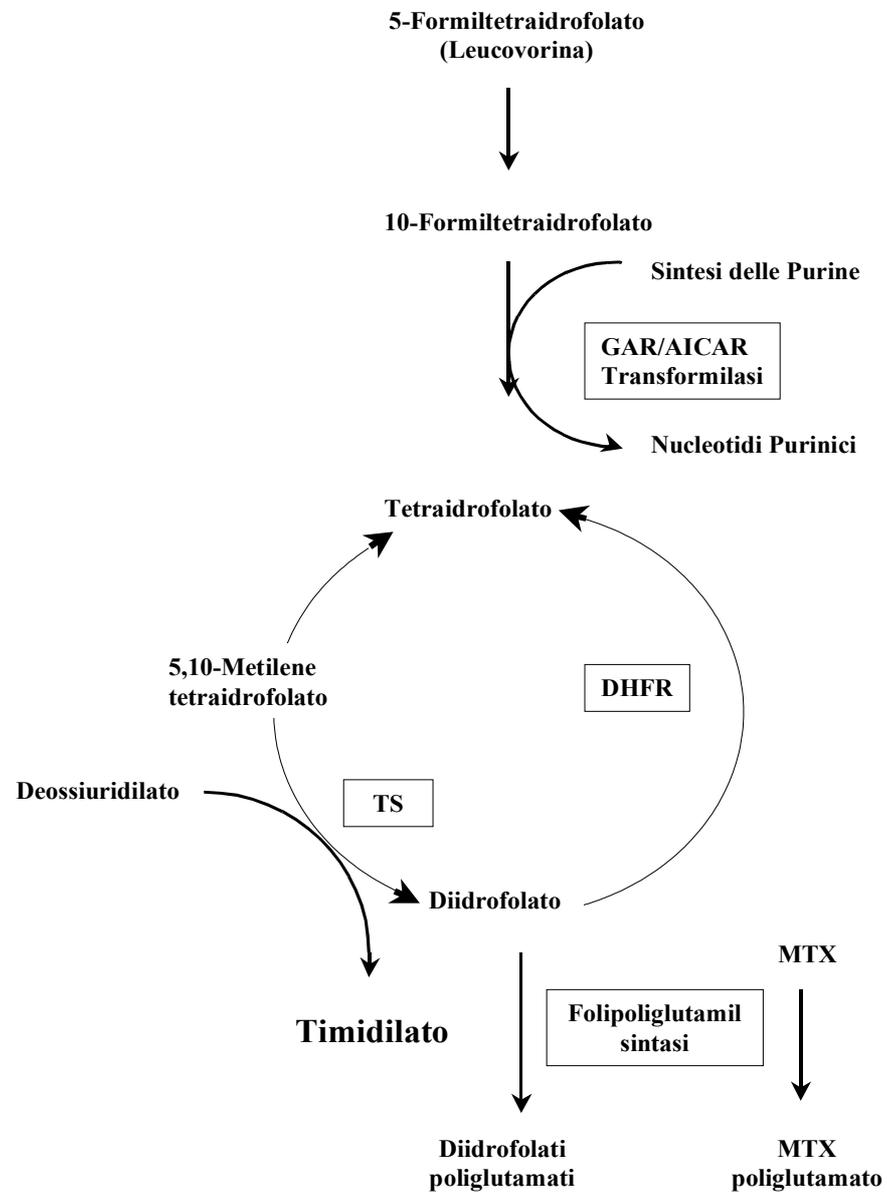


Figura 5: Reazioni enzimatiche del metabolismo dei folati.

GAR: glicinamide ribonucleotide; AICAR: aminoimidazolo carbossamide ribonucleotide;
 DHFR: diidrofolato reduttasi; TS: timidilato sintasi; MTX: methotrexate

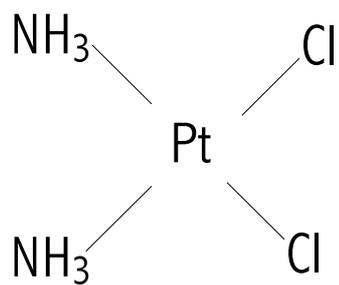
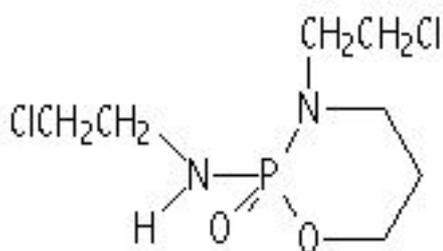
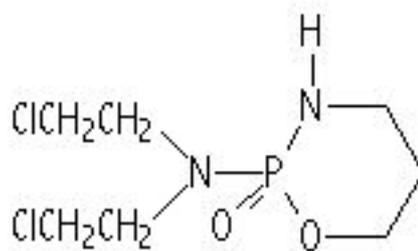


Figura 6: Struttura molecolare del cisplatino.



A. Ifosfamide



B. Ciclofosfamide

Figura 7: Struttura molecolare dell'ifosfamide e della ciclofosfamide.

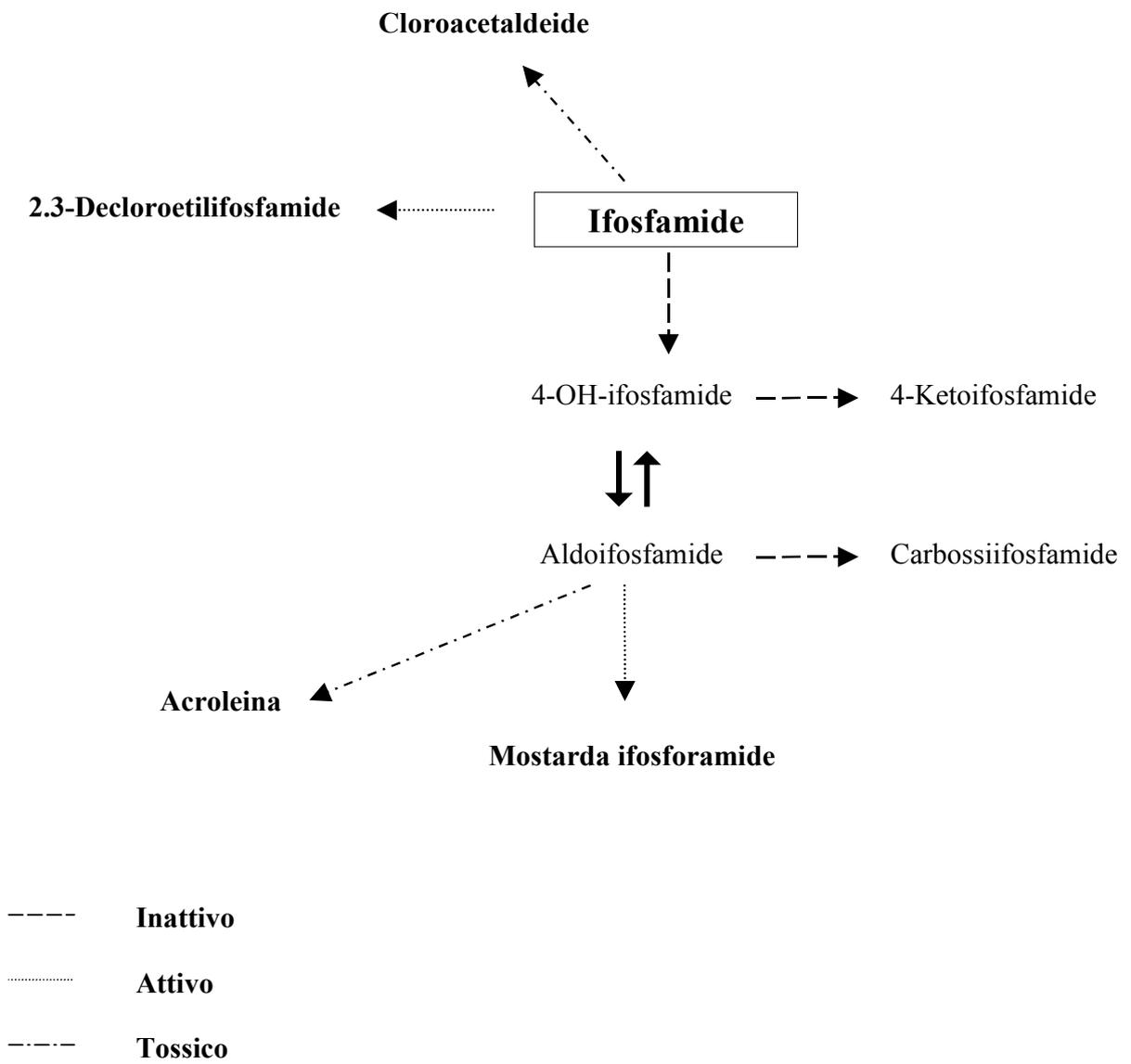


Figura 8: Principale via metabolica dell'ifosfamide.

