

modelli possono essere utilizzati anche per studi sulla proliferazione cellulare, visto il ruolo critico giocato da queste molecole in questo processo.

Il KO costitutivo di mTOR provoca mortalità durante la vita embrionale a causa di alterazioni della crescita cellulare nei compartimenti embrionali ed extra-embriionali subito dopo l'impianto degli embrioni. Al fine di bypassare questo problema, abbiamo sviluppato un topo mutante condizionale di mTOR in cui questo gene può essere deletato nei cardiomiociti in modo tessuto specifico e temporalmente regolato utilizzando dei topi mutanti che esprimono la ricombinasi Cre fusa con subunità del recettore degli estrogeni attivabile attraverso il tamoxifene, sotto il controllo del promotore della catena pesante alfa della miosina ( $\alpha$ -MHC). Abbiamo pertanto generato un allele mTOR floxato omozigote; per arrivare ad ottenere una delezione cardiomiocita-specifica, abbiamo incrociato i topi con l'allele "floxed" mTOR condizionale con i topi  $\alpha$ MHC-MerCreMer al fine di ottenere i topi  $\alpha$ MHC-MerCreMer/mTOR<sup>flox/flox</sup>.

Dopo una sostanziale quantità di lavoro e modificando più volte strategie, siamo stati in grado di ottenere un modello cardiaco specifico ed inducibile di mTOR KO.

Al momento stiamo caratterizzando la funzione cardiaca di questo modello, che stiamo studiando intensamente. Speriamo di chiarire il ruolo di mTOR nella regolazione di molti aspetti della biologia del cardiomiocita, che includono l'angiogenesi, l'apoptosi e la fibrosi.

Dopo aver indotto la perdita di mTOR con la ricombinasi Cre nel miocardio post-natale abbiamo determinato che questa induce scompenso cardiaco, non dopo 1 settimana, come precedentemente descritto per PDK1 quanto piuttosto dopo 4 settimane. Questo fenomeno era accompagnato soprattutto da autofagia ed apoptosi. I topi muoiono dopo sei settimane di somministrazione di tamoxifene.

I meccanismi alla base dello scompenso cardiaco da ridotta espressione di mTOR sono oggetto di ulteriori studi da parte del nostro gruppo. Va sottolineato che in questo grant abbiamo studiato due molecole bersaglio di farmaci antitumorali; ciò a sottolineare il dilemma della terapia anti-tumorale, che se da una parte distrugge le cellule tumorali, dall'altra ha un effetto dannoso sulle cellule cardiache, che può portare anche a scompenso cardiaco irreversibile. Abbiamo pertanto determinato che farmaci d'impiego nella terapia antitumorale possono avere ripercussioni molto negative sulla funzionalità cardiaca. La generazione di modelli animali in cui i geni bersaglio di questi farmaci è stata modificata consente di sperimentare trattamenti antitumorali meno tossici per le malattie cardiache.

