



**Università degli Studi di Genova
Scuola di Dottorato in Oncologia Traslazionale
XXIII Ciclo di Dottorato**

Corso di:
EMATO ONCOLOGIA E MEDICINA INTERNA CLINICO_TRASLAZIONALE

Curriculum:
ONCOLOGIA TRASLAZIONALE (CODICE 6598)

Titolo della tesi:
RIVALUTAZIONE DELL'ETOPOSIDE COME FARMACO NELLE FORME AVANZATE DI
CARCINOMA PROSTATICO.

Tutor: Prof. Francesco Boccardo

Candidato: Matteo Capaia

Anno accademico: 2020-2021

Indice.

1.0	Epidemiologia ed Eziologia del Carcinoma Prostatico.	pg.4
1.1	Epidemiologia.	pg.4
1.2	Eziologia.	pg.6
1.3	Trattamenti farmacologici per la cura del PCa.	pg.8
2.0	Caratteristiche del Carcinoma Prostatico.	pg.10
2.1	Biologia molecolare del PCa e caratteristiche del recettore androgenico.	pg.10
2.2	Variante del recettore androgenico AR-V7.	pg.13
2.3	Caratteristiche delle forme avanzate di PCa (indipendenza da AR e trattamenti in uso).	pg.14
2.4	Caratteristiche dei farmaci usati nel nostro studio per la terapia del PCa.	pg.16
2.5	Etoposide e inibitori della topoisomerasi 2.	pg.21
3.0	Materiali e Metodi.	pg.22
3.1	Colture cellulari e prodotti chimici.	pg.22
3.2	Saggi di proliferazione cellulare.	pg.26
3.3	Estrazione delle proteine e analisi in Western Blot.	pg.27
3.3bis	Metodi di normalizzazione in Western Blot.	pg.31
3.4	Saggi di invasione.	pg.33
3.5	Analisi statistica.	pg.33
3.6	Analisi di TOP2 in dataset su larga scala.	pg.34

4.0	Risultati.	pg.35
4.1	Valutazione dell'attività citotossica dell'etoposide su modelli di PCa in vitro a diverso stato funzionale di AR.	pg.35
4.2	Espressione di TOP2A e TOP2B in linee cellulari di PCa.	pg.45
4.3	Coerenza tra i livelli di mRNA di TOP2 ed espressione della proteina.	pg.49
4.4	Rilevanza delle alterazioni genetiche di TOP2A e TOP2B nei mCRPC.	pg.50
4.5	Rilevanza dell'espressione dell'mRNA di TOP2A e di TOP2B nei mCRPC.	pg.53
4.6	Rete di interazione di TOP2A e analisi di arricchimento funzionale.	pg.58
5.0	Discussione.	pg.60
6.0	Conclusioni.	pg.66

1.0 Epidemiologia ed Eziologia (cenni generali)

1.1. Epidemiologia

Nel nostro Paese il carcinoma prostatico (PCa) è il tumore più diffuso e tra le prime cause di morte per malattia neoplastica nella popolazione maschile rappresentando oltre il 20% di tutti i tumori diagnosticati a partire dai 50 anni di età [1].

Negli ultimi due decenni, l'incidenza del PCa ha mostrato una costante tendenza all'aumento anche grazie alla maggior diffusione del test specifico per l'antigene prostatico (PSA) usato come strumento di screening opportunistico, il quale associato ad altri parametri di tipo diagnostico, permette di avere un quadro della malattia più definito.

Come per altre neoplasie, l'incidenza nel nostro paese fa registrare un gradiente Nord-Sud; rispetto ai 144,4 casi x 100.000/anno tra i residenti del Nord-Italia, le regioni del Centro fanno infatti registrare un -3% e quelle del Sud circa un -25%.

Queste differenze, oltre al diverso impiego del PSA come metodo di screening [1] sono probabilmente spiegabili con la diversa incidenza di alcuni fattori di suscettibilità attribuiti a diversi stili di vita, nello specifico la dieta e il minor introito di fattori antiossidanti protettivi.

In Italia nel 2015 si sono verificati 7.196 decessi per tumore alla prostata (dati ISTAT), un numero che rende questa patologia a forte impatto sociale dal momento che interessa prevalentemente individui anziani spesso affetti anche da altre patologie, pur sottolineando che occorre distinguere da chi è deceduto per tumore alla prostata da chi è deceduto con tumore alla prostata ma per altre cause.

In considerazione della diversa malignità/aggressività delle forme tumorali di PCa, pur trovandosi al primo posto per incidenza, in Italia questo tumore occupa il terzo posto nella scala della mortalità, nella quasi totalità dei casi, riguardando maschi al di sopra dei 70 anni.

Negli ultimi anni si è registrata una moderata diminuzione della mortalità (-1,9% annuo) [1], e a conferma del diverso ruolo giocato dagli strumenti diagnostici di tipo predittivo che rendono possibile anticipare i vari trattamenti della malattia, legata a un numero più elevato di sovra-diagnosi nel settentrione, rispetto all'Italia centro-meridionale, non si osservano significative differenze di mortalità

per questa neoplasia fra le varie regioni del paese, con un numero di 30-35 decessi per 100.000 abitanti/anno, leggermente superiori nel meridione [1].

La sopravvivenza dei pazienti con PCa, non considerando la mortalità per altre cause è attestata al 91,4% a cinque anni dalla prognosi, purtroppo in costante e significativa crescita [1].

L'anticipazione diagnostica e la diffusione dello screening opportunistico che comporta una sovra diagnosi, distribuita diversamente in tutto il paese, è una variabile correlata a questa tendenza di crescita.

Per il dato della sopravvivenza si osserva un gradiente Nord-Sud (92% al Nord, 91% al Centro e 88% al Sud; dati standardizzati per età) [1].

Per quanto riguarda i dati della prevalenza si stima che per l'Italia, tra gli uomini che convivono tumore precedentemente diagnosticato, 458.000 di essi (il 30%), abbia ricevuto una pregressa diagnosi di PCa.

Il 55% di queste diagnosi è stato formulato da meno di 5 anni e il 14% da più di dieci anni.

La maggior parte delle diagnosi viene formulata in individui in età avanzata (6.811 casi su 100.000 ultrasettantacinquenni).

La quota maggiore di pazienti è presente al Nord (1.428 ogni 100.000 abitanti nel Nord-Ovest, 1.395 nel Nord-Est) rispetto al centro (1.015) e al Sud (588) [1].

1.2. Eziologia, fattori di rischio e fattori protettivi

L'eziologia del PCa è multifattoriale ed è il risultato di una interazione complessa tra fattori genetici, responsabili della familiarità e della diversa incidenza nelle diverse razze umane fattori ambientali come dieta e cancerogeni presenti nell'ambiente.

I principali fattori di rischio sono:

- Età (l'incidenza del tumore aumenta con essa) [2].
- Razza (la razza nera è a più rischio per i più elevati livelli circolanti di androgeni, di DHT e di 5-alfa reduttasi) [2, 4].
- Fattori ormonali (elevati livelli circolanti di testosterone e di IGF-1 predispongono all'insorgenza del tumore)
- Storia familiare del PCa (circa il 25%)
- Fattori genetici (9% di forme ereditarie; 43% nei pazienti con età minore di 55 anni) [3,4].
- Stile di vita: dieta (eccessivo apporto calorico e di grassi) [5,6].
- Obesità [7,8].
- Altezza [7,8].
- Fumo [8].
- Prodotti caseari; introito di calcio [8].

Fattori protettivi:

- Attività fisica [8].
- Caffè [8].
- Pomodori [8].
- Pesce [8].
- Vitamina D [8].
- Statine [8].

Il grado di evidenza è diverso; per alcuni è forte (come a esempio età, razza, storia familiare, alterazioni genetiche) per altri è debole (come a esempio consumo di prodotti caseari), per altri, come per l'altezza, è debole rispetto al rischio globale di PCa ma elevato in relazione ai tumori più avanzati e alle forme più letali. In generale l'evidenza relativa agli effetti protettivi è bassa, fatto salvo per l'attività fisica, che tuttavia sembrerebbe maggiormente collegata al rischio di mortalità per tutte le cause nei pazienti con diagnosi di PCa.

Secondo alcuni autori, l'estrema eterogeneità del PCa dal punto di vista biologico e clinico, che fa sì che a fianco di neoplasie con caratteristiche indolenti coesistano neoplasie aggressive, molto rapide e a prognosi infausta, dovrebbe far considerare separati i fattori di rischio per le neoplasie intese in senso generale e quelli che predispongono all'insorgenza di forme rapide e letali [8].

Da tener presente che in molti paesi, i risultati degli studi epidemiologici più recenti possono essere parzialmente inficiati dall'utilizzo del PSA come screening, per l'associazione tra la pratica a sottoporsi a controlli regolari del PSA e lo stile di vita, in particolare le abitudini alimentari.

1.3 Trattamenti farmacologici per la cura del PCa

Le nuove informazioni basate sui più recenti studi del PCa permettono di aggiornare in modo sempre più efficace gli schemi di trattamento relativi ai diversi stati clinici del tumore e al suo decorso, definiti dallo stato del tumore primario, presenza o assenza di malattia a distanza dall'imaging (malattia metastatica contro non metastatica), livelli di testosterone (non castrato farmacologicamente contro castrato) e precedente esposizione alla chemioterapia [9-11].

È noto da tempo che il cancro alla prostata è unico nella sua dipendenza dagli androgeni per la crescita e la progressione della malattia; per questo motivo una strategia terapeutica di prima linea ampiamente utilizzata in clinica per il trattamento del PCa è rappresentata dalla deprivazione androgenica (ADT) [12,13].

Nonostante la ADT, la progressione della malattia segnala inequivocabilmente la transizione del PCa verso una condizione di resistenza alla terapia; in questo punto critico è necessario adattare i trattamenti farmacologici con le caratteristiche cliniche del tumore allo scopo di arrestare la progressione del PCa verso la trasformazione in forme più maligne e nel contempo stressare meno i pazienti, alleviando possibili effetti indesiderati.