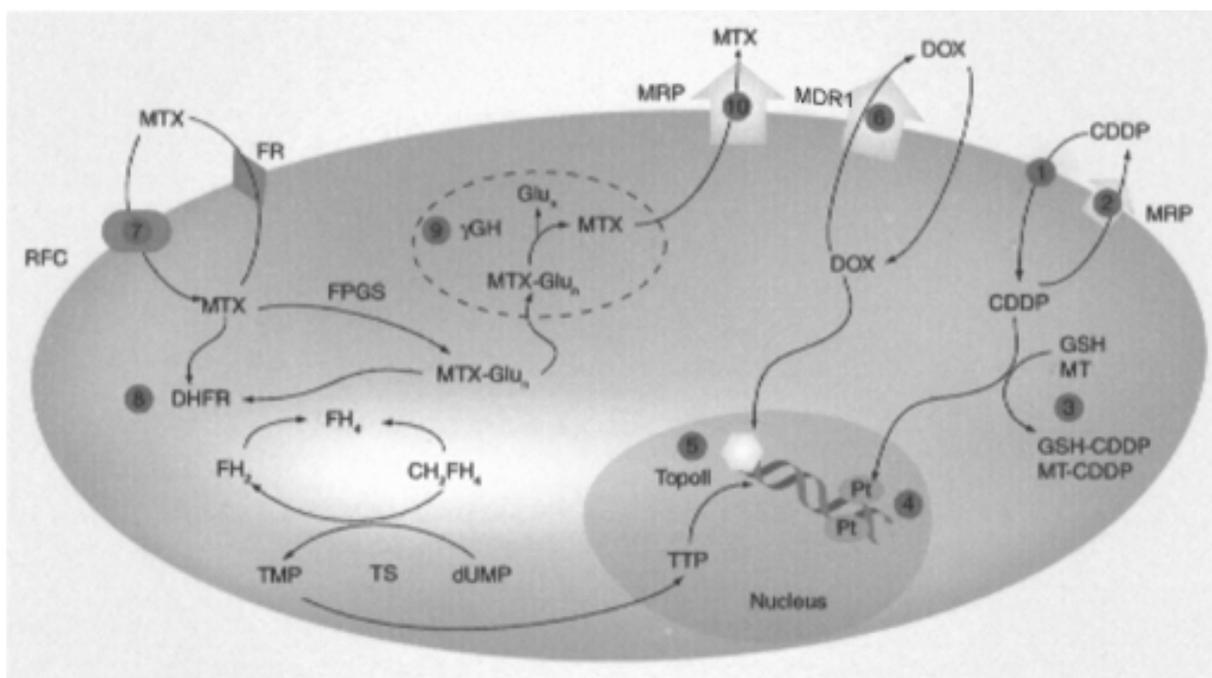


Figura 9: Meccanismi di resistenza.

Meccanismi di resistenza del cisplatino (CDDP): 1: decremento dell'accumulo intracellulare di CDDP; 2: aumento dell'efflusso del CDDP attraverso MRP; 3: inattivazione da parte di composti contenenti tioli; 4: aumento dei meccanismi di riparazione del DNA.

Meccanismi di resistenza della doxorubicina (DOX): 5: mutazioni della topoisomerasi II; 6: aumento dell'efflusso attraverso MDR1 (P-glicoproteina).

Meccanismi di resistenza del methotrexate (MTX): 7: decremento dell'espressione di RFC; 8: aumento dell'espressione della DHFR; 9: aumento dell'attività della γ GH; 10: aumento dell'efflusso attraverso MRP.

DHFR: diidrofolato reduttasi; dUMP: deossiuridina monofosfato; FPGS: folipoliglutammato sintetasi; FR: recettore del folato; γ GH: γ -glutamil idrolasi; Glun: glutammati; GSH: glutatione; MRP: proteine della multifarmaco-resistenza; MT: metallotioneina; MTX-Glun: methotrexate poliglutammato; RFC: trasportatore ridotto dei folati; TMP: timidina monofosfato; Topo II: topoisomerasi II; TTP: timidina trifosfato (*Tratta da Chou AJ, 2006*).

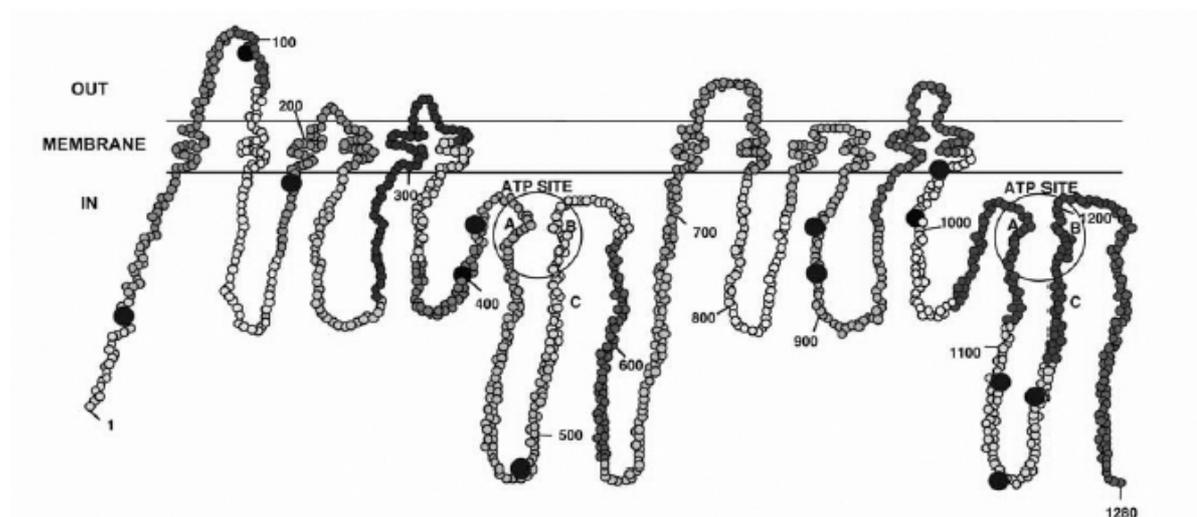
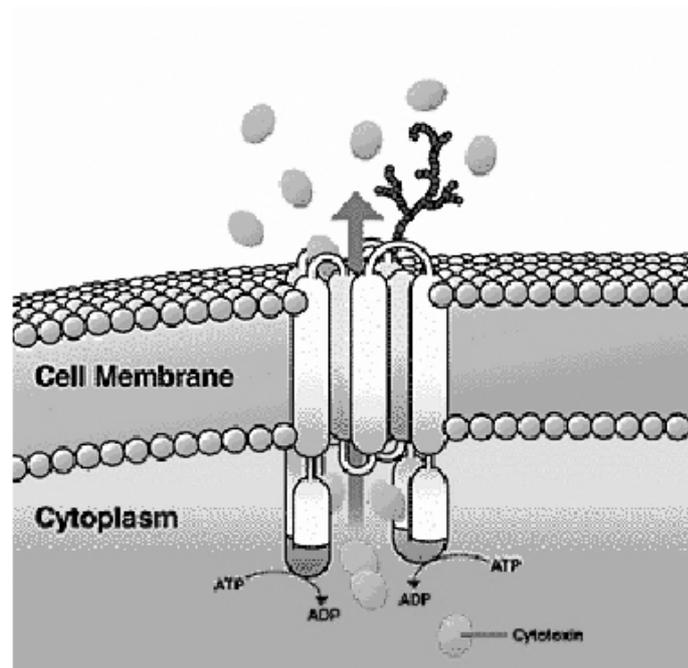


Figura 10: Rappresentazione schematica della P-glicoproteina.

La P-glicoproteina è una pompa organica cationica di efflusso ATP-dipendente, con 12 domini transmembrana idrofobici che contengono 2 siti catalitici per l'ATP.