#### **Publicazioni**

- 1) Elia L, Contu R, Quitavalle M, Varrone F, Chimenti C, Russo MA, Cimino V, De Marinis L, Frustaci A, Catalucci D, Condorelli G. Reciprocal regulation of microRNA-1 and IGF-1 signal transduction cascade in cardiac and skeletal muscle in physiological and pathological conditions. (sottomesso per la pubblicazione a Circulation)
- 2) Catalucci D, Ceci M, Latronico MVG, Young H, Gallo P, Santonastasi M, Bellacosa A, Brown JH, Condorelli G. (2009). Akt overexpression increases sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> cycling by direct phosphorylation of phospholamban at Thr-17. (sottomesso per la pubblicazione a J.Biol. Chem.)
- 3) Catalucci D, Zhang D-H, DeSantiago J, Picht E, Alessi DR, Dalton N, Peterson KL, Bers DM, Brown JM, Condorelli G. (2009). Akt controls cardiac inotropism through regulation of L-Type Calcium Channel assembly. The Journal of Cell Biology, 184:923-33.
- 4) Catalucci D, Gallo P, Condorelli G. (2009). MicroRNAs in cardiovascular biology and heart disease. Circulation Genetics. In corso di stampa.
- 5) Latronico MV, Condorelli G. MicroRNAs and cardiac pathology. Nat Rev. Cardiol. (2009). 6(6):419-29.
- 6) Riccio G, Esposito G, Leoncini E, Contu R, Condorelli G, Chiariello M, Laccetti P, Hrelia S, D'Alessio G, De Lorenzo C. (2009): Cardiotoxic effects, or lack thereof, of anti-ErbB2 immunoagents FASEB J.;23(9):3171-8.
- 7) Latronico MV, Condorelli G. (2009). RNA silencing: small RNA-mediated posttranscriptional regulation of mRNA and the implications for heart electrophysiology. J Cardiovasc Electrophysiol. Feb;20(2):230-7.
- 8) Gallo P, Latronico MVG, Gallo P, Grimaldi S, Borgia F, Jones P, Gallinari P, De Francesco R, Ciliberto G, Steinkühler C, Esposito G, Condorelli G. (2008). Inhibition of Class I Histone

- Deacetylase with an Apicidine Derivative Prevents Cardiac Hypertrophy and Failure. *Cardiovasc. Res.*;80(3):416-24
- 9) Catalucci D, Bang ML, Condorelli G. (2008). Deciphering the beta-adrenergic response in human embryonic stem cell-derived-cardiac myocytes: closer to clinical use. *Br J Pharmacol.* 153 :625-6.
  - 10) Catalucci D, Latronico MVG, Ellingsen O, Condorelli G (2008): Physiological hypertrophy: how and why. *Frontiers in Biosciences*, 13:312-24.
  - 11) Catalucci D and Condorelli G. (2008). microRNA MicroRNAs Control Gene Expression: Importance for Cardiac Development and Pathophysiology : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1123:20-9.
  - 12) Latronico MVG, Catalucci D, Condorelli G. (2008). Heart failure: Targeting transcriptional and post-transcriptional control mechanisms of hypertrophy for treatment. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 40(9):1643-8.
  - 13) Latronico MVG, Catalucci D, Condorelli G. (2008). MicroRNA and cardiac pathologies. *Physiol Genomics*, 34(3):239-42.
  - 14) Latronico MVG and Condorelli G. (2008). On the road to the definition of the cardiac miRNome in human disease states. *Journal Molecular Cellular Cardiology*, 45(2):162-4.
  - 15) Condorelli G, Dimmeler S. (2008). MicroRNAs: components of an integrated system controlling cardiac development, physiology and disease pathogenesis. *Cardiovasc Res.* 79(4):551-2.
  - 16) Novelli V, Viviani Anselmi C, Roncarati R, Malovini A, Bellazzi R, Bronzini R, Marchese G, Condorelli G, Montenero A, Puca AA. (2008). Association of rs2200733 at 4q25 with atrial flutter / fibrillation diseases in Italian population. *Heart*, 94(11):1394-6.
  - 17) Ceci M, Gallo P, Santonastasi M, Grimaldi S, Latronico MVG, Pitisci A, Missol-Kolka E, Scimia MC, Catalucci D, Hilfiker-Kleiner D, Condorelli G. (2007). Cardiac-specific overexpression of E40K active Akt prevents pressure overload-induced heart failure in mice b2 increasing angiogenesis and reducing apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 14(5):1060-2.