Per comprendere meglio l'evoluzione dei vari trattamenti del PCa con i farmaci attualmente disponibili e di nuova generazione (comprendenti quelli nel nostro studio) può essere riportato uno schema del tipo proposto dal Prostate Cancer Working Group 3 [11]:

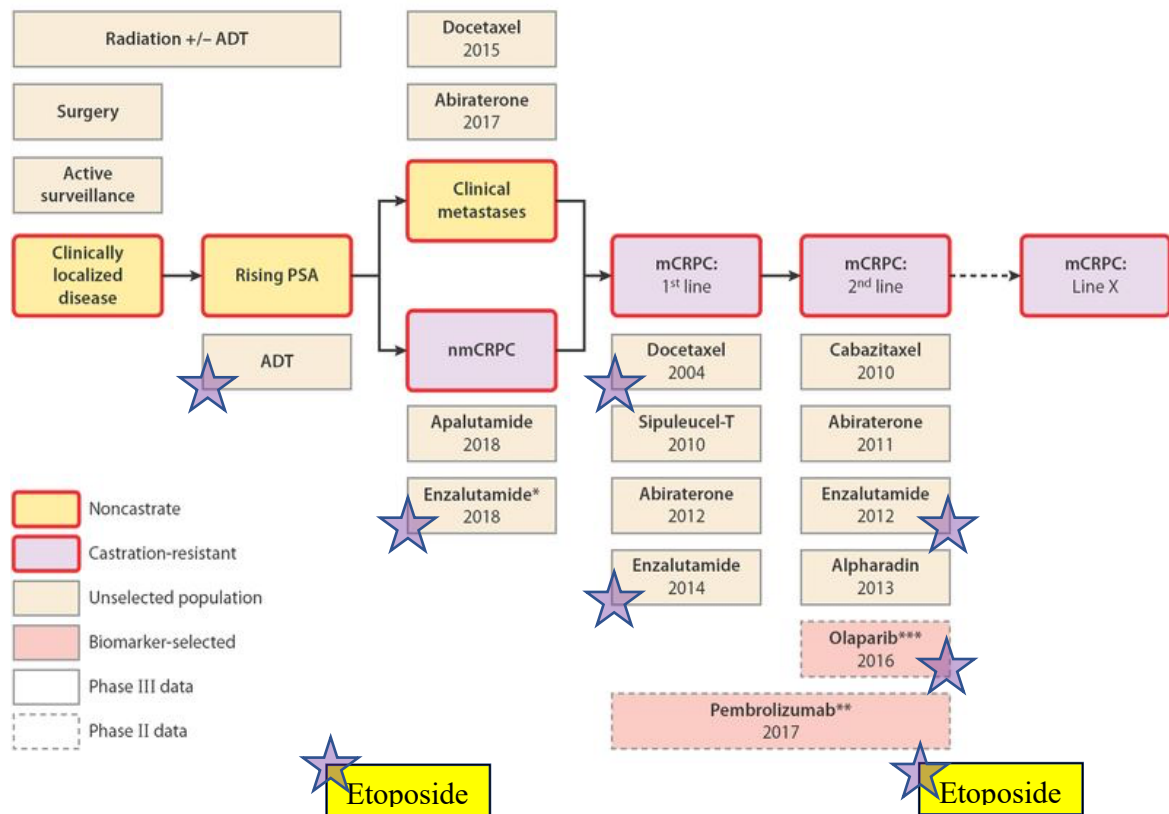


Figura 1.

Opzioni di gestione in diversi stati clinici proposto dal Prostate Cancer Working Group 3 e posizionamento clinico dei farmaci usati nel nostro studio. ★

Abbreviazioni: ADT, terapia di deprivazione androgenica; mCRPC, carcinoma prostatico metastatico resistente alla castrazione; nmCRPC, carcinoma prostatico resistente alla castrazione non metastatico; PSA, antigene prostatico specifico. * Dati positivi di fase III disponibili ma non approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) statunitense. ** Ha ricevuto la designazione innovativa della FDA basata sullo studio di fase II TOPARP-A. *** Approvazione FDA basata sull'instabilità dei micro-satelliti tessuto-agnostica.

2.0 Caratteristiche del Carcinoma Prostatico.

2.1 Biologia molecolare del PCa e caratteristiche del recettore androgenico

Una delle caratteristiche peculiari del PCa è la sua iniziale dipendenza dagli androgeni che fornisce il razionale per l'impiego della terapia di deprivazione androgenica (ADT), tuttavia nella maggioranza dei casi, la risposta all'ADT ha una durata limitata a causa della comparsa fenomeni di resistenza entro 18-24 mesi [16].

Le cause biologiche associate al fallimento dell'ADT e all'insorgenza della resistenza sembrano derivare dalla grande eterogeneità clonale del tumore (possono coesistere più fenotipi cellulari all'interno della massa tumorale) e dall'intrinseca instabilità genica indotta dagli effetti delle terapie antineoplastiche [17,18].

È stato osservato che l'androgeno deprivazione indotta dai farmaci impiegati in prima linea, si accompagna a una progressiva acquisizione della resistenza ai trattamenti, causata dalla riattivazione del signaling mediato dal recettore androgenico (AR) che storicamente rappresenta il principale bersaglio della terapia anti-androgenica.

Biologicamente il recettore androgenico svolge un ruolo fondamentale nell'espressione del fenotipo maschile.

Il legame di AR ai suoi ligandi nativi, 5 α -diidrotestosterone (DHT) e testosterone avvia lo sviluppo e la differenziazione sessuale maschile.

È noto che alterazioni a carico della funzionalità di AR [14] sono associate a diverse patologie comprendenti il cancro alla prostata.

Il recettore degli androgeni appartiene al gruppo degli ormoni steroidei dei recettori nucleari come il recettore degli estrogeni (ER), il recettore dei glucocorticoidi (GR), il recettore del progesterone (PR) e il recettore per i mineral-corticoidi (MR) [14, 15,16]:

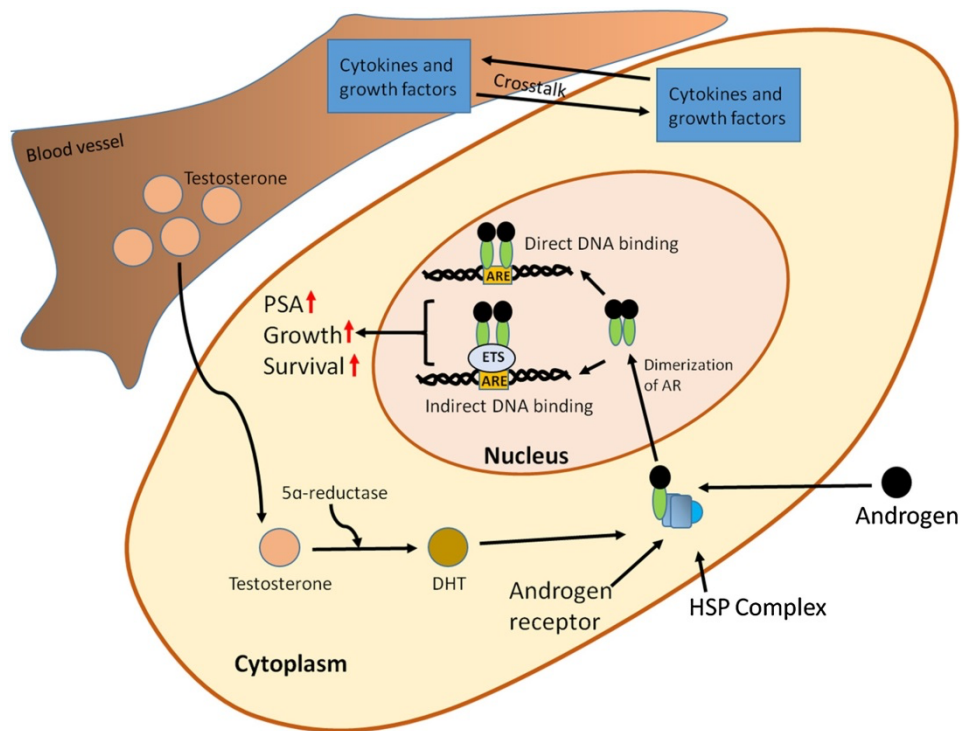


Figura 2.

L'attuale modello di azione degli androgeni e del signaling intracellulare di AR.

Attraverso il legame con il suo ligando, AR regola l'attivazione di complessi di trascrizione dopodiché separandosi dai complessi heat-shock protein (HSP) situati nel citoplasma e trasloca nel nucleo.

Una volta compartimentalizzato il recettore dimerizza e viene fosforilato.

Successivamente, AR si lega agli “androgen responsive elements” (AREs) [19-20] del DNA attivando i membri del complesso trascrizionale promuovendo in questo modo la trascrizione di geni dipendenti dagli androgeni (ARGs), legati alla crescita e alla sopravvivenza cellulare.

Il Signaling di AR è fondamentale per lo sviluppo e la progressione del tumore.

Si ritiene che nelle fasi iniziali dello sviluppo del PCa resistente alla terapia anti-androgenica (mCRPC) vi sia l'adattamento di cloni tumorali responsivi a bassi livelli circolanti e/o tissutali di testosterone [21,22].

Inoltre, anche quando la via di segnale di AR viene bloccata, vie alternative possono essere attivate in modo da sostenere la crescita cellulare anche in assenza di androgeno.

In questo modo, cloni fenotipicamente più maligni sono in grado di proliferare in seguito all'attivazione di pathways androgeno-indipendenti con meccanismi diversi da quelli che intervengono nella fase di androgeno-sensibilità [23].

2.2 Variante del recettore androgenico AR-V7

Alla luce di queste semplici considerazioni, si può affermare che la plasticità del recettore androgenico “normale” e la presenza di varianti è tra le cause dell’insorgenza della resistenza.

In questo contesto, è necessario citare brevemente l’isoforma del recettore degli androgeni codificata dalla variante di giunzione 7 (AR-V7) osservata in alcuni fenotipi tumorali.

È stato visto che questa variante di AR manca del dominio di legame del ligando portando all’attivazione costitutiva del recettore degli androgeni; la sua individuazione nelle cellule tumorali circolanti (CTC) è stata associata alla resistenza alla terapia androgeno soppressiva ARSi (androgen receptor signal inhibitor) [24, 25].

Al fine di rendere più completo il nostro studio e per avere una variabile “indipendente” dalla via di AR che supportasse l’idea del modello, abbiamo inserito nello studio la linea 22Rv1 che possiede questo tipo di variante del recettore androgenico.

2.3 Caratteristiche delle forme avanzate di PCa (indipendenza da AR e trattamenti in uso)

In questi ultimi anni, numerose evidenze sperimentali hanno dimostrato che l'androgeno deprivazione può portare allo sviluppo di varianti ancora più aggressive di "castration resistant prostate cancer" (CRPC), dette "aggressive variants prostate cancer" (AVPC).

Queste varianti risultano indipendenti dall'attività del recettore androgenico, possono proliferare in seguito all'attivazione di pathways completamente indipendenti da AR [23-26] e sono clinicamente caratterizzate da metastasi viscerali, bassi livelli sierici di PSA, bassa o assente espressione di AR e fenotipo cellulare neuroendocrino (NE) [27,28].

Come conseguenza, in un unico paziente è possibile trovare una vasta eterogeneità fenotipica con la presenza di popolazioni cellulari con diversa storia evolutiva e diversa suscettibilità ai farmaci.

L'estrema eterogeneità, soprattutto nei fenotipi AVPC è correlata a una serie di proteine chiave non ancora chiaramente identificate, che risultano coinvolte nel sostentamento della variabilità cellulare e nella progressione verso le forme fenotipicamente più aggressive.