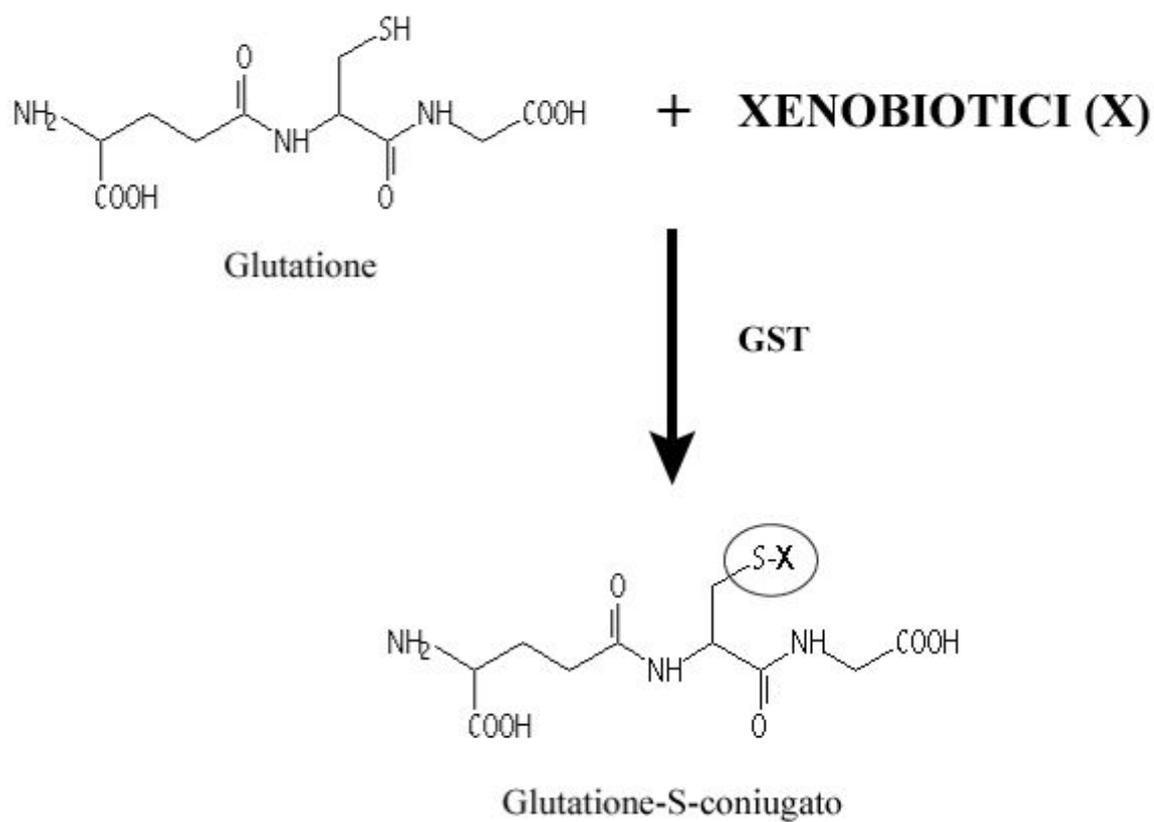
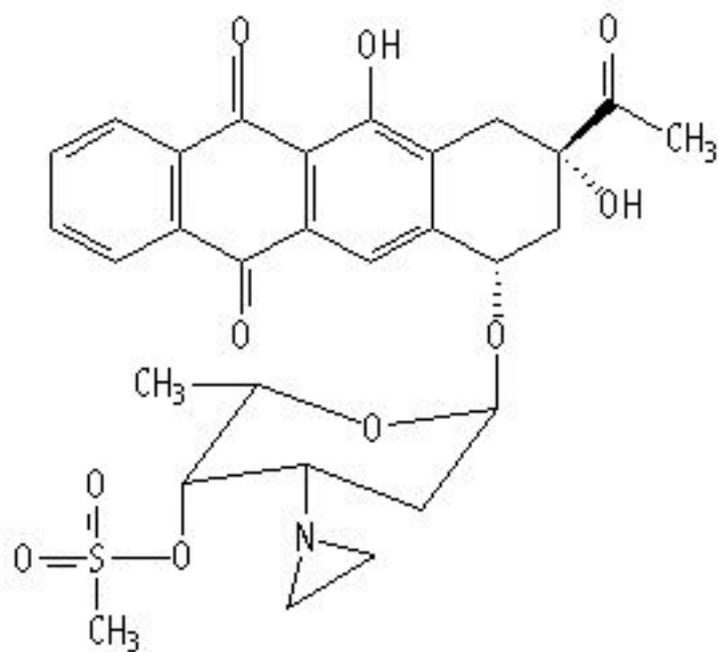
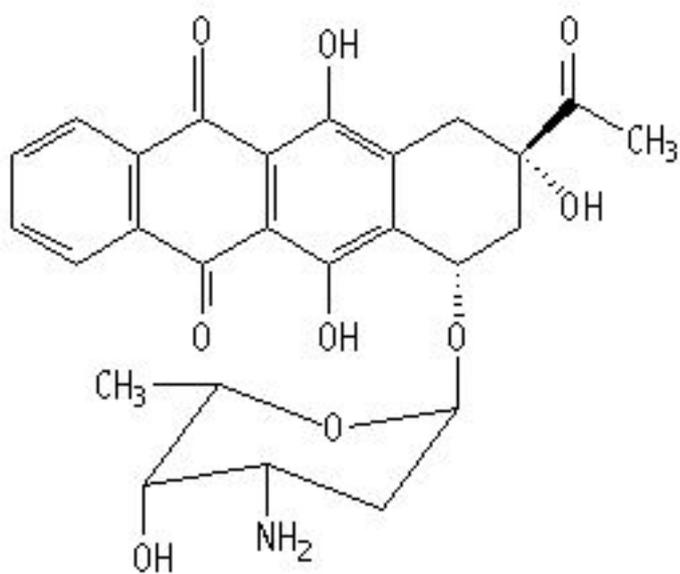


Figura 11: Meccanismo di detossificazione del glutathione.

La coniugazione del glutathione ad un generico xenobiotico (X) per mezzo del glutathione-S-transferasi (GST) porta alla formazione di glutathione-S-coniugati.



A. PNU-159548



B. Idarubicina

Figura 12: Struttura molecolare del PNU-159548 e della antraciclina Idarubicina.

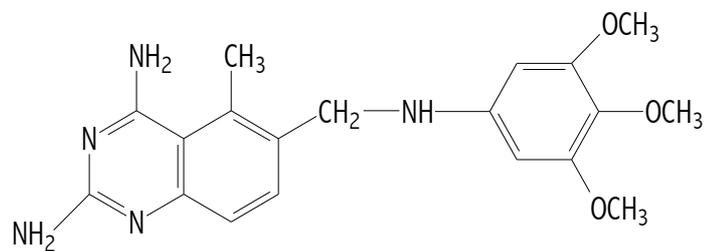


Figura 13: Struttura molecolare del Trimetrexate.

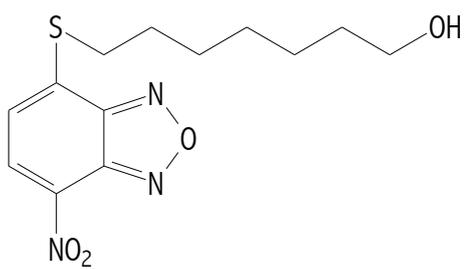


Figura 14: Struttura molecolare di NBDHEX.