**(IVB) INFIAMMAZIONE E PROGRESSIONE TUMORALE: EFFETTO DI INIBITORI DI NF-KB E DI SCAVENGERS DI RADICALI LIBERI IN MODELLI MURINI DI CA DEL COLON, CA MAMMARIO E CA DELLA PROSTATA.**

**Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 10 - Prof. Matteo Russo, Università "La Sapienza", Roma**

Obiettivi

1. Dimostrare che in tumori umani e in modelli murini di Ca della mammella, di ca della prostata e ca del colon, i principali componenti della risposta infiammatoria sono attivi nelle cellule tumorali dei tumori in progressione.
2. Che in questi stessi animali inibitori di NF-kB e scavengers di radicali liberi sono in gradi di bloccare o rallentare la progressione di questi stessi tumori.
3. Dimostrare che inibitori di NF-kB sono capaci di inibire l'insorgenza del fenotipo proinfiammatorio in cellule tumorali sottoposte ad ipossia.

**Primo obiettivo**

In tumori umani, ottenuti dopo intervento chirurgico in pazienti selezionati e opportunamente caratterizzati, è stato dimostrato mediante immunostochimica che alcune proteine, funzionalmente importanti nella risposta infiammatoria, sono abbondantemente presenti nelle cellule tumorali. In particolare, in tumori della prostata in tessuti normali e di Iperplasia Prostatica Benigna (BPH) e nel tessuto mammario normale (ottenuto da interventi di mastoplastica) e in oltre 60 ca mammari a varia malignità, sono stati studiati alcuni recettori-sensori di danno capaci di attivare NF-kB, enzimi inducibili, classici produttori di mediatori e di effettori, NOS e COX inducibili (iNOS e COX-2), e una tipica proteina di fase acuta, legata alle cellule, la pentraxina-3. L'immunostaining per tutte queste proteine appariva fortemente aumentato nei carcinomi, mentre nelle lesioni benigne e nei tessuti normali era scarso o assente.

Questo è stato confermato dall'analisi effettuata mediante western blotting eseguito su frazioni omogenee di tessuto ottenute da laser-capture microdissection. E' stato anche possibile evidenziare che le bande specifiche apparivano diminuite o assenti anche nel tessuto normale ospite del tumore, adiacente o lontano dal tumore. Infine, dalle stesse frazioni microdissezzate, è stato estratto mRNA e, mediante real-time PCR, è stato possibile dimostrare che i geni delle suddette proteine sono molto attivi nei tumori maligno progrediti, mentre la loro trascrizione appare bassa o assente nelle lesioni benigne e nel tessuto normale. Questo ha suggerito che la risposta infiammatoria potrebbe essere attivata nelle cellule trasformate, come accade nei leucociti attivati, e contribuire con i suoi vari geni alla progressione verso il tumore maligno.

Questi risultati sono stati presentati alla ARBU Conference: Prostate Cancer, the extreme points. Rome, 3-4 December, 2004. Inoltre, due manoscritti sono terminati e inviati a riviste internazionali con peer review:

**Secondo obiettivo**

E' stato iniziato il trattamento in vivo con inibitori di NF-kB (CR-3294), con scavengers di radicali liberi e con inibitori della mammalian reverse transcriptase (anti-RT) in due modelli murini. Il lavoro preliminare è stato di controllare, mediante un time-course, l'insorgenza del tumore nell'organo bersaglio e la presenza di eventuali metastasi in organi distanti. Questo è stato perseguito mediante un'autopsia sistematica e lo studio istologico dei linfonodi regionali dell'organo-bersaglio e dei principali organi distanti.

Si stanno studiando per prima i modelli del topo transgenico per il ca mammario e del ca del colon nel ratto trattato con un cancerogeno chimico (DMH-1,2 dimetil-idrazina).

I primi trattamenti sono terminati tra marzo e aprile del 2005 e riguardano solo i topi transgenici per il Ca mammario. Per il topo TRAMP per il Ca prostatico è stato impossibile iniziare dei trattamenti a causa

del mancato ampliamento della colonia. La causa determinata è stata la presenza precoce di tumori alle vescicole seminali che rendevano sterili i maschi.