Lo studio dei pathways in grado di sostenere la crescita e la diffusione delle cellule tumorali aggressive responsabili della progressione, potrebbe permettere di sviluppare strategie terapeutiche efficaci utilizzando meglio le risorse disponibili, da implementare eventualmente, anche con l'uso di molecole di nuova generazione e nel contempo identificare un set di bio-marcatori per guidare la selezione dei pazienti verso un trattamento più specifico.

Nonostante i miglioramenti ottenuti in campo terapeutico negli ultimi anni, sia attraverso approcci di tipo multimodale, sia grazie alla disponibilità di nuove risorse farmacologiche ancora oggi mancano criteri prognostici e soprattutto predittivi affidabili utili a selezionare i pazienti ad alto rischio, in particolar modo quelli affetti da carcinoma prostatico metastatico hormone-naïve (hn), che possano essere avviati da subito a trattamento chemioterapico o con nuovi inibitori ormonali rispetto alla sola

ADT; allo stesso tempo non esistono strumenti predittivi in grado di determinare il beneficio terapeutico atteso dai farmaci attualmente disponibili nei pazienti affetti da CRPC metastatico.

Come già accennato in precedenza, recentemente nelle cellule CRPC metastatico e non, sono stati evidenziati alcuni pathways indipendenti dal controllo di AR, che potrebbero regolare numerose funzioni cellulari e sostenere importanti processi tumorali quali la proliferazione cellulare, il ciclo cellulare, il riparo al danno del DNA, l'apoptosi, l'angiogenesi e l'invasione [23,26].

Sebbene numerosi studi siano stati intrapresi in tal senso, attualmente alcune targeted therapy dirette contro due vie indipendenti da AR non ha dato i risultati attesi.

Tale fallimento dipende dal fatto che con molti meccanismi in gioco (a volte contemporaneamente) e con la ridondanza di feedback negativi/positivi tra i pathways è possibile determinare un'inibizione solo parziale o di durata temporanea.

Per questo motivo attualmente, per la cura del CRPC vengono valutati regimi di associazione terapeutica che potrebbero potenzialmente aumentare l'efficacia dei trattamenti in uso.

A supporto di ciò, recentemente sono emerse interessanti opportunità combinando inibitori del pathway di AR con quelli specifici per altre vie di segnale coinvolte nell'insorgenza della trasformazione neoplastica nel PCa, come nel caso degli inibitori di AR e PI3K/Akt [29] oppure degli inibitori di PARP-1[33].

Nello specifico PARP-1 è una proteina coinvolta nella regolazione della trascrizione dei geni sotto il controllo di AR e nell'attivazione di pathways alternativi coinvolti nella progressione del CRPC [13] in grado di interagire anche con il prodotto di fusione genica TMPRSS2/ERG presente nelle forme più aggressive di PCa [31,32].

2.4 Caratteristiche dei farmaci usati nel nostro studio per la terapia del PCa.

Per il nostro studio delle forme aggressive di tumore alla prostata, ci siamo avvalsi di una serie di farmaci comunemente usati in clinica, di prima e di seconda linea, brevemente riassunti nella tabella sottostante:

farmaco	BERSAGLIO/EFFETTO
enzalutamide (ENZA)	AR/ proliferazione cellulare (blocco fisico su AR)
docetaxel (DOC)	microtubuli/proliferazione cellulare
olaparib (OLA)	PARP1/riparo danno DNA, trascrizione
etoposide (ETO)	TOP2A, TOP2B/sopravvivenza, differenziamento

Tabella 1.

Caratteristiche dei farmaci impiegati in base ai propri effetti biologici sulla cellula.

In modo più specifico, le varie sostanze hanno le seguenti caratteristiche:

Enzalutamide.

È un inibitore mirato del recettore degli androgeni, identificato e ottimizzato da uno screening su larga scala di oltre 200 antiandrogeni non steroidei che mantengono l'attività quando l'espressione del recettore degli androgeni è aumentata [34].

Si lega in modo competitivo al dominio di legame del ligando di AR e inibisce la traslocazione del recettore nel nucleo cellulare impedendo il legame con il DNA.

Docetaxel.

Il Docetaxel è un taxano che lega in modo specifico la tubulina e stabilizza i microtubuli.

È stato il primo agente chemioterapico a migliorare la sopravvivenza globale nei pazienti con PCa resistente alla castrazione (mCRPC) [35,36].

Nello studio clinico CHAARTED (Clinical Trails.gov identificatore NCT00309985) studiando il regime terapeutico del docetaxel in associazione con l'ADT rispetto alla sola ADT, in 790 pazienti con PCa metastatico non precedentemente trattato con ADT, i ricercatori hanno dimostrato che l'ADT combinata con 6 cicli di docetaxel migliorava la sopravvivenza dei pazienti con PCa metastatico sensibile agli ormoni (mHSPC) rispetto alla sola ADT [37,38].

Olaparib.

È un inibitore della poli (ADP-ribosio) polimerasi (PARP-1).

È stata a lungo studiata come opzione di strategia terapeutica per i tumori al seno e alle ovaie, specialmente nei casi con mutazione BRCA1 /2 o con altri difetti di riparazione del danno al DNA.

Sforzi multicentrici su larga scala hanno recentemente dimostrato difetti nei geni di riparazione del danno al DNA in circa 11,8% degli uomini con PCa avanzato [39].

Una popolazione di mCRPC può presentare anche alterazioni somatiche in questi geni [40], suggerendo il potenziale beneficio dell'inibizione di PARP-1 nel PCa.

Uno studio di fase II TOPARP-A ha mostrato un tasso di risposta del 33% a olaparib in 50 pazienti con mCRPC altamente pretrattato.

Quattordici dei 16 pazienti con delezioni omologhe o mutazioni nei geni di riparazione del danno al DNA hanno risposto a olaparib.

Complessivamente, i pazienti positivi ai biomarcatori hanno manifestato una PFS mediana superiore (9,8 contro 2,7 mesi) e un'OS mediana (13,8 contro 7,5 mesi) [41].

Alla luce di questi risultati, la FDA ha concesso una designazione rivoluzionaria per olaparib nel trattamento dei mCRPC per accelerarne lo sviluppo.

Etoposide

L'etoposide rientra nella categoria dei farmaci inibitori dell'enzima topoisomerasi 2 (TOP2) che hanno una lunga storia nel trattamento del cancro alla prostata.

In questa categoria rientra a esempio il mitoxantrone, che è stato uno dei primi agenti chemioterapici a essere approvato per il trattamento del PCa metastatico resistente alla castrazione (mCRPC).

Nel 1996 Tannock e colleghi hanno pubblicato uno studio di fase 3 che ha dimostrato i benefici di questo farmaco come palliativo del dolore [42].

Il mitoxantrone tuttavia non ha mai mostrato vantaggi per la sopravvivenza nei pazienti con PCa e il suo utilizzo è attualmente destinato a malati selezionati senza ulteriori opzioni di trattamento [2].

Lo stesso destino è avvenuto per l'etoposide-fosfato comunemente noto come VP-16.

Questo inibitore della TOP2, in combinazione con l'estramustina-fosfato è stato incluso dal 1997 nelle linee guida del National Comprehensive Cancer Network (NCCN) per il trattamento dei mCRPC [3]; tuttavia, dato il rapporto poco conveniente rischio-beneficio, questa combinazione è stata progressivamente abbandonata dalla maggior parte dei centri di cura a favore di altri trattamenti.

L'etoposide è attualmente valutata per il trattamento delle forme avanzate di AVPC, ma il suo uso in clinica è limitato alla combinazione con agenti al platino per la cura delle forme di PCa a fenotipo neuroendocrino (NEPC) [45].

La TOP2 possiede due isoforme funzionali indicate come TOP2A e TOP2B, entrambe bersaglio di mitoxantrone ed etoposide.

L'isoforma TOP2A è strettamente correlata alla proliferazione cellulare, mentre l'isoforma TOP2B è espressa anche nelle cellule non proliferanti [46].

TOP2A è repressa dalla via RB1 e TP53 / DREAM ed è up-regolata in presenza di RB1 o inattivazione di TP53 [47,48].

L'isoforma TOP2B coopera con AR nell'attivazione dei geni target (ARGs), sotto il controllo del recettore, facilitando il riarrangiamento genico nel 50% dei PCa.

È stato riportato che l'alta espressione dell'isoforma TOP2A contribuisce alla progressione del PCa sostenendo l'attività di AR e inducendo un fenotipo cellulare più aggressivo, inoltre l'etoposide è risultata più efficace in un ambiente a rapida proliferazione cellulare accompagnato dall'over-espressione di TOP2A.

Studi preclinici hanno mostrato che il trattamento dei CRPC con etoposide in monoterapia risulta poco efficace, mentre usata in combinazione con altri agenti come a esempio l'estramustina, migliora la propria efficacia, prolungando la sopravvivenza dei pazienti.

Contestualmente a quanto sopra, il lavoro riguardante questa tesi è stato incentrato sullo studio più approfondito degli effetti dell'etoposide, valutando l'efficacia dei trattamenti sulle linee cellulari AVPC e studiando la modalità di espressione delle proteine target con metodologie di proteomica e di bio-informatica.

2.5 Etoposide e inibitori della Topoisomerasi 2.

La Topoisomerasi 2 è un iso-enzima che up-regola il Signaling di AR ed è stato associato alle forme più aggressive di PCa, alla progressione metastatica e a una ridotta sopravvivenza dei pazienti [8-12].

Uno studio condotto dal gruppo di Haffner ha anche rivelato una stretta relazione intercorrente tra AR e TOP2B, e un coinvolgimento nella produzione di fusioni geniche TMPRSS2-ERG, frequentemente osservate in pazienti con PCa [54].

L'etoposide agisce sulla TOP2 attraverso il cosiddetto "trapping", ovvero tramite un meccanismo di intrappolamento fisico che facilita di conseguenza la stabilizzazione dei complessi TOP2-DNA, generando rotture del DNA e impedendone la riparazione [46].

Il mitoxantrone, analogamente alla doxorubicina, stabilizza meno efficacemente dell'etoposide questi complessi TOP2-DNA e si è visto che somministrato ad alte concentrazioni agisce come un inibitore catalitico di TOP2 [55].

Data la stabilizzazione dose-dipendente dei complessi TOP2-DNA indotta dall'etoposide, questo farmaco sembra essere in questo momento il miglior candidato per il trattamento dei PCa che over-esprimono TOP2.

Inoltre, è stato dimostrato che l'etoposide inibisce efficacemente il legame con il ligando di AR, supportando ulteriormente il suo utilizzo per i trattamenti del PCa [56].

Nel presente studio, abbiamo analizzato gli effetti dell'etoposide in diversi modelli in vitro di PCa rispetto ad altri trattamenti standard e la possibile relazione che intercorre tra l'espressione delle isoforme TOP2 e l'attività citotossica dell'etoposide.