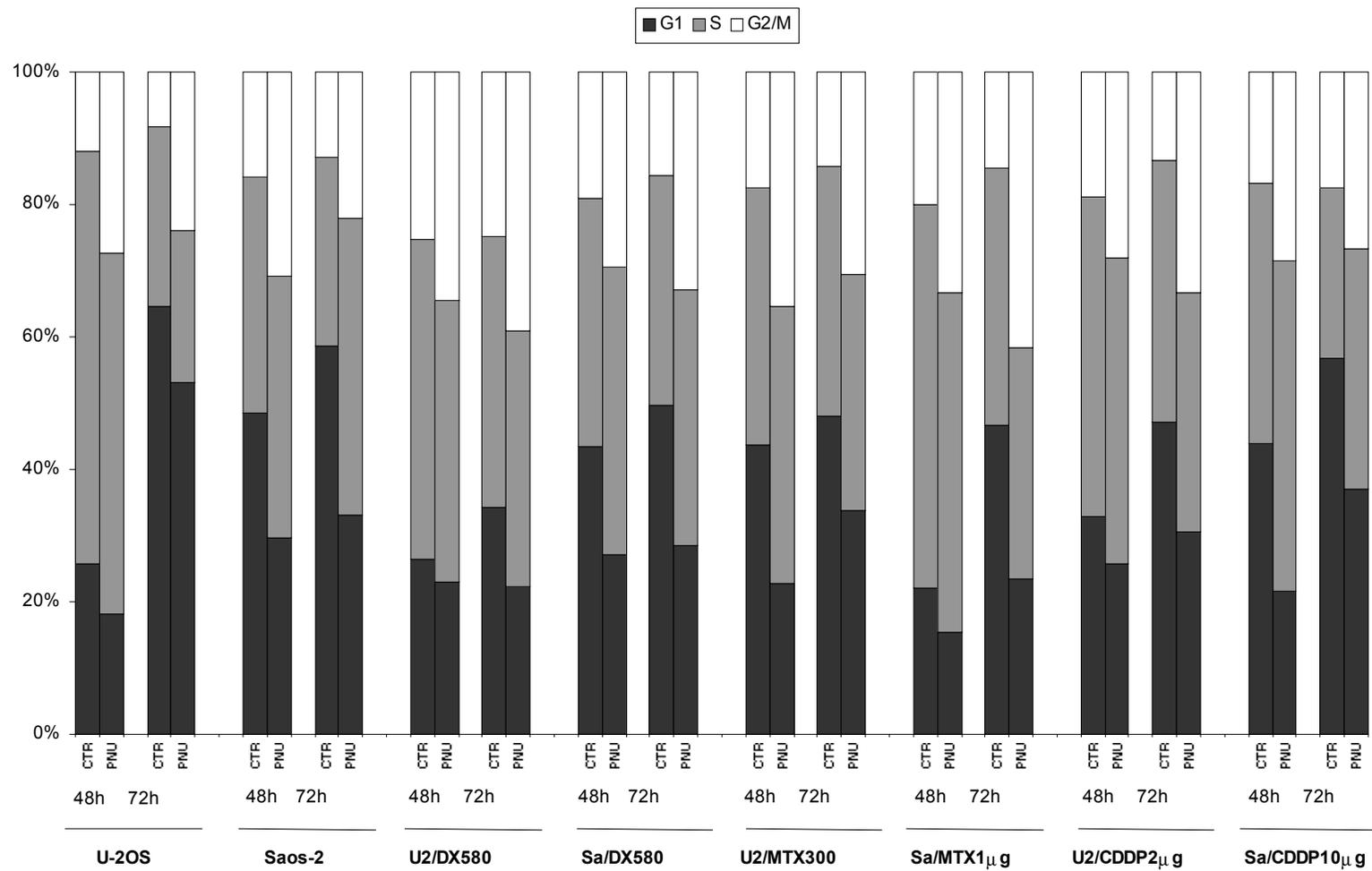


Figura 15: Effetti sulle fasi del ciclo cellulare del PNU-159548 nelle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti resistenti.

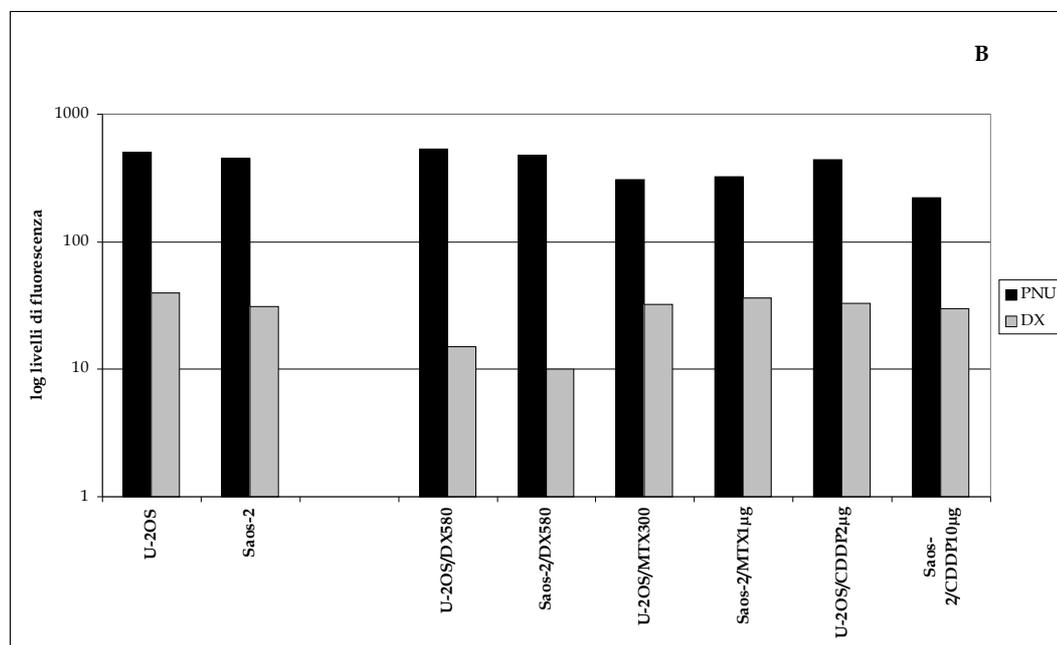
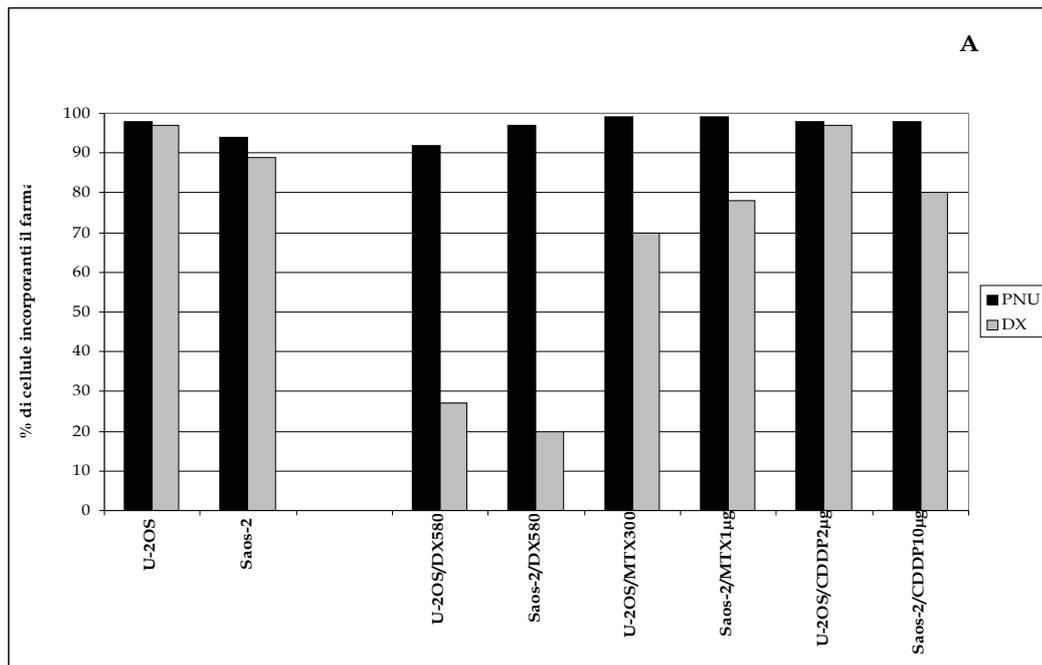


Figura 16: Incorporazione di Doxorubicina e PNU-159548 in linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti resistenti.

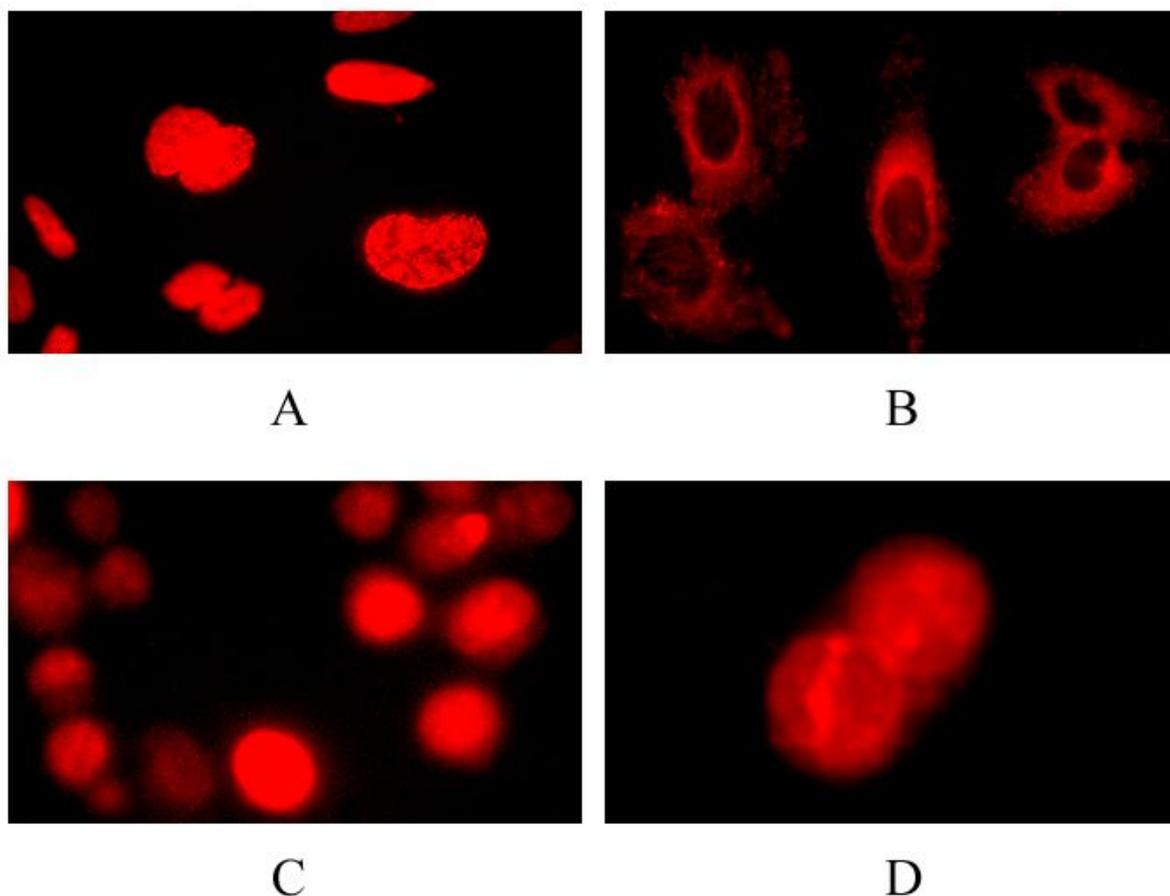


Figura 17: Modalità di incorporazione intracellulare di Doxorubicina (DX) e PNU-159548 in linee cellulari di osteosarcoma farmaco-sensibili e DX-resistenti.