Sempre per motivi legati al ridotto numero di animali anche il modello di ca del colon ottenuto con trattamento chimico nel ratto non è stato ancora iniziato, ma sono stati caratterizzati morfologicamente e immunoistochimicamente i tumori ottenuti in alcuni animali di controllo.

Risultati nel modello di ca mammario del topo transgenico MMT.

### **1. Risultati a 12 settimane di vita e a 8 settimane dall'inizio del trattamento.**

#### Animali transgenici di controllo non trattati.

L'analisi macroscopica del topo transgenico MMT di 12 settimane di vita non trattato farmacologicamente mostrava 4 grandi aree visibili macroscopicamente ove anatomicamente sono situate le ghiandole mammarie nel topo normale.

Allo studio istopatologico è stato riscontrato un carcinoma invasivo con alterazione dell'architettura mammaria e metastasi ai linfonodi loco-regionali.

#### Animali transgenici trattati con anti-RT

Macroscopicamente mostrava 2 aree ingrossate nella regione della testa ed una nell'area inguinale che all'esame autoptico e poi a quello microscopico sono risultate essere aree di mastopatie cistiche con aree di iperplasia e focolai di carcinoma in uno stadio ancora iniziale.

#### Animali transgenici trattati con inibitore di NFkB

Il quadro macroscopico appariva notevolmente meno grave, mostrando solo 2 piccole aree tumorali, soprattutto rispetto al controllo non trattato e anche rispetto al topo trattato con l'anti-RT. Microscopicamente mostrava solo un piccolo focolaio di carcinoma allo stadio iniziale. Sia il trattamento con inibitore di NFkB che con l'agente anti-RT sembrava efficace nel prevenire l'invasione di organi vicini e dei linfonodi regionali.

### **2. Risultati a 16 settimane di vita e a 12 settimane dall'inizio del trattamento.**

#### Descrizione macroscopica

Il topo di controllo mostra una alterata architettura macroscopica delle 4 regioni sedi delle ghiandole mammarie. All'analisi macroscopica non si riescono a distinguere le ghiandole dalle strutture adiacenti ed al taglio si notano aree di calcificazione indice di gravità del tumore.

I topi trattati con anti nfkb e anti rt mostrano una inaspettata progressione della massa tumorale nelle 4 sedi delle ghiandole. In particolare il topo trattato con anti NFkB mostra nella regione inguinale (non so se si chiama così nel topo cmq in basso) una area di ulcerazione da definire.

L'analisi macroscopica del topo transgenico MMT di 12 settimane di vita non trattato farmacologicamente mostrava 4 grandi aree visibili macroscopicamente ove anatomicamente sono situate le ghiandole mammarie nel topo normale.

#### Istopatologica e analisi molecolare.

All'esame microscopico è risultato essere affetto da un carcinoma invasivo con alterazione dell'architettura mammaria e metastasi ai linfonodi loco regionali.

La maggior parte dei campioni sono stati processati, ma attendono di essere studiati e analizzati.

Sono stati inoltre conservati a -80°C tutti i campioni su cui sarà eseguita l'analisi molecolare (WB, real-time PCR su frazioni tissutali ottenute con LCM).

#### **Terzo obiettivo**

In esperimenti preliminari abbiamo dimostrato che linee cellulari, normali e tumorali, derivate da tumori mammari e prostatici, sottoposti ad anossia (time-course e dose-dipendenza), esprimono una serie di geni tipici della risposta infiammatoria e riparativa (RAGE, P2X7, iNOS, COX-2, Pentraxin-3, varie

citochine) attraverso l'attivazione del fattore inducibile dall'ipossia HIF-1 $\alpha$  e, probabilmente, attraverso la transattivazione di NF- $\kappa$ B. Sulla base di questi risultati abbiamo studiato l'effetto di CR-3294 sull'espressione dei geni proinfiammatori su cellule in trattamento ipossico.