Tramite successivi esperimenti e analisi bio-informatiche, abbiamo in seguito studiato la possibile correlazione tra l'espressione della TOP2 e i dati clinici di pazienti con mCRPC al fine di fornire indicazioni utili per il reclutamento e la stratificazione di pazienti potenzialmente candidati al trattamento con l'etoposide.

3.0 Materiali e metodi

3.1. Colture cellulari e prodotti chimici.

Tutti gli esperimenti in vitro sono stati condotti utilizzando modelli cellulari fenotipicamente e molecolarmente distinti che mimano le diverse fasi della progressione del PCa.

Come visualizzato nella *figura 3* sottostante, abbiamo utilizzato un pannello di linee cellulari di PCa comprendente le linee LNCaP, PDB, MDB, 22Rv1, PC3 e DU145 in grado di simulare la progressione del carcinoma prostatico verso le forme intermedie e quelle più resistenti e aggressive AVPC:

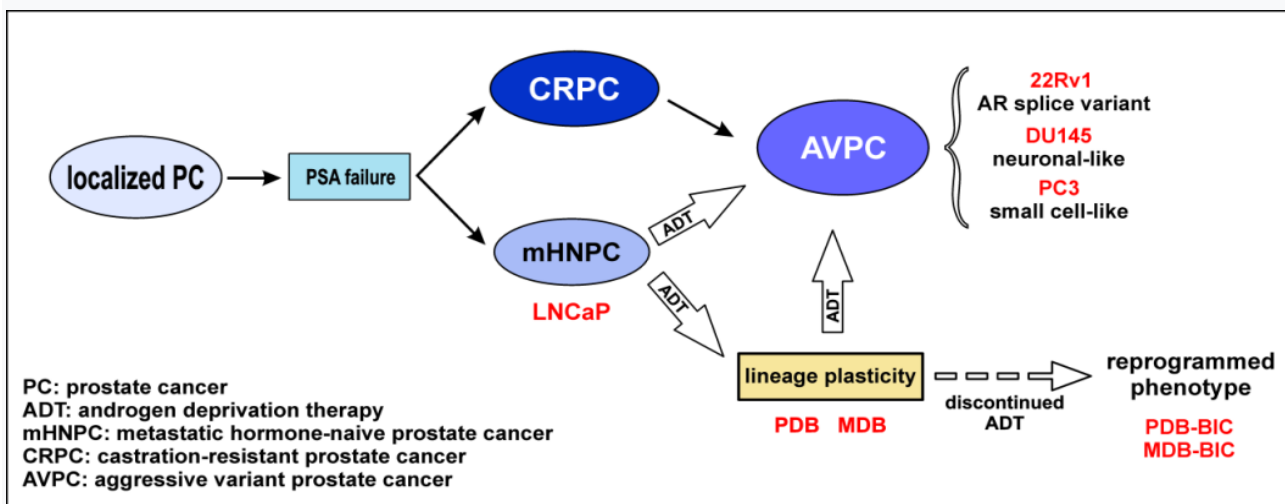


Figura 3.

Schema riassuntivo dei modelli che mimano l'evoluzione del PCa verso gli stadi intermedi e avanzati della malattia.

Nella sottostante *tabella 2* vi è un riassunto delle principali caratteristiche delle linee cellulari correlate all' espressione e alla funzionalità del recettore androgenico e della sua variante.

cell line	origin	doubling time	AR mutation	androgen sensitivity	AR status	AR expression	ARv7 expression	PSA expression	note
LNCaP	lymph node metastasis	60-70 h	T877A	androgen dependent	active	+	-	+	prostatic adenocarcinoma
22Rv1	primary PCa	35-40 h	H874Y	androgen independent	active	+/-	+	+/-	human prostate carcinoma xenograft from castration resistant cell line
PC3	bone metastasis	30 -35 h		androgen independent	not detected	-	-	-	small cell-like phenotype
DU145	brain metastasis	30 -35 h		androgen independent	not detected	-	-	-	neuronal-like phenotype
PDB	over 1-year LNCaP treatment with 10 μ M BIC and 10 nM DHT	40 -50 h	T877A	Hyper-sensitive	partially active	+	-	+/-	adaptive phenotype, lineage plasticity
MDB	over 1-year LNCaP treatment with 10 μ M BIC	40 -50 h	T877A	androgen independent	inactive	+	-	-	adaptive phenotype, lineage plasticity

Tabella 2.

Tabella raggruppante i vari modelli proposti per lo studio sulla base dell'origine cellulare, della sensibilità verso gli androgeni, della presenza o della funzionalità del recettore androgenico e delle sue varianti e all'espressione del marcatore prostatico specifico.

Le cellule di cancro alla prostata umana LNCaP, 22Rv1, DU145 e PC3 sono state acquistate dalla American Type Culture Collection (CRL1740, CRL2505, HTB81, CRL1435) e coltivate in terreno RPMI 1640 con aggiunta di FBS al 10%, glutammina 2mM e soluzioni di penicillina / streptomicina all'1% (Celbio, Milano, Italia).

Il mezzo di coltura per le linee LNCaP e 22Rv1 è stato inoltre addizionato di glucosio allo 0,25%, di piruvato di sodio 10 mM e di HEPES 10 mM.

Le linee cellulari PDB e MDB sono state coltivate in terreno RPMI-1640 privo di rosso fenolo, contenente FBS al 10% trattato ai carboni attivi (charcoal) per rimuovere la componente ormonale, 1% di penicillina, 1% di streptomicina, 1% di glutammina, 10 μ M di bicalutamide (Sigma), con o senza 5- α -diidrotestosterone (DHT, Sigma) 0,1 nM rispettivamente per PDB e MDB.

Tutte le linee cellulari sono state controllate regolarmente per la presenza di micoplasma.

L'analisi STR per l'autenticazione delle linee cellulari è stata effettuata presso la Banca Biologica del nostro istituto.

Le linee PDB e MDB rappresentanti le cellule tumorali che acquisiscono caratteristiche intermedie di resistenza, sono state ottenute dalla linea LNCaP attraverso pressione selettiva tramite coltura con bicalutamide (un farmaco antiandrogeno non steroideo) come descritto in precedenza [57], secondo lo schema di trattamento mostrato nella *figura 4* sottostante:

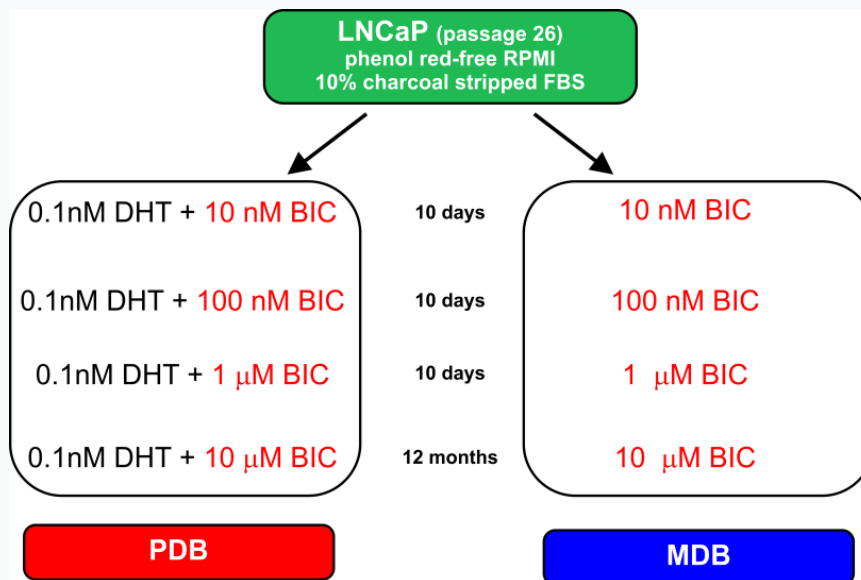


Figura 4.

L'etoposide (341205) è stata acquistata presso la ditta Merck-Millipore, mentre l'enzalutamide (MDV3100), il docetaxel (S1148) e l'olaparib (AZD2281) provengono dalla ditta Sellechem.

Per ogni sostanza chimica, la soluzione madre concentrata è stata dissolta in DMSO (Carlo Erba), preparata e mantenuta a -20 °C, e diluita al momento in mezzo appropriato per ogni esperimento.

3.2. Saggi di proliferazione cellulare.

Per valutare gli effetti dei vari trattamenti con gli agenti chemioterapici sulla proliferazione cellulare, è stato eseguito il test di citotossicità al cristal-violetto.

Le cellule sono state seminate a diverse concentrazioni a seconda del loro tempo di raddoppio (*ved. tabella 2, pg.22*) in piastre da 96 pozzetti a fondo piatto e trattate per 120 ore con varie concentrazioni di etoposide (0,1-10 μM), docetaxel (0,1-10 nM), enzalutamide (0,1-20 μM) e olaparib (1-20 μM).

A metà del trattamento è stato aggiunto terreno di coltura fresco con medesime concentrazioni di farmaco.

I dati sulla proliferazione cellulare sono stati calcolati come percentuale del valore di assorbanza per le cellule non trattate (0,1% DMSO).

Per una corretta significatività sperimentale, sono stati fatti almeno tre esperimenti indipendenti, ciascuno eseguito per 10 volte.

Utilizzando il software ED50plus v1.0, abbiamo valutato la concentrazione di farmaco richiesta per l'inibizione del 50% della crescita cellulare (IC50).

Per confrontare la risposta al trattamento con etoposide tra i modelli in vitro PCa, abbiamo valutato per ciascuna linea cellulare la concentrazione del farmaco richiesta per l'inibizione della vitalità del 50% (IC50) e il suo rapporto con l'IC50 della linea di riferimento LNCaP ($R_{ln} = \text{linea cellulare IC50 valutata} / \text{IC50 LNCaP}$).

Per $R_{ln} < 1$, il trattamento con etoposide risulta più efficace rispetto alla linea cellulare LNCaP, mentre per $R_{ln} > 1$ l'etoposide è meno efficace rispetto alla linea LNCaP.

Per testare l'efficacia del trattamento con etoposide rispetto ad altri agenti antineoplastici, abbiamo valutato il rapporto tra l'inibizione della crescita cellulare di ciascun farmaco verso l'etoposide ($R_{et} = \text{IC50 farmaco valutato} / \text{IC50 etoposide}$).

Per $Ret > 1$, il trattamento risulta meno efficace dell'etoposide, mentre per $Ret < 1$ il farmaco è più citotossico dell'etoposide.

3.3. Estrazione delle proteine e analisi in Western Blot.

L'estratto proteico totale delle linee cellulari LNCaP, 22Rv1, DU145, PC3, PDB e MDB è stato ottenuto utilizzando RIPA lysis buffer come riportato in precedenza [58], attraverso una metodica che permette di isolare le proteine totali da cellule in coltura e di solubilizzare i campioni da utilizzare per analisi in elettroforesi su gel di acrilammide mono e bidimensionali.