Le figure A e C mostrano, rispettivamente, l'incorporazione della DX e del PNU-159548 nella linea cellulare U-2OS. Le figure B e D mostrano, rispettivamente, l'incorporazione della DX e del PNU-159548 nella linea cellulare U2/DX580. Ingrandimento delle figure A, B e C è 400X, l'ingrandimento della figura D è 1000X.

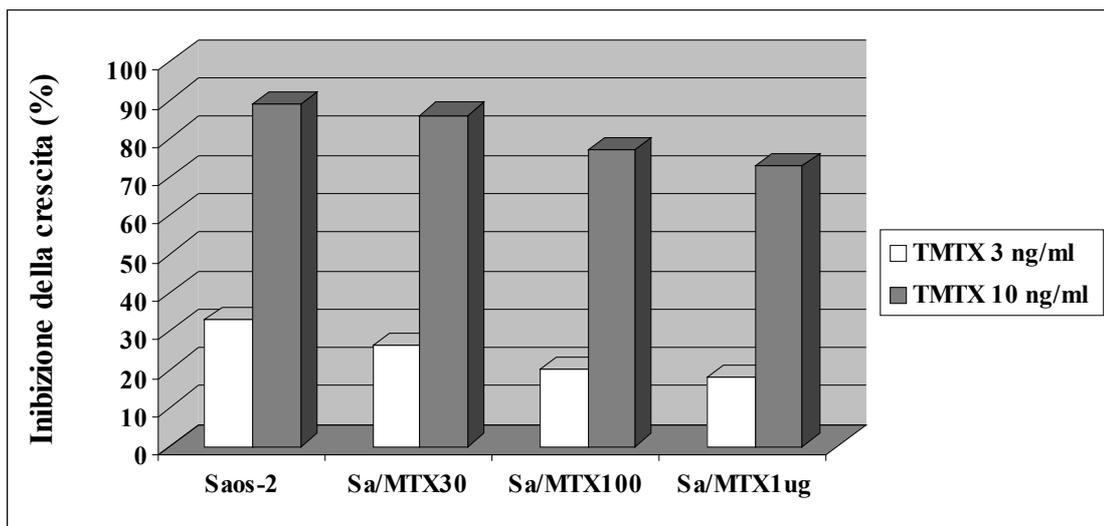
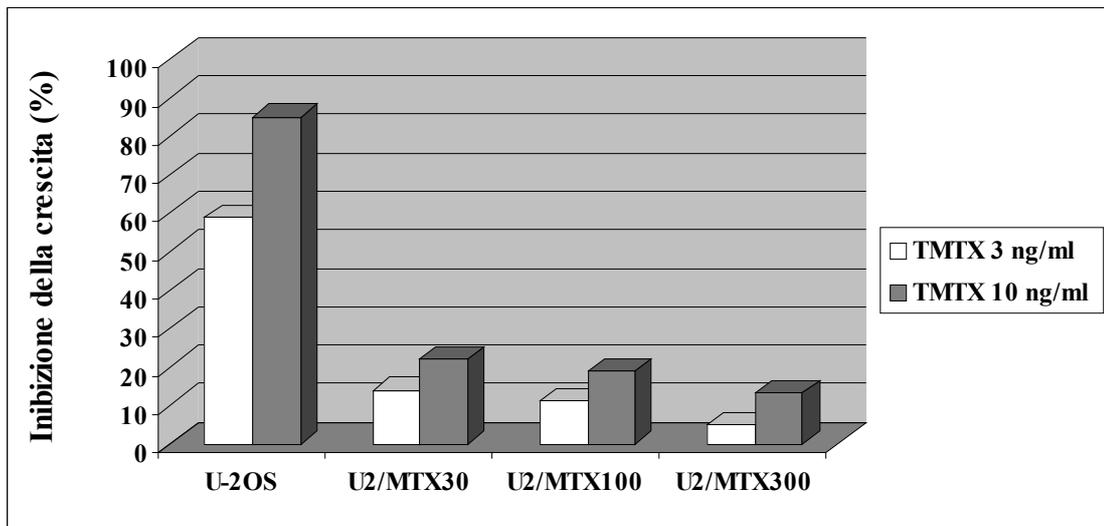


Figura 18: Sensibilità in vitro al Trimetrexate (TMTX) delle varianti MTX-resistenti che derivano dalle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2.

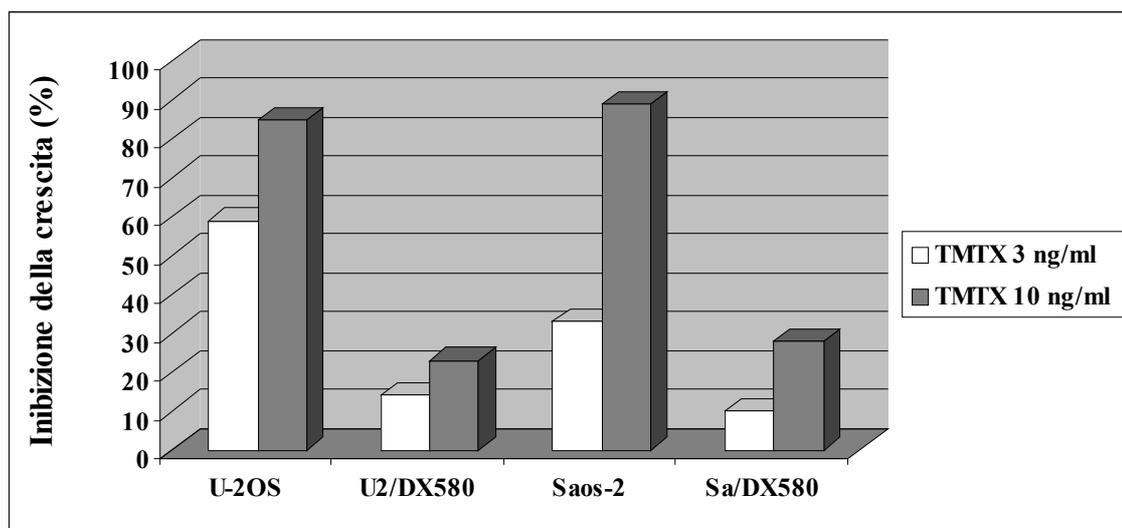


Figura 19: Sensibilità in vitro al Trimetrexate (TMTX) delle varianti DX-resistenti che derivano dalle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2.

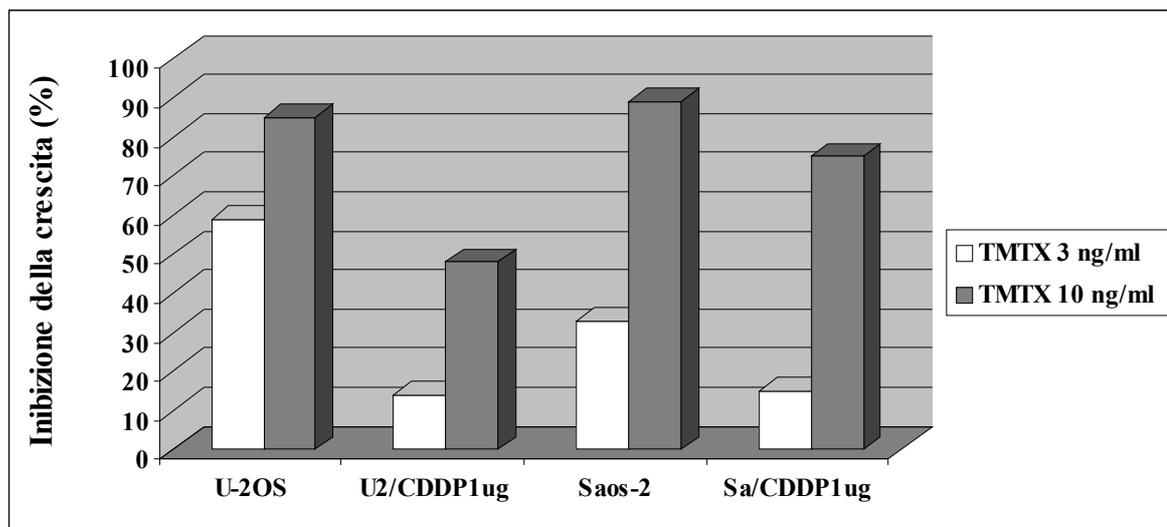


Figura 20: Sensibilità in vitro al Trimetrexate (TMTX) delle varianti CDDP-resistenti che derivano dalle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2.