Sono stati condotti studi di dose-dipendenza e time-course dimostrando che tale espressione veniva inibita proporzionalmente in presenza di varie concentrazioni di CR-3294 a cominciare dall'espressione dei sensori di danno (RAGE e P2X7) e poi successivamente dagli effettori (iNOS, COX-2, Pentraxin-3 e citochine).

Inoltre, si è visto che il trattamento ipossico evidenziava o aumentava la capacità di degradare la ECM (invasività) e di migrare attivamente in risposta a stimoli chemiochinici in un sistema a due camere separate da una membrana di ECM.

Questo suggerisce che a) l'espressione del fenotipo infiammatorio tumorale sembra legato prima all'attivazione di HIF-1 $\alpha$  e poi di NF- $\kappa$ B e che 2) l'espressione di tale fenotipo può essere bloccato da inibitori specifici di NF- $\kappa$ B (CR-3294).

#### **Quarto obiettivo**

In esperimenti preliminari con cellule staminali isolate da glioblastomi e da ca mammari è stato confermato il ruolo dell'ipossia nell'accensione della risposta infiammatoria nelle cellule trasformate.

E' stato visto che l'entità dell'attivazione supera di molto la stessa risposta vista nelle linee tumorali differenziate derivate da glioblastomi e ca mammari.

Inoltre, si è visto che il trattamento ipossico evidenziava oppure aumentava fortemente (rispetto alle linee cellulari tumorali di cui sopra) la capacità di degradare la ECM (invasività) e di migrare attivamente in risposta a stimoli chemiochinici in un sistema a due camere separate da una membrana di ECM.

#### **Prodotti finali di questo progetto.**

Diversi manoscritti (almeno 5) sono in diverse fasi di pubblicazione. Due altri manoscritti sono in forma di Internal Report e in preparazione per essere sottomessi a riviste internazionali.

Una industria farmaceutica (ROTTA Farmaceutici, Milano) è interessata a finanziare un progetto per una sperimentazione in animali e poi nell'uomo (fase I-III) di inibitori di NF- $\kappa$ B come farmaci per bloccare o rallentare la progressione tumorale.

#### **Pubblicazioni**

- 1) Tafani M, Schito L, Anwar T, Indelicato M, Sale P, Di Vito M, Beraldi R, Makovec F, Letari O, Caselli G, Spadafora C, Pucci B and Russo MA. The Anti-Tumoral Effect of a Novel Molecule Through Autophagic Degradation of HIF-1 $\alpha$ . *Autophagy*, (2008), 4:8, 1-12.
- 2) Ravenna L, Sale P, Di Vito M, Russo A, Salvatori L, Tafani M, Mari E, Sentinelli S, Petrangeli E, Gallucci M, Di Silverio F, and Russo MA. Up-regulation of the Inflammatory-Reparative Response in Human Prostate Carcinoma. *Prostate* (2009) In corso di stampa.
- 3) Ravenna L, Verdina A, Principessa L, Faraglione C, Salvatori L, Caporuscio F, Russo MA, Petrangeli E. Hypoxic regulation of HIF and NF- $\kappa$ B signaling in prostate and mesotelioma cell lines. *FEBS J*, (2009), 276 (suppl):337-338.
- 4) Tafani M, Russo A, Di Vito M, Sale P, Gentileschi Stefano, Bragaglia Roberto, Marandino Ferdinando, Garaci Enrico and Russo Matteo A. Upregulation of Proinflammatory gene as adaptation to hypoxia in MCF7 cells and in human mammary invasive carcinoma microenvironment. (sottomesso per la pubblicazione).
- 5) Di Vito M, Frati A, Adriana xx, Sale P, Tafani M, Mari M, Bastianello S, Santoro A, Raco A, Pallini R, Delfini R, De Maria R, Russo MA. Proinflammatory gene expression in hypoxic stem cells from human glioblastoma and in solid glioblastoma microenvironment. (sottomesso per la pubblicazione).