Tutte le operazioni della metodica sono state eseguite a 4 °C; i vari tamponi necessari di solubilizzazione e di estrazione (PBS e RIPA), sono stati addizionati con inibitori delle proteasi, DTT, ortovanadato di Na e portati al pH richiesto poco prima dell'utilizzo. Le proteine sono state inoltre precipitate con M.A.T.F (una soluzione di Metanolo-Acetone-Tributil-fosfato) prima di passare alla fase di dosaggio.

La concentrazione finale delle proteine estratte è stata determinata mediante DC Protein Assay di Biorad.

La medesima quantità di proteine (8 µg) è stata risolta mediante elettroforesi su gel SDS-PAGE, trasferita attraverso western blot (WB) su membrana Hybond-P (GE Healthcare Life Sciences) e ibridizzata per una notte a 4 °C con anticorpi policlonali anti-TOP2A (Proteintech, diluito 1: 500), anti-TOP2B (Proteintech, diluito 1: 500), anti-PARP1 (Santa Cruz, diluito 1: 1000), anticorpi anti-PSA (Cell Signaling Technology, diluito 1: 2000) e anticorpi monoclonali anti-AR (DAKO, anticorpo diluito 1: 600). Dopo lavaggi con TBST le membrane sono state incubate 1 ora a temperatura ambiente con anticorpi secondari anti immunoglobuline di topo o di coniglio coniugati con HRP (Cell Signaling Technology, entrambe diluite 1: 2000).

Successivamente, le bande immuno-reattive sono state rivelate usando reagenti Immobilon Western (Millipore) e lastre radiografiche Hyper film ECL (GE Healthcare Life Sciences).

L'analisi quantitativa dell'espressione delle proteine sotto studio è stata valutata in tre differenti esperimenti in WB (immagini originali riportate in *Figura 5, pg.29*) e normalizzata per la concentrazione proteica totale valutata su un corrispondente gel colorato con Sypro Ruby (ved. *Fig. 6, pg.30*).

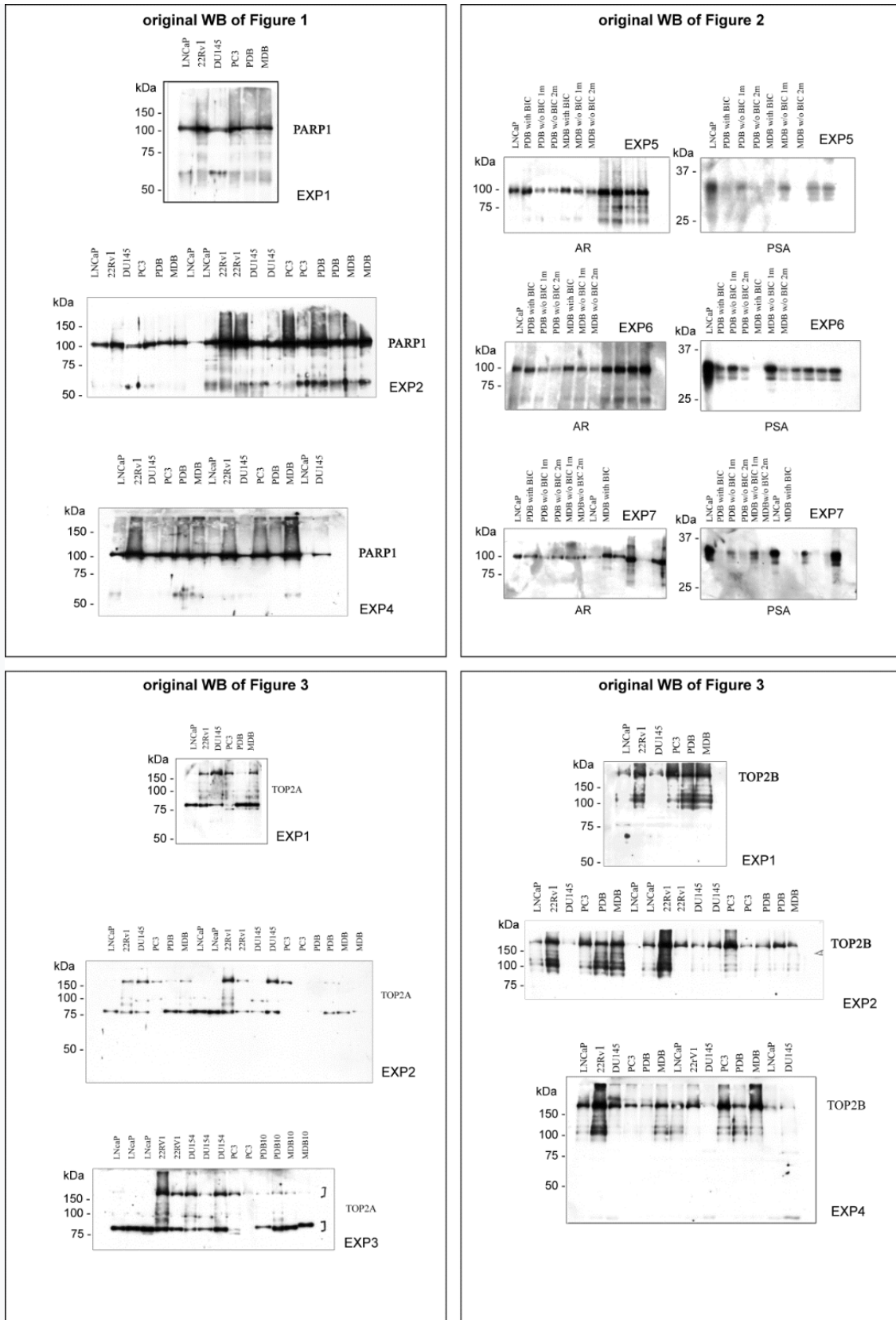


Figura 5.

Saggi in Western Blot sugli estratti proteici totali, diretti contro AR, PSA, PARP1, TOP2A e TOP2B.

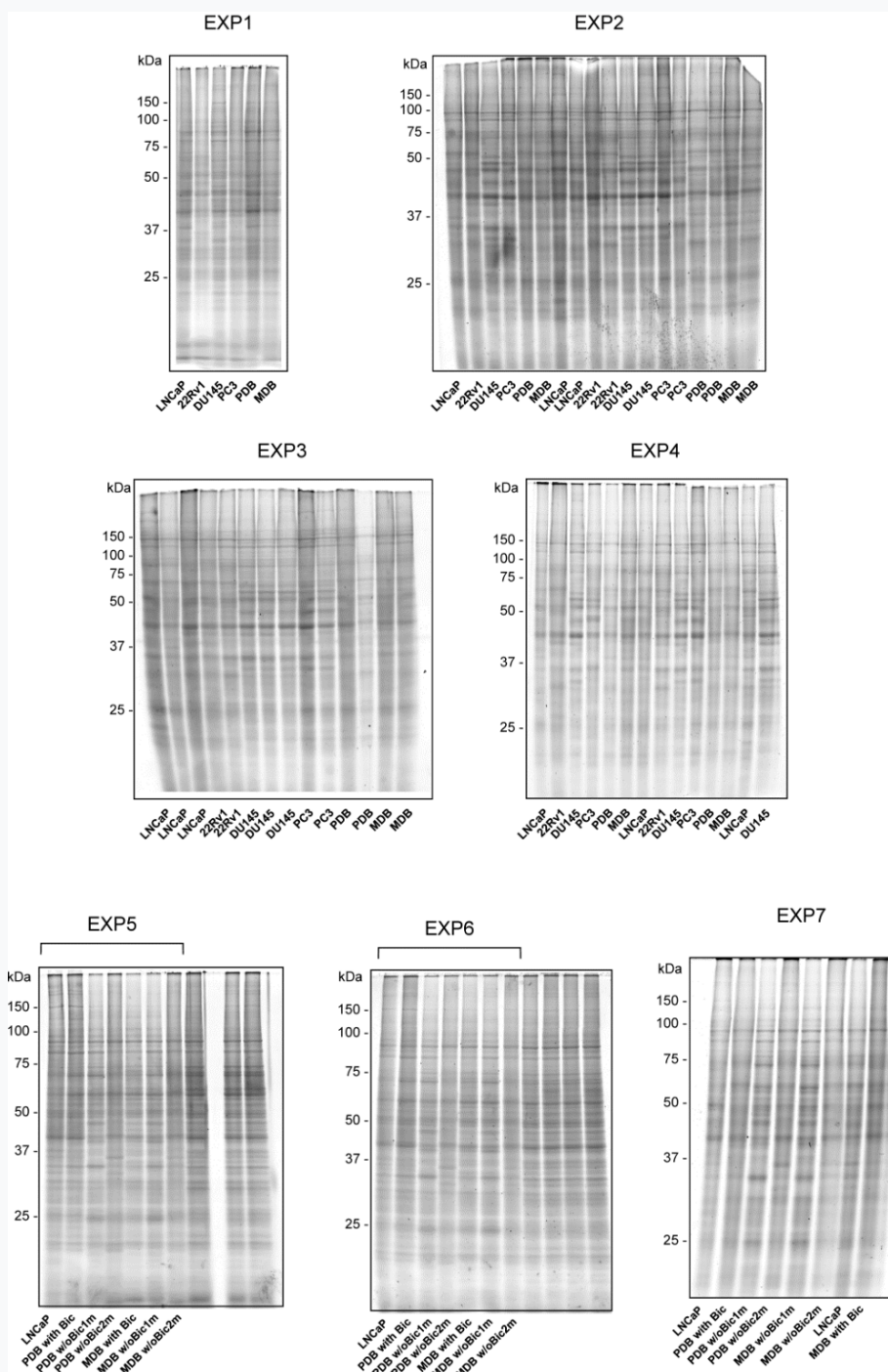


Figura 6.

Gel di acrilammide corrispondenti ai WB, colorati con Sypro Ruby per la normalizzazione delle quantità proteiche. (ved.par.3.3 bis)

3.3 bis Metodi di normalizzazione in WB

Il metodo utilizzato nel nostro laboratorio per la quantificazione delle bande proteiche in WB è simile a quella utilizzata dal gruppo di Eaton et al. (PlosOne 2013, 8, e72457).

Uguali quantità di estratto proteico totale proveniente della stessa preparazione sono state caricate su due gel di acrilammide monodimensionale 1D e corse elettroforicamente in modo contemporaneo in identiche condizioni di funzionamento (vasca elettroforetica, tamponi, power-supply).

Uno dei due gel è stato colorato con colorante Sypro Ruby e la sua immagine è stata acquisita con uno scanner densitometrico Pharos FX Plus (Bio-Rad).

La quantità totale di proteine per ogni lane, espressa come densità ottica integrata (IOD_{tot}), è stata ottenuta mediante la scansione di ciascuna lane del gel tramite il software Quantity One.