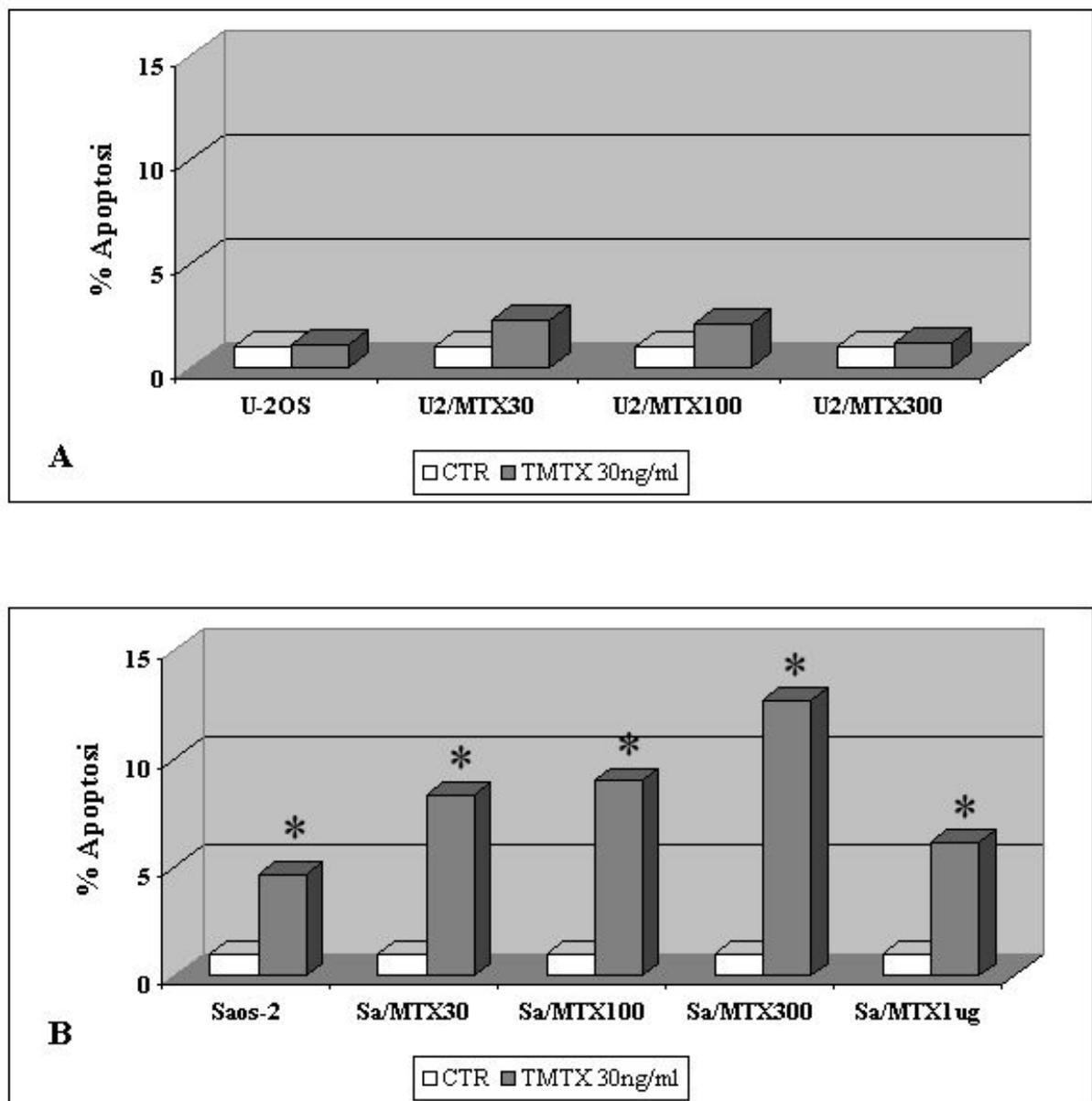


Figura 21: Effetti del Trimetrexate (TMTX) sull'apoptosi in linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti MTX-resistenti.

La differenza tra le medie è stata calcolata mediante il test statistico del t-Student.

* $p < 0,05$.

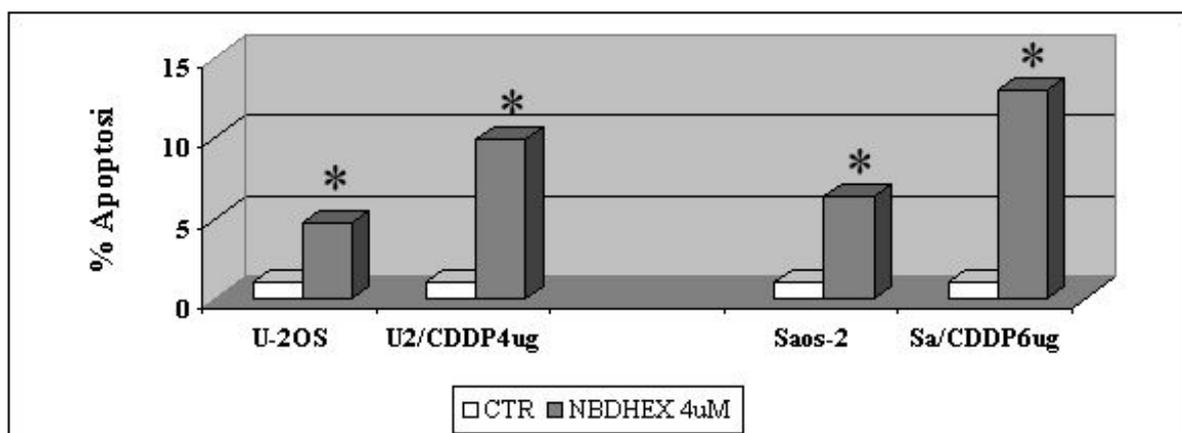


Figura 22: Effetti di NBDHEX sull'apoptosi in linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2 e nelle loro varianti CDDP-resistenti.

La differenza tra le medie è stata calcolata mediante il test statistico del t-Student.

* $p < 0,05$.

Tabelle

Tabella 1: Protocolli di chemioterapia neoadjuvante eseguiti agli Istituti Ortopedici Rizzoli dal 1983 al 2000.

Protocollo	Periodo	Chemioterapia pre-operatoria	Chemioterapia post-operatoria	
			Necrosi $\geq 90\%$	Necrosi $< 90\%$
IOR/OS1	3/1983 – 8/1986	MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP, BCD
IOR/OS2	9/1986 – 12/1989	DX, MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP, VP16, IFO
IOR/OS3a	1/1990 – 8/1991	DX, MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP, IFO
IOR/OS3b	9/1991 – 12/1992	DX, MTX, CDDP	DX, MTX, CDDP, IFO	
IOR/OS5	1/1993 – 6/1995	DX, MTX, CDDP, IFO	DX, MTX, CDDP, IFO	DX, MTX, CDDP, IFO (più cicli con IFO)
ISG/SSG1	3/1997 – 9/2000	DX, MTX, CDDP, IFO	DX, MTX, CDDP, IFO	DX, MTX, CDDP, IFO (nei poor responders con necrosi $< 99\%$: più cicli con CDDP)

DX: doxorubicina, MTX: methotrexate, CDDP: cisplatino, BCD: bleomicina, IFO: ifosfamide, VP16: etoposide

Tabella 2: Pannello di linee cellulari di osteosarcoma umano farmaco-sensibili e farmaco-resistenti.