**Relazione dell'attività scientifica svolta dall'U.O. 11 - Dr. Corrado Spadafora, SBGSA, ISS**Obiettivi

- Dimostrare che la risposta flogistica è coinvolta nella progressione di tumori spontanei in animali transgenici predisposti al ca mammario e al cancro prostatico.
- Definire il pattern di espressione della Trascrittasi Inversa (RT) endogena nella progressione tumorale in animali transgenici predisposti al ca mammario e al cancro prostatico.
- Dimostrare che il controllo negativo dell'RT è correlato con la risposta flogistica e rallenta la progressione dei tumori.

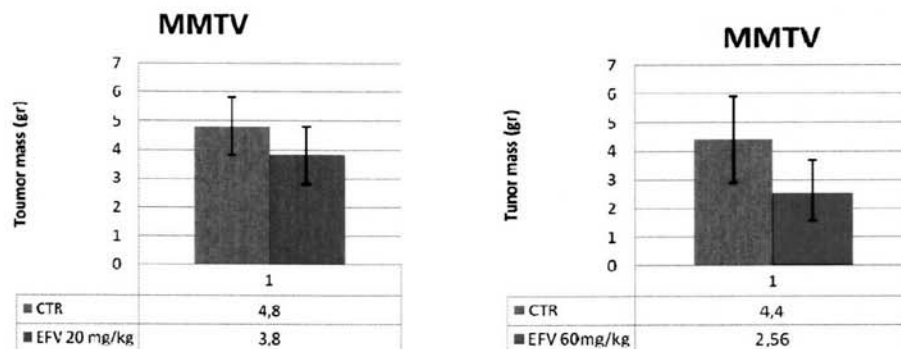
**1. Inibitori di NF- $\kappa$ B in modelli murini di carcinoma mammario.**

Il nostro contributo a questa parte del Progetto è consistito essenzialmente nell'acquisto dei topi transgenici del ceppo (FVB/N.TG(MMTV-PyVT)34M(T/X), spontaneamente predisposti al carcinoma mammario, nell'espansione della colonia, nella tipizzazione degli individui, nel trattamento farmacologico e nel rilevamento degli effetti del trattamento sulla progressione tumorale. Questo modello murino ha consentito di valutare gli effetti antitumorali in vivo della molecola CR 3294 che attiva l'autofagia degradando l' HIF-1a e inibisce l'invasività e la crescita tumorale. Questi risultati sono stati oggetto di una pubblicazione nel 2008.

**2. Espressione della Trascrittasi Inversa endogena nella progressione tumorale.**

(N.B. Questa parte del lavoro è stata svolta in stretta collaborazione con l'U.O. 12)

Gli obiettivi principali della nostra UO consistevano: a) nel definire il pattern di espressione della Trascrittasi Inversa (RT) nella progressione tumorale e b) nel dimostrare che il controllo negativo dell'RT rallenta la progressione dei tumori. A questo scopo, avevamo originariamente iniziato la sperimentazione utilizzando lo stesso ceppo di transgenici (FVB/N.TG(MMTV)PyVT) 34M(T/X) per studiare gli effetti dell'inibitore dell'RT efavirenz (efv) sulla crescita tumorale mammaria. Nel complesso, i risultati suggerivano che il trattamento con efv (20 mg/kg) antagonizza la progressione tumorale e riduce l'indice mitotico soprattutto nelle fasi iniziali e intermedie della crescita ma che negli stadi avanzate questi effetti tendevano a ridursi ed i due parametri a conformarsi a quelli dei controlli non trattati. Nel corso dell'ultimo anno abbiamo esteso questo studio trattando gli animali con due diverse dosi di farmaco – 20 mg/kg o 60 mg/kg – per rispondere al quesito se gli effetti inibitori fossero dose-dipendenti. I risultati riassunti nella Fig.1 dimostrano una significativa risposta dose2 dipendente in quanto i tumori di animali trattati con 60 mg/kg ( Fig. 1B) sono mediamente più piccoli del 30-35% rispetto a quelli dei topi trattati con 20 mg/kg (Fig. 1A). Questi risultati in generale suggeriscono una stretta correlazione dose inibitori RT-crescita tumorale.