Il secondo gel è stato blottato e ibridizzato con anticorpi specifici, successivamente le bande immuno-reattive sono state rivelate usando reagenti Immobilon Western (Millipore) e lastre radiografiche Hyper film ECL (GE Healthcare Life Sciences).

La densità ottica di ciascuna banda (IOD) è stata determinata disegnando una casella attorno alla banda stessa sull'immagine scansionata (attraverso acquisizione con densitometro GS-800).

Le quantità relative delle bande immunoreattive sono state ottenute normalizzando la densità ottica integrata mediante ECL (IOD_{banda}) per la densità ottica integrata (IOD_{tot}) della corsia corrispondente nel gel colorato con Sypro Ruby.

Per ridurre le differenze derivanti da possibili fluttuazioni delle condizioni sperimentali del WB, è stata caricata sui gel una quantità fissa (8 µg) di standard proteico, dopodiché il rapporto IOD_{banda} / IOD_{tot} è stato normalizzato con lo standard rilevato tramite ECL.

Questo metodo ci ha permesso di ottenere risultati quantitativi confrontando repliche sperimentali sia biologiche che tecniche.

Questa procedura è stata usata in modo regolare e soddisfacente nel nostro laboratorio per molti anni (a esempio cito Barboro et al. *Exp Cell Res* 2002, 279, 202; Coradeghini et al. *Oncol. Rep* 2006, 15, 609; Barboro et al. *Exp Cell Res* 2009, 315, 226; Barboro et al. *Prostate* 2011,71, 1466; Ferrari et al. *Cell Commun Signal* 2017, 15, 51).

A tal proposito, di recente abbiamo anche dimostrato che l'approccio convenzionale non può essere utilizzato per analisi quantitative WB che confrontano linee cellulari differenti.

In effetti, sono stati ottenuti risultati diversi utilizzando dati normalizzati di actina o Sypro Ruby per valutare la quantità relativa delle proteine AR e hnRNP K negli estratti totali da LNCaP, PDB e MDB:

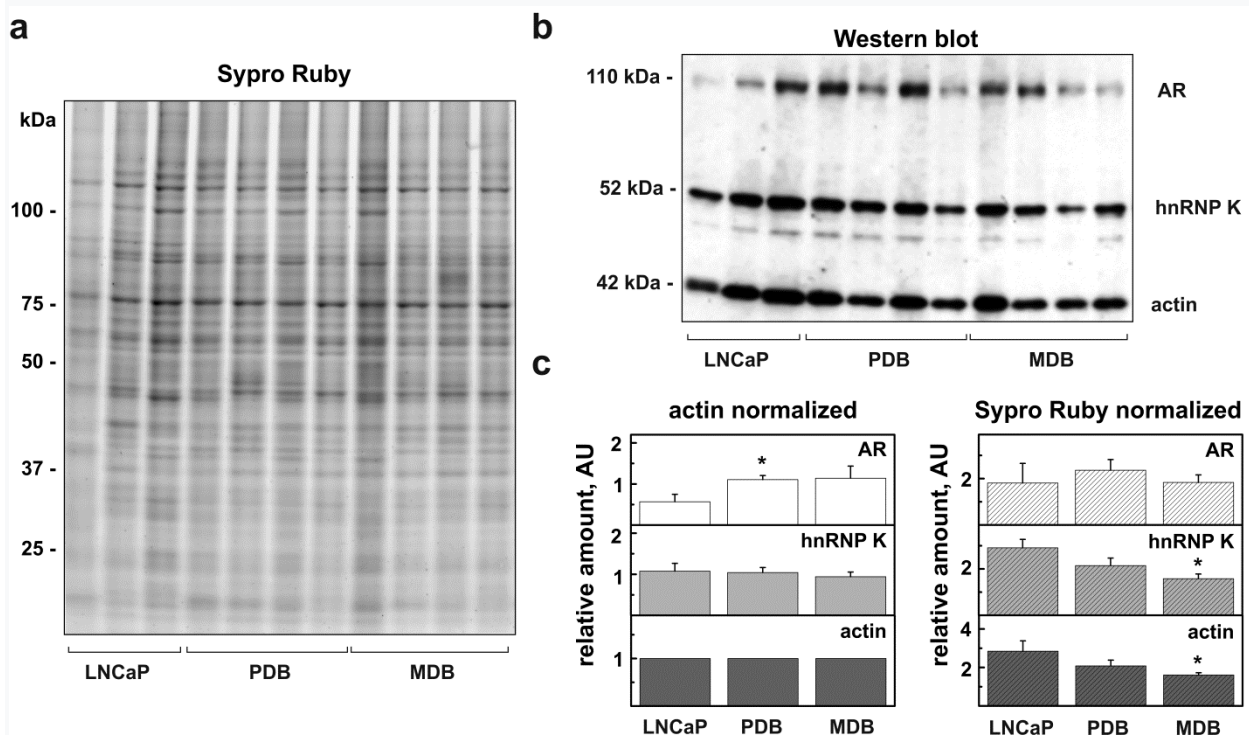


Figura 7.

Confronto tra Sypro Ruby e normalizzazione dell'actina per analisi quantitative in WB. Dopo la separazione elettroforetica di 8 μ g di interi estratti cellulari LNCaP, PDB e MDB, un gel di

acrilamide è stato colorato con Sypro Ruby (**a**) mentre l'altro è stato blottato e ibridizzato con anticorpi anti AR, hnRNP K e actina (**b**).

L'analisi quantitativa è stata eseguita normalizzando per l'actina o per il contenuto proteico totale valutato su gel colorato con Sypro Ruby (**c**). * $p < 0,05$ (test *t* di Student).

3.4. Saggi di invasione.

I test di invasione sono stati condotti a 48 ore in tre repliche sperimentali.

Le linee cellulari sono state seminate in terreno in assenza di siero FBS (serum-free) con 0,1% di DMSO come controllo o con 1 μ M di etoposide (dose corrispondente al valore di \geq IC60) e posto nelle camere Matrigel (BD Bio Coat).

Come chemiotattico è stato utilizzato terreno di coltura addizionato con 20% di siero FBS.

3.5. Analisi statistica

Per calcolare le differenze statistiche tra due gruppi è stato utilizzato il test *t* di Student a due code; gli istogrammi riportano i dati espressi come media \pm errore standard (SE) e i valori di *p* sono stati considerati statisticamente significativi quando $p < 0,05$.

3.6. Analisi di TOP2 in dataset su larga scala.

Utilizzando i dataset disponibili sul database cBioPortal (<http://cbioportal.org>) [59,60], abbiamo studiato l'associazione delle isoforme TOP2A e TOP2B con le caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti con tumore prostatico.

L'analisi differenziale dell'espressione dei trascritti di TOP2A e TOP2B in varie condizioni patologiche è stata effettuata con il tool bio-informatico GEO2R (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) su quattro dataset GEO (GSE70768, GSE32269, GSE101607 e GSE32967), mentre per l'analisi dell'arricchimento funzionale è stato utilizzato il software STRING.

4.0 Risultati.

4.1. Valutazione dell'attività citotossica dell'etoposide su modelli di PCa in vitro a diverso stato funzionale di AR.

Al fine di investigare sulla rilevanza clinica dell'etoposide nel trattamento dei PCa, abbiamo testato questo farmaco sulle linee cellulari LNCaP, 22Rv1, PC3, DU145, PDB e MDB, in base all'attività di AR e in base alla sensibilità verso gli androgeni (*ved. Tab.2, pg.11*).

Le linee cellulari del modello purtroppo hanno un tempo di crescita molto lento; per avere il 70/80% di confluenza necessaria per avere risultati consistenti, il trattamento necessita di un time-course della durata di sette giorni, secondo lo schema sottostante:

Il trattamento delle cellule di PCa per 120 ore con concentrazioni scalari di etoposide provoca una significativa inibizione della crescita cellulare in modo dose dipendente per tutte le concentrazioni testate, come visualizzato nella *figura 8* seguente:

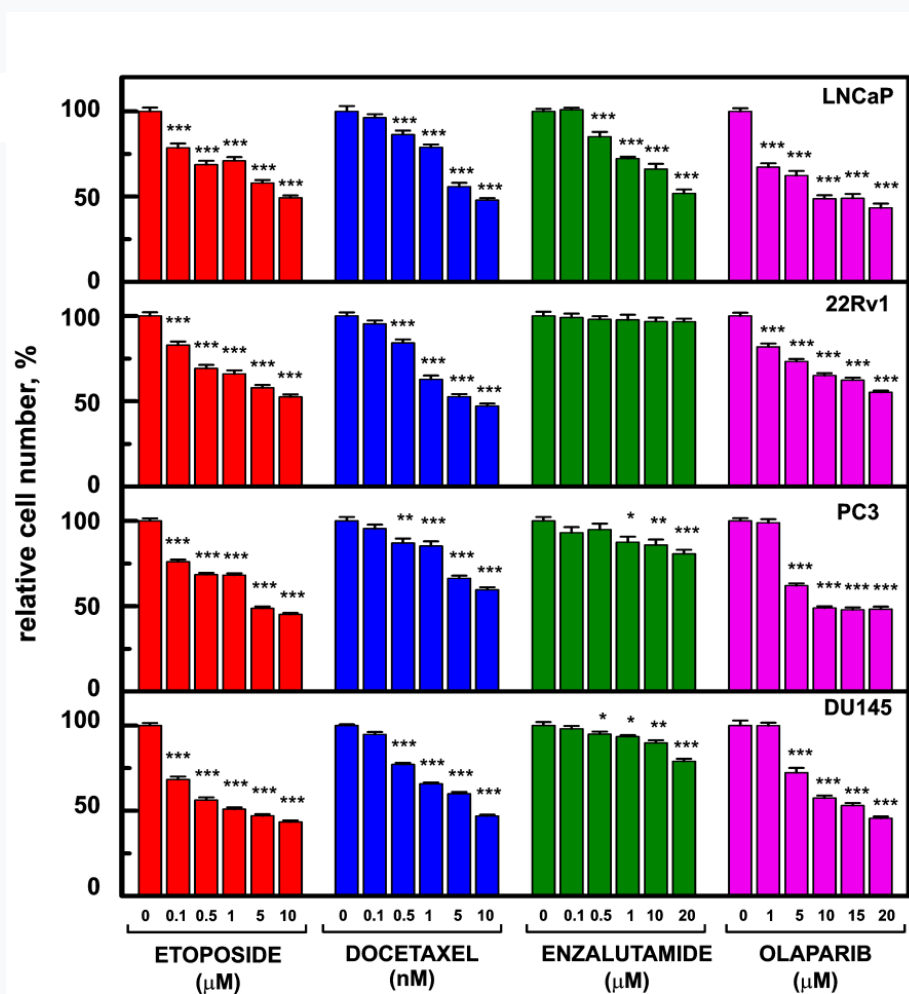


Figura 8.