Linea cellulare	Origine ^(a)	Sesso/età del paziente (anni)	IC50 ng/ml (μ M) relativa al farmaco di selezione	Aumento di resistenza rispetto alla linea parentale di origine
U-2OS	OS			
Saos-2	OS			
MG-63	OS			
HOS	OS			
IOR/OS9	MO obl OS	Maschio/15		
IOR/OS10	PRI fbl OS	Femmina/10		
IOR/OS14	PRI obl OS	Maschio/14		
IOR/OS15	PRI obl OS	Femmina/12		
IOR/OS18	MP obl OS	Maschio/33		
IOR/MOS	PRI obl OS	Femmina/13		
SARG	PRI OS	Maschio/25		
Varianti DX-resistenti				
U-2OS/DX30	U-2OS		79.9 (0.14)	14
U-2OS/DX100	U-2OS		319.5 (0.55)	55
U-2OS/DX580	U-2OS		1827.0 (3.15)	315
Saos-2/DX30	Saos-2		535.9 (0.92)	70
Saos-2/DX100	Saos-2		788.9 (1.36)	102
Saos-2/DX580	Saos-2		2529.4 (4.36)	328
Varianti MTX-resistenti				
U-2OS/MTX3	U-2OS		11.9 (0.03)	3
U-2OS/MTX30	U-2OS		72.3 (0.16)	21
U-2OS/MTX100	U-2OS		240.9 (0.53)	69
U-2OS/MTX300	U-2OS		471.0 (1.04)	135
Saos-2/MTX30	Saos-2		198.1 (0.44)	15
Saos-2/MTX100	Saos-2		316.1 (0.70)	24
Saos-2/MTX300	Saos-2		1454.2 (3.20)	109
Saos-2/MTX1 μ g	Saos-2		3740.0 (8.23)	281
Varianti CDDP-resistenti				
U-2OS/CDDP300	U-2OS		415.3 (1.38)	4
U-2OS/CDDP600	U-2OS		706.1 (2.35)	6
U-2OS/CDDP1 μ g	U-2OS		1116.0 (3.72)	10
U-2OS/CDDP2 μ g	U-2OS		2754.0 (9.18)	24
U-2OS/CDDP4 μ g	U-2OS		6046.0 (20.10)	52
Saos-2/CDDP300	Saos-2		382.3 (1.27)	3
Saos-2/CDDP600	Saos-2		935.2 (3.12)	8
Saos-2/CDDP1 μ g	Saos-2		1907.1 (6.35)	17
Saos-2/CDDP6 μ g	Saos-2		7080.0 (23.52)	63
Saos-2/CDDP10 μ g	Saos-2		21400.0 (71.30)	190

^(a)OS, osteosarcoma ad alto grado; PRI, tumore primitivo; MO, metastasi ossea; MP, metastasi polmonare; obl, osteoblastico; fbl, fibroblastico

Tabella 3: *Paragone tra la sensibilità al PNU-159548 e alla Doxorubicina (DX) in linee cellulari di osteosarcoma umano farmaco-sensibili.*

	% di inibizione della crescita dopo 96h di trattamento			
	0.01 μ M		0.03 μ M	
	PNU-159548	DX	PNU-159548	DX
U-2OS	52	62	87	96
Saos-2	28	32	53	84
MG-63	40	45	68	73
IOR/OS9	10	73	31	93
IOR/OS10	24	81	63	96
IOR/OS14	21	45	50	71
IOR/OS15	41	33	61	45
IOR/OS18	32	32	63	80
IOR/MOS	4	18	11	76
SARG	56	42	72	83

I dati si riferiscono ai valori medi di tre diversi esperimenti.

Tabella 4: Confronto tra la sensibilità al PNU-159548 e alla Doxorubicina (DX) in linee cellulari di osteosarcoma umano farmaco-sensibili.

Linea cellulare	IC50 ^(a) ng/ml (μM)	
	PNU-159548	DX
U-2OS	1.4 (0.002)	5.8 (0.010)
Saos-2	4.1 (0.007)	7.7 (0.013)
MG-63	4.2 (0.007)	12.7 (0.022)
IOR/OS9	27.5 (0.046)	4.6 (0.008)
IOR/OS10	20.4 (0.034)	1.8 (0.003)
IOR/OS14	15.1 (0.025)	14.5 (0.025)
IOR/OS15	30.2 (0.050)	4.3 (0.017)
IOR/OS18	12.6 (0.021)	19.3 (0.033)
IOR/MOS	10.2 (0.017)	17.4 (0.030)
SARG	3.6 (0.006)	7.4 (0.013)

^(a)IC50, concentrazione di farmaco che inibisce la crescita cellulare del 50% dopo 96 ore di trattamento *in vitro*. I dati si riferiscono ai valori medi di tre diversi esperimenti.

Tabella 5: Sensibilità *in vitro* al PNU-159548 delle varianti farmaco-resistenti che derivano dalle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2.

Linea Cellulare	IC50 ^(a) ng/ml (μ M)	Rapporto tra la IC50 del PNU-159548 rispetto alla linea cellulare parentale
<i>Varianti DX-resistenti</i>		
U-2OS/DX30	2.0 (0.003)	1
U-2OS/DX100	2.5 (0.004)	2
U-2OS/DX580	5.6 (0.009)	4
Saos-2/DX30	5.4 (0.009)	1
Saos-2/DX100	5.5 (0.009)	1
Saos-2/DX580	8.2 (0.014)	2
<i>Varianti MTX-resistenti</i>		
U-2OS/MTX3	1.3 (0.002)	1
U-2OS/MTX30	2.0 (0.003)	1
U-2OS/MTX100	2.6 (0.004)	2
U-2OS/MTX300	3.3 (0.005)	2
Saos-2/MTX30	4.0 (0.007)	1
Saos-2/MTX100	6.7 (0.011)	2
Saos-2/MTX300	8.3 (0.014)	2
Saos-2/MTX1 μ g	9.3 (0.015)	2
<i>Varianti CDDP-resistenti</i>		
U-2OS/CDDP300	10.2 (0.017)	7
U-2OS/CDDP600	11.3 (0.019)	8
U-2OS/CDDP1 μ g	11.4 (0.019)	8
U-2OS/CDDP2 μ g	12.1 (0.020)	9
Saos-2/CDDP300	14.6 (0.024)	4
Saos-2/CDDP600	21.5 (0.036)	5
Saos-2/CDDP1 μ g	22.3 (0.037)	5
Saos-2/CDDP10 μ g	26.3 (0.044)	6

^(a)IC50, concentrazione di farmaco che inibisce la crescita cellulare del 50% dopo 96 ore di trattamento *in vitro*. I dati si riferiscono ai valori medi di tre diversi esperimenti.

Tabella 6: Effetti della somministrazione contemporanea di PNU-159548 e Doxorubicina (DX), Methotrexate (MTX) o Cisplatino (CDDP).

Linea cellulare	Effetti combinati del PNU-159548 con		
	DX	MTX	CDDP
U-2OS	ADD	<i>ant</i>	ADD
Saos-2	ADD	<i>ant</i>	ADD
MG-63	ADD	ADD	ADD
IOR/OS9	ADD	ADD	ADD
IOR/OS10	ADD	SIN	ADD
IOR/OS14	<i>ant</i>	SIN	ADD
IOR/OS15	ADD	ADD	ADD
IOR/OS18	SIN	ADD	<i>ant</i>
IOR/MOS	SIN	SIN	ADD
SARG	ADD	<i>ant</i>	ADD
Varianti DX-resistenti			
U-2OS/DX30	SIN		
U-2OS/DX100	SIN		
U-2OS/DX5800	SIN		
Saos-2/DX30	ADD		
Saos-2/DX100	ADD		
Saos-2/DX5800	ADD		
Varianti MTX-resistenti			
U-2OS/MTX3		<i>ant</i>	
U-2OS/MTX30		<i>ant</i>	
U-2OS/MTX100		<i>ant</i>	
U-2OS/MTX300		<i>ant</i>	
Saos-2/MTX30		<i>ant</i>	
Saos-2/MTX100		<i>ant</i>	
Saos-2/MTX300		<i>ant</i>	
Saos-2/MTX1µg		<i>ant</i>	
Varianti CDDP-resistenti			
U-2OS/CDDP300			ADD
U-2OS/CDDP600			ADD
U-2OS/CDDP1µg			ADD
U-2OS/CDDP2µg			ADD
Saos-2/CDDP300			ADD
Saos-2/CDDP600			SIN
Saos-2/CDDP1µg			ADD
Saos-2/CDDP10µg			ADD

ADD, effetto additivo; **SIN**, effetto sinergico; *ant*, effetto antagonista

Tabella 7: Effetti della somministrazione sequenziale di PNU-159548 e Doxorubicina (DX), Methotrexate (MTX) o Cisplatino (CDDP).