**Figura 1.**

Nell'intraprendere un ulteriore approfondimento, abbiamo tuttavia, preferito rinunciare al ceppo (FVB/N.TG(MMTV-PyVT)34M(T/X) ed utilizzare il più convenzionale sistema inoculando cellule tumorali in topi nudi. Il motivo principale di questa decisione è stata l'estrema variabilità individuale che caratterizza la crescita dei tumori nei topi mutanti MMTV-PyVT, per cui è difficile raccogliere un numero statisticamente sufficiente di animali in cui la crescita sia sincrona. Abbiamo pertanto deciso di valutare gli effetti antitumorali

dell'efavirenz sul sistema dei topi nudi (parzialmente immunodepressi) inoculati sottocute con cellule di melanoma umano (A-375).  $5 \times 10^6$  cellule A-375 sono state inoculate in ciascun topo e 10 giorni dopo si è iniziato il trattamento con efv secondo il seguente schema:

efv  $2 \times 30$ mg/kg due dosi di 30 mg/giorno

efv 60mg/kg una dose di 60 mg/giorno

efv 90mg/kg una dose di 90 mg/giorno

I risultati sono riassunti nella Fig. 2; ogni punto delle curve rappresenta il valore medio di 5 topi. L'andamento delle curve mostra non solo una dose dipendenza – la dose maggiore ha più efficacia – ma anche che la modalità di somministrazione del farmaco gioca un ruolo significativo nel controllo della crescita del tumore. Infatti, la stessa dose di 60 mg/Kg è più efficace se somministrata in due dosi da 30 mg nell'arco della giornata piuttosto che in una unica soluzione.

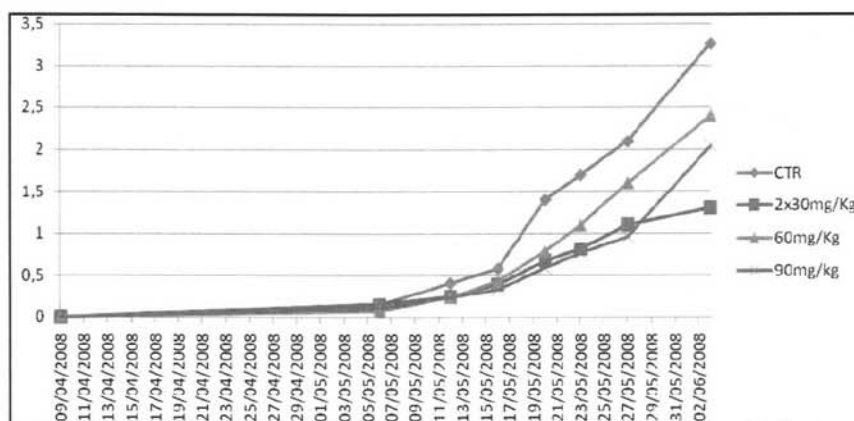


Figura 2.

I topi sono stati quindi sacrificati per prelevare i tumori da cui sono state estratte le proteine totali successivamente analizzate per Western blot utilizzando anticorpi diretti contro specifici marcatori tumorali. In particolare, è stata rilevata che: a) l'espressione di S-100 (Fig. 3A) e di Melan A (Fig. 3B) è marcatamente ridotta nei tumori di animali trattati rispetto ai controlli non trattati, b) la down regulation dei marcatori è dose dipendente e c) anche in questo caso, a parità di dose, è più efficace quella in due somministrazioni.