Vitalità cellulare delle linee cellulari LNCaP, 22Rv1, PC3 e DU145 trattate per 120 ore con concentrazioni crescenti di etoposide, docetaxel, enzalutamide e olaparib. La media \pm SE dei 3 esperimenti è indicata. Gli asterischi indicano una significatività statistica rispetto alle cellule non trattate (0,1% DMSO).

Come si evince dagli istogrammi riportati in *figura 8*, l'effetto inibitorio dell'etoposide è pressoché uguale sulle linee LNCaP e 22Rv1 ($R_{ln} \approx 1$), mentre un aumento dell'effetto citotossico è visibile nelle linee DU145, PC3, PDB e MDB ($R_{ln} < 1$) (*ved. Tab. 3, pg.42*).

Parallelamente ai test di citotossicità, è stato eseguito un test di invasione cellulare a 48h su camerette di Matrigel, in presenza di etoposide alla concentrazione di $1\mu\text{M}$.

Il risultato del test mostra oltre a un incremento di aggressività in tutte le linee cellulari resistenti, una maggior efficacia inibitoria di invasione nelle linee PC3 e DU145 a fenotipo neuroendocrino AR-negativo:

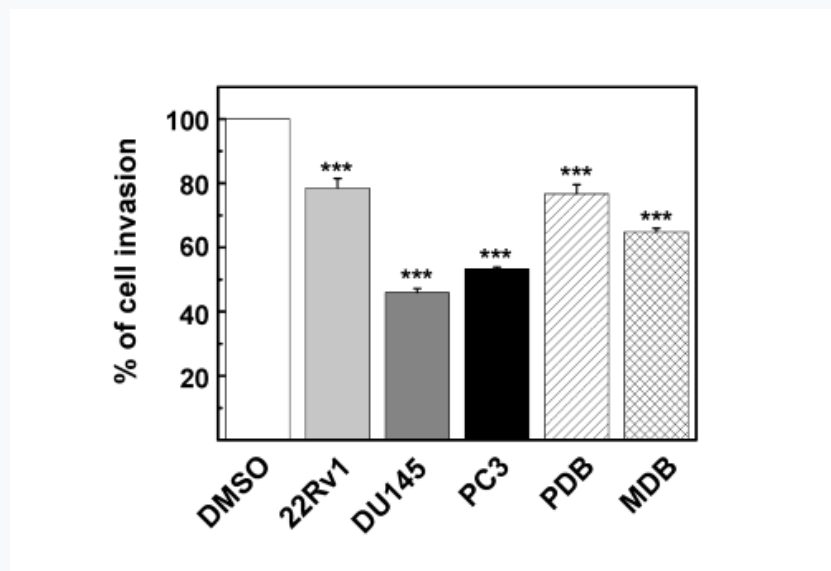


Figura 9.

*Risultati del test di invasione per le linee 22Rv1, DU145, PC3, PDB e MDB trattate con etoposide $1\mu\text{M}$ per 48 ore. Gli istogrammi riportano la media \pm SE di 3 esperimenti. Gli Asterischi indicano la significatività statistica rispetto alle cellule non trattate (0,1% DMSO) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.*

Successivamente, abbiamo confrontato l'attività citotossica dell'etoposide con quella di altri agenti antineoplastici comunemente utilizzati per la terapia PCa.

Le linee cellulari del modello sono state trattate rispettivamente con enzalutamide, docetaxel e olaparib (l'inibitore PARP-1). (ved. *Fig. 8, pg.36*)

I risultati del test mostrano che l'etoposide inibisce efficacemente la crescita, in modo dose-dipendente in tutte le linee cellulari a eccezione di LNCaP e 22Rv1 che presentano valori leggermente superiori di sensibilità per il docetaxel rispetto all'etoposide (rispettivamente valore Ret 0,92 e 0,77). (ved. *Tab. 4, pg.43*).

Da segnalare che l'olaparib ha attività citotossica indipendentemente dal contenuto cellulare di PARP-1, che è ugualmente o maggiormente espressa nelle linee cellulari resistenti, rispetto alle LNCaP androgeno-sensibili come mostrato nella *figura 10* seguente:

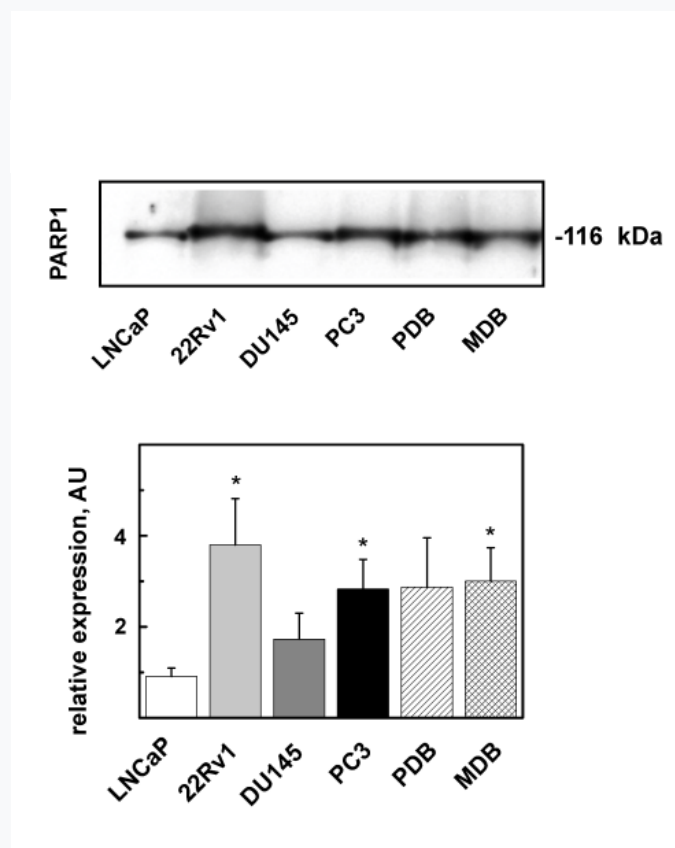


Figura 10.

Analisi in WB rappresentativa dell'espressione di PARP1 in estratti proteici totali di LNCaP, 22Rv1, DU145, PC3, PDB e MDB (in alto) e valutazione quantitativa dei tre esperimenti in WB (in basso).

Gli asterischi indicano la significatività statistica rispetto alla linea di riferimento LNCaP.

È interessante notare l'etoposide risulta più citotossica ($Ret > 1$) rispetto agli altri composti testati sulle linee con attività di AR ridotta o assente come DU145, PC3 PDB e MDB, confermando l'ipotesi che l'etoposide sia più efficace nelle forme di PCa precoci o avanzate, dove la funzionalità di AR è compromessa. (*ved. Tab. 4, pg.43*).

Per testare l'efficacia dell'etoposide rispetto all'androgeno deprivazione, abbiamo pretrattato le linee PDB e MDB in assenza di BIC e DHT per 1-2 mesi.

Queste linee (derivate dalle cellule LNCaP) sono resistenti alla bicalutamide e mostrano una significativa plasticità cellulare dopo la sospensione dell'antiandrogeno [57]; esse rappresentano nel nostro modello il fenotipo adattativo all'ADT.

Questa sorta di riprogrammazione fenotipica farmaco-mediata, mima il ripristino anti-androgenico, tenendo le cellule al massimo blocco di AR prima che si intervenga con altre opzioni terapeutiche.

In seguito, per simulare i trattamenti farmacologici abbiamo trattato le linee sopramenzionate con etoposide, docetaxel, enzalutamide per 120h a concentrazioni crescenti.

Oltre alla bicalutamide, il terreno di coltura normale per le PDB comprende DHT alla concentrazione di 0,1 nM, mentre la linea MDB cresce in assenza di DHT.

L'analisi in WB degli estratti proteici di queste cellule, dopo il ripristino androgenico, mostra una significativa rimodulazione del PSA e dell'espressione di AR, come visualizzato nella *figura 11* seguente:

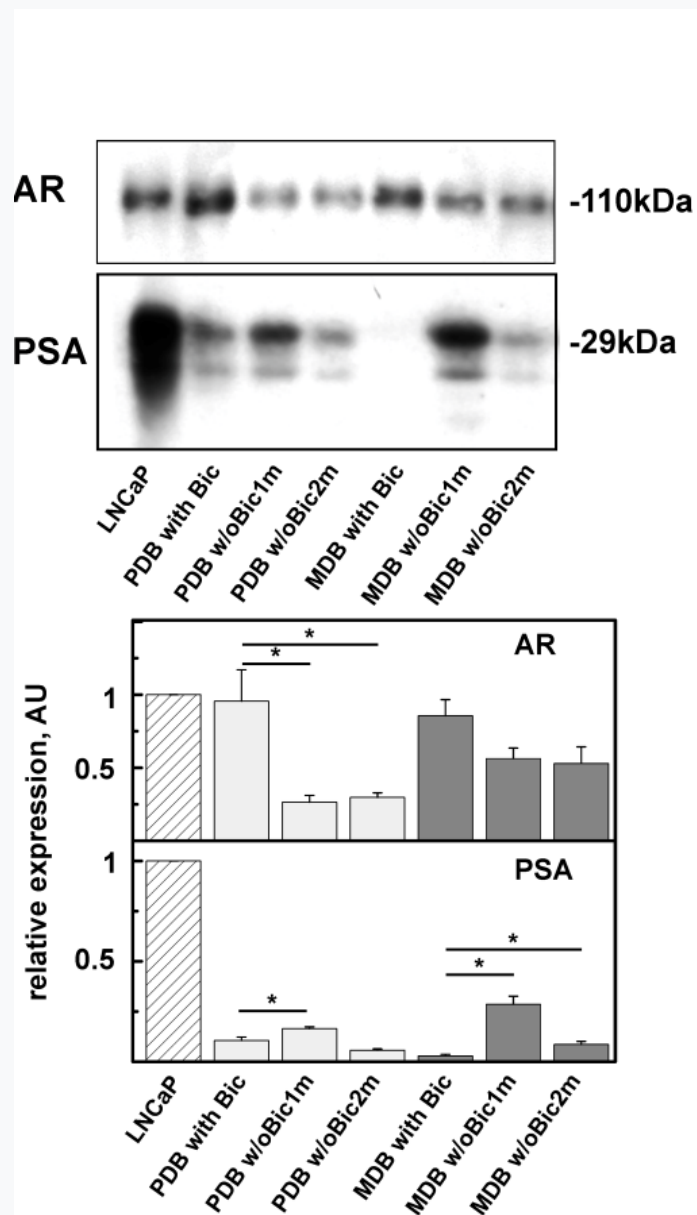


Figura 11.