Linea cellulare	Sequenza di farmaci					
	PNU-159548	PNU-159548	PNU-159548	DX	MTX	CDDP
	↓ DX	↓ MTX	↓ CDDP	↓ PNU-159548	↓ PNU-159548	↓ PNU-159548
U-2OS	ADD	ADD	ADD	ADD	<i>ant</i>	<i>ant</i>
Saos-2	ADD	ADD	ADD	ADD	<i>ant</i>	<i>ant</i>
Varianti DX-resistenti						
U-2OS/DX100	SIN			<i>ant</i>		
U-2OS/DX580	SIN			<i>ant</i>		
Saos-2/DX100	ADD			<i>ant</i>		
Saos-2/DX580	ADD			<i>ant</i>		
Varianti MTX-resistenti						
U-2OS/MTX100		ADD			<i>ant</i>	
U-2OS/MTX300		ADD			<i>ant</i>	
Saos-2/MTX300		ADD			<i>ant</i>	
Saos-2/MTX1µg		ADD			<i>ant</i>	
Varianti CDDP-resistenti						
U-2OS/CDDP300			ADD			<i>ant</i>
U-2OS/CDDP1µg			ADD			<i>ant</i>
Saos-2/CDDP300			ADD			<i>ant</i>
Saos-2/CDDP1µg			ADD			<i>ant</i>

ADD, effetto additivo; **SIN**, effetto sinergico; *ant*, effetto antagonista

Tabella 8: Sensibilità *in vitro* al Trimetrexate delle varianti MTX-resistenti che derivano dalle linee cellulari di osteosarcoma umano U-2OS e Saos-2.

Linea cellulare	Methotrexate		Trimetrexate	
	IC50 ^a ng/ml (μM)	Aumento di resistenza rispetto alla linea parentale di origine	IC50 ng/ml (μM)	Aumento di resistenza rispetto alla linea parentale di origine
U-2OS	3.5 (0.01)		3.3 (0.01)	
U-2OS/MTX3	11.9 (0.03)	3	7.3 (0.01)	2
U-2OS/MTX30	72.3 (0.16)	21	30.4 (0.05)	9
U-2OS/MTX100	240.9 (0.53)	69	79.5 (0.14)	24
U-2OS/MTX300	471.0 (1.04)	135	131.5 (0.23)	40
Saos-2	13.3 (0.03)		6.5 (0.01)	
Saos-2/MTX30	198.1 (0.44)	15	7.4 (0.01)	1
Saos-2/MTX100	316.1 (0.70)	24	8.0 (0.01)	1
Saos-2/MTX300	1454.2 (3.20)	109	13.5 (0.02)	2
Saos-2/MTX1μg	3740 (8.23)	281	15.0 (0.03)	2

^(a)IC50, concentrazione di farmaco che inibisce la crescita cellulare del 50% dopo 96 ore di trattamento *in vitro*. I dati si riferiscono ai valori medi di tre diversi esperimenti.

Tabella 9: Effetti della somministrazione contemporanea di Trimetrexate (TMTX) e Doxorubicina (DX) o Cisplatino (CDDP).

Linea cellulare	Effetti combinati del TMTX con:	
	DX	CDDP
U-2OS	ADD	ADD
Saos-2	<i>ant</i>	ADD
<i>Varianti DX-resistenti</i>		
U-2OS/DX580	<i>ant</i>	
Saos-2/DX580	<i>ant</i>	
<i>Varianti CDDP-resistenti</i>		
U-2OS/CDDP1 μ g		ADD
Saos-2/CDDP1 μ g		SIN

ADD, effetto additivo; **SIN**, effetto sinergico; *ant*, effetto antagonista

Tabella 10: Effetti della somministrazione sequenziale di Trimetrexate (TMTX) e Doxorubicina (DX) o Cisplatino (CDDP).

Linea cellulare	Sequenza di farmaci			
	TMTX ↓ DX	TMTX ↓ CDDP	DX ↓ TMTX	CDDP ↓ TMTX
U-2OS	ADD	ADD	ADD	<i>ant</i>
Saos-2	ADD	ADD	ADD	<i>ant</i>
<i>Varianti DX-resistenti</i>				
U-2OS/DX580	ADD		<i>ant</i>	
Saos-2/DX580	SIN		<i>ant</i>	
<i>Varianti CDDP-resistenti</i>				
U-2OS/CDDP1 μ g		ADD		<i>ant</i>
Saos-2/CDDP1 μ g		ADD		<i>ant</i>

ADD, effetto additivo; **SIN**, effetto sinergico; *ant*, effetto antagonista

Tabella 11: Sensibilità *in vitro* a NBDHEX di linee cellulari di osteosarcoma umano farmaco-sensibili e CDDP-resistenti.

Linea cellulare	CDDP (IC50 ^a ng/ml)	Aumento di resistenza rispetto alla linea parentale di origine	NBDHEX (IC50 μ M)	Rapporto tra le IC50 di NBDHEX rispetto alla linea cellulare parentale
U-2OS	115.0		4.13	
Saos-2	113.0		3.45	
MG-63	267.0		0.11	
HOS	282.0		0.08	
IOR/OS9	652.0		1.59	
IOR/OS10	93.0		0.08	
IOR/OS14	955.0		0.27	
IOR/OS15	1775.0		0.28	
IOR/OS18	996.0		0.18	
SARG	446.7		1.98	
<i>Varianti CDDP-resistenti</i>				
U-2OS/CDDP300	415.3	4	1.66	0.40
U-2OS/CDDP1 μ g	1116.0	10	1.38	0.33
U-2OS/CDDP4 μ g	6046.0	52	6.32	1.53
Saos-2/CDDP300	382.3	3	1.85	0.53
Saos-2/CDDP1 μ g	1907.1	17	1.67	0.48
Saos-2/CDDP6 μ g	7080.0	63	2.69	0.78

^(a)IC50, concentrazione di farmaco che inibisce la crescita cellulare del 50% dopo 96 ore di trattamento *in vitro*. I dati si riferiscono ai valori medi di tre diversi esperimenti.

Tabella 12: Effetti della somministrazione contemporanea di NBDHEX e di Cisplatino (CDDP).

Linea cellulare	Effetti combinati di NBDHEX e CDDP
U-2OS	ADD
U-2OS/CDDP300	ADD
U-2OS/CDDP1 μ g	ADD
U-2OS/CDDP4 μ g	SIN
Saos-2	ADD
Saos-2/CDDP300	ADD
Saos-2/CDDP1 μ g	ADD
Saos-2/CDDP6 μ g	ADD

ADD, effetto additivo; **SIN**, effetto sinergico; *ant*, effetto antagonista

Tabella 13: Effetti della somministrazione sequenziale di NBDHEX e di Cisplatino (CDDP).

Linea cellulare	Sequenza di farmaci	
	NBDHEX ↓ CDDP	CDDP ↓ NBDHEX
U-2OS	ADD	ADD
U-2OS/CDDP300	ADD	ADD
U-2OS/CDDP1 μ g	SIN	SIN
U-2OS/CDDP4 μ g	ADD	ADD
Saos-2	ADD	ADD
Saos-2/CDDP300	ADD	ADD
Saos-2/CDDP1 μ g	SIN	ADD
Saos-2/CDDP6 μ g	ADD	ADD

ADD, effetto additivo; **SIN**, effetto sinergico; *ant*, effetto antagonista

Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Mario Mercuri per l'opportunità datami di frequentare questo Dottorato e per la disponibilità sempre dimostratami.

Ringrazio il Dott. Piero Picci, Direttore del Laboratorio di Ricerca Oncologica degli Istituti Ortopedici Rizzoli (Bologna), per avermi dato l'opportunità di svolgere la mia attività di ricerca per la stesura di questa tesi nel Suo laboratorio.

Ringrazio il Dott. Massimo Serra che mi ha dato la possibilità di lavorare nel Suo gruppo e mi ha fornito preziosi e utili consigli derivanti dalla Sua esperienza di ricercatore per la parte scientifica di questo lavoro.

Ringrazio il Prof. Gaetano Bacci per aver organizzato gli incontri scientifici del Dipartimento di Oncologia Muscoloscheletrica degli Istituti Ortopedici Rizzoli, che mi hanno permesso di ampliare e migliorare le mie conoscenze inerenti i tumori dell'apparato locomotore.

Ringrazio il Dott. Marco Alberghini per avermi gentilmente fornito i preparati istologici da cui ho potuto ricavare le immagini riportate in questo studio.

Ringrazio la Dott.ssa Cristina Geroni per averci fornito il PNU-159548, la Dott.ssa Anna Maria Caccuri per averci fornito NBDHEX e la ditta IPSEN S.p.a, (Milano) per averci fornito il Trimetrexate.

Ringrazio le mie colleghe di laboratorio: Dott.ssa Claudia Hattinger, Dott.ssa Francesca Michelacci, Dott.ssa Isabella Scionti e Dott.ssa Giuseppina Stoico per non avermi mai fatto mancare il loro aiuto e sostegno.

Infine ringrazio la mia famiglia e Tarin per essermi sempre stati vicini e per aver sempre appoggiato e sostenuto le mie scelte.