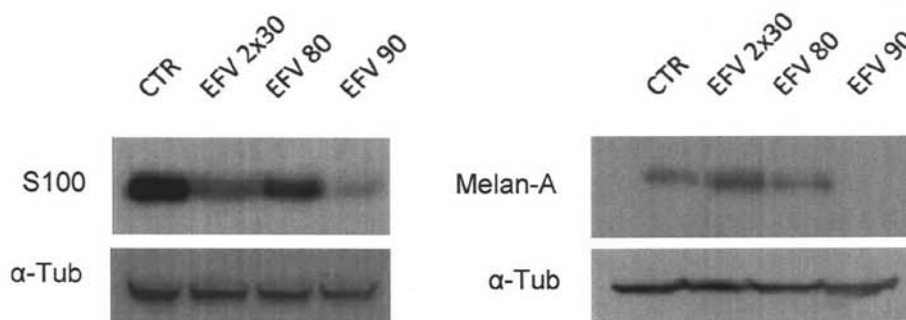
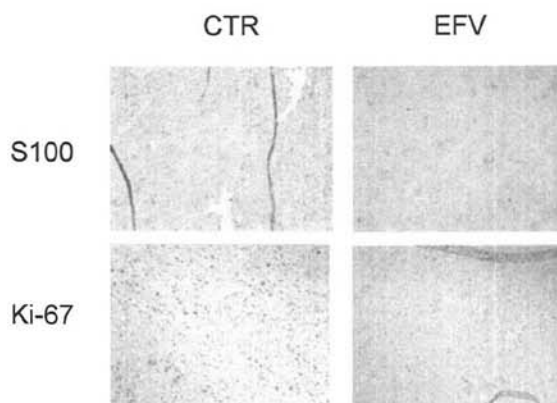


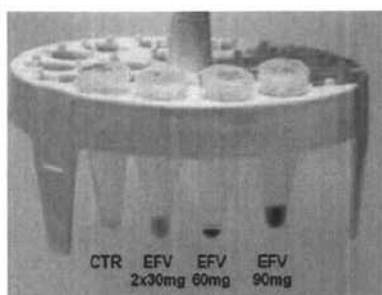
Figura 3.

Come mostrato in Fig. 4, i livelli di espressione dei due marcatori tumorali S-100 e Ki-67 sono stati anche rilevati per immunistochemica su sezioni di tumori prelevati da animali non trattati (CTR) e da quelli trattati (EFV). L'espressione dei due marcatori, rivelata dai è fortemente down regolata nei tumori di animali trattati con efv in paragone a quelli degli animali di controllo.



**Figura 4.**

E' interessante notare che quantità crescenti di melanina, considerate un marcatore di differenziamento del melanoma, sono rilevabili in estratti cellulari di tumori. La **Fig. 5** mostra che le frazioni non solubili ottenute dopo l'estrazione delle proteine dai tessuti tumorali (le frazioni solubili sono state analizzate per Western blot per rilevare l'espressione di **S-100** e **Melan-A**, vedi sopra) sono visibilmente e progressivamente arricchite con **melanina** in funzione del trattamento con efv: la **melanina** non è espressa nei tumori di animali non trattati (CTR) mentre la sua espressione è progressivamente aumentata in seguito al trattamento con quantità crescenti di efv.



**Figura 5.**

In conclusione, due dosi di efv (2x30 mg/giorno) sono più efficaci che una singola dose (60 mg/giorno). 2x30 mg/giorno antagonizza più efficacemente la progressione tumorale, riduce significativamente l'espressione dei marcatori tumorali e stimola la produzione di melanina, un marcatore del differenziamento del melanoma.

La marcata down regolazione dei due marcatori tumorali e la up regolazione della melanina suggeriscono il potenziale futuro utilizzo dell' efavirenz in una terapia differenziativa del cancro, del melanoma in particolare.

#### **Pubblicazioni**

- 1) Oricchio E, Sciamanna I, Beraldi R, Tolstonog GV, Schumann GG, Spadafora C. Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression. *Oncogene*. 2007 26, 4226-4233.