Analisi in WB degli estratti proteici interi da PDB e MDB coltivati in condizioni normali (con Bic) o senza Bic e DHT (w / o Bic) per 1 o 2 mesi. Membrane ibridate con anticorpi anti-AR e anti-PSA. Le cellule LNCaP sono state utilizzate come controllo positivo. Gli asterischi indicano la significatività statistica rispetto alle linee cellulari coltivate in presenza di Bic.

Entrambe le linee cellulari mostrano una maggiore espressione di PSA, suggerendo un aumento dell'attività di AR. Inoltre, la linea PDB presenta una diminuita espressione di AR, rivelando un possibile meccanismo compensativo in grado di mantenerne l'omeostasi dopo la sospensione dell'antiandrogeno.

Utilizzando il rapporto IC50 dei trattamenti (Rbic), mostrato nella *Tabella 4* sottostante, si osserva che i trattamenti con etoposide, docetaxel ed enzalutamide mostrano una ridotta citotossicità (Rbic <1) 1 mese dopo la sospensione del trattamento con bicalutamide, rispetto alle linee cellulari parentali coltivate in regime anti-androgenico (*ved. Fig. 12*).

Cell Line	ETOPOSIDE			DOCETAXEL			ENZALUTAMIDE		
	IC50* (μ M)	se	Rbic**	IC50 (nM)	se	Rbic	IC50 (μ M)	se	Rbic
PDB with Bic	5.96	0.17	1.00	8.89	1.45	1.00	22.24	1.43	1.00
PDB w/o Bic 1 mounth	40.21	11.35	0.15	12.78	3.24	0.70	131.32	26.16	0.17
MDB with Bic	7.48	0.99	1.00	26.59	4.47	1.00	31.86	2.41	1.00
MDB w/o Bic 1 mounth	13.59	1.05	0.55	nd	nd	nd	nd	nd	nd

* IC50 is the drug concentration required for 50% growth inhibition in vitro

** Rbic=IC50 cell line with Bic/IC50 cell line w/o Bic; Rbic<1 treatment less effective than in with Bic cell line; Rbic>1 treatment more effective than in with Bic cell line; Rbic=1 effect equal to with Bic cell line

Tabella 3.

Rbic, calcolato come rapporto di IC50 delle cellule coltivate senza bicalutamide, rispetto all'IC50 delle cellule coltivate con bicalutamide.

Cell Line	ETOPOSIDE				DOCETAXEL				ENZALUTAMIDE				OLAPARIB		
	IC50* (mM)	se	Rln**	Ret***	IC50 (nM)	se	Rln	Ret	IC50 (mM)	se	Rln	Ret	IC50 (mM)	se	Rln
LNCaP	9.24	0.57	1.00	1.00	8.49	0.55	1.00	0.92	20.06	0.29	1.00	2.17	13.47	0.17	1.00
22RV1	10.31	0.82	1.12	1.00	7.96	0.30	0.94	0.77	nd	nd	nd	nd	24.62	3.81	1.83
DU145	5.05	0.51	0.55	1.00	8.47	0.03	1.00	1.68	56.06	0.95	2.79	11.10	16.14	1.37	1.20
PC3	7.04	0.36	0.76	1.00	11.86	0.52	1.40	1.69	74.61	9.13	3.72	10.60	15.10	0.91	1.12
PDB	5.96	0.17	0.65	1.00	8.89	1.45	1.05	1.49	22.24	1.43	1.11	3.73	16.94	2.65	1.26
MDB	7.48	0.99	0.81	1.00	26.59	4.47	3.13	3.55	31.86	2.41	1.59	4.26	16.25	1.77	1.21

Tabella 4.

Valutazione dell'effetto dell'etoposide sulla vitalità cellulare in diversi modelli in vitro di PCa rispetto a LNCaP o a confronto con altri farmaci antineoplastici utilizzati in terapia.

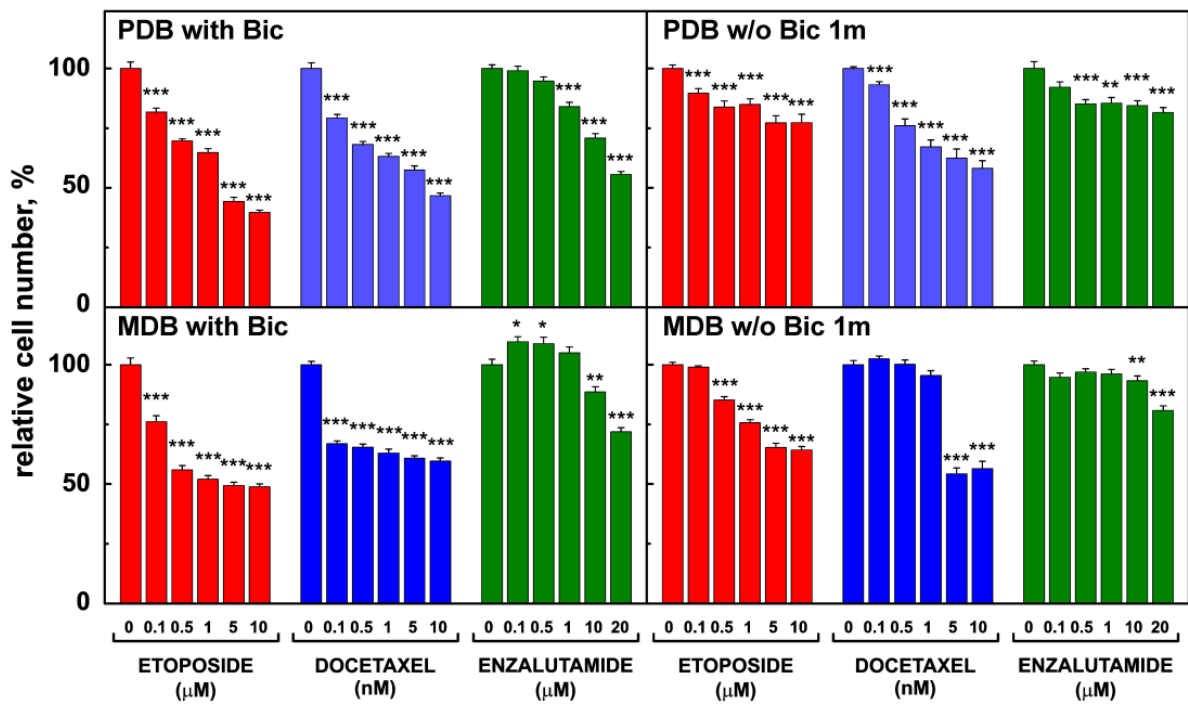


Figura 12.

Vitalità cellulare delle linee cellulari PDB e MDB coltivate in condizioni normali (con Bic) o in assenza di Bic e DHT per 1 mese (senza Bic 1m) trattate per 120 ore con concentrazioni crescenti di etoposide, docetaxel ed enzalutamide. Gli asterischi indicano la significatività statistica rispetto alle

cellule non trattate (0,1% DMSO). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Viene riportata la media \pm SE di 3 esperimenti.

4.2. Espressione di TOP2A e TOP2B in linee cellulari di PCa.

Gli estratti proteici totali provenienti dalle linee LNCaP, 22Rv1, DU145, PC3, MDB e PDB, sono stati analizzati in WB al fine di valutare l'espressione delle isoforme di TOP2:

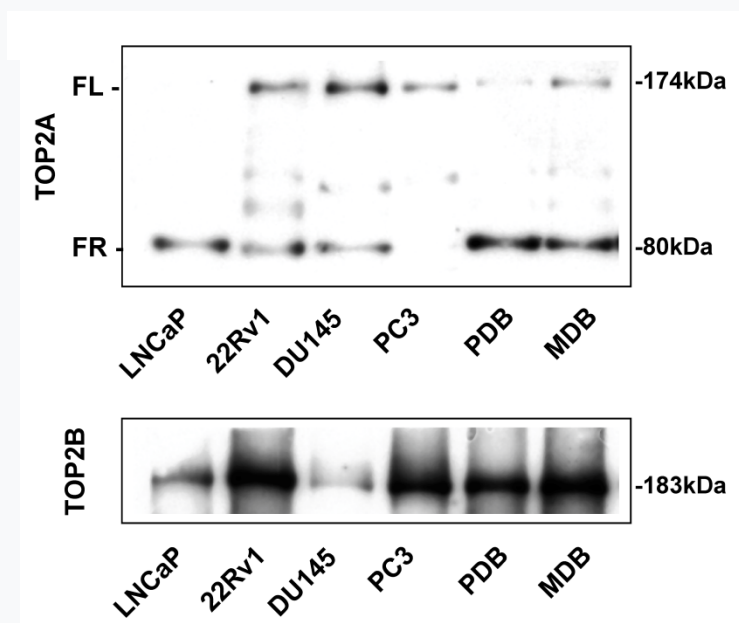


Figura 13.

Analisi in WB rappresentativa dell'espressione di TOP2A e TOP2B a lunghezza intera (FL) o in forma frammentata (FR) degli estratti proteici totali delle linee cellulari LNCaP, 22Rv1, DU145, PC3, PDB e MDB.

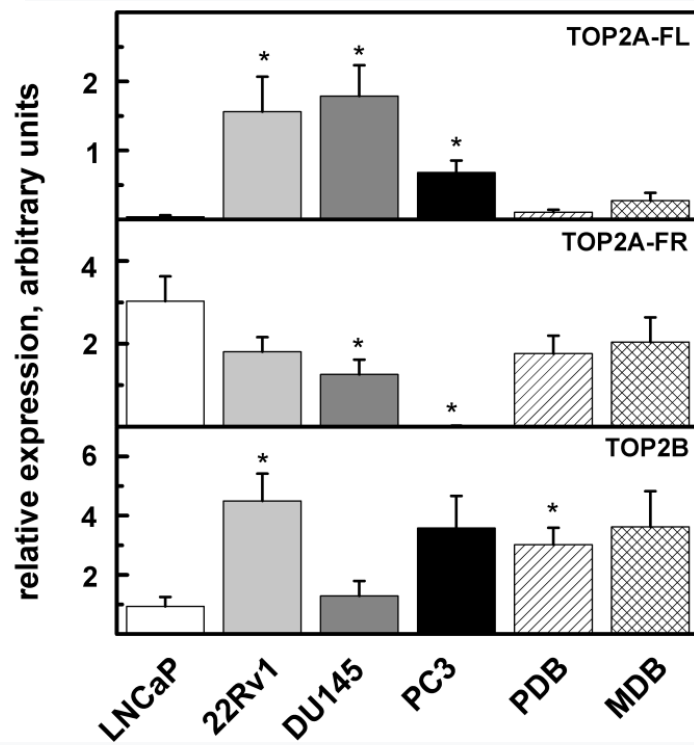


Figura 14.

Valutazione quantitativa di tre esperimenti in WB. Sono riportati i valori medi \pm SE.

Gli asterischi indicano la significatività statistica rispetto a LNCaP * $p < 0,05$.

Sebbene la distribuzione di TOP2A e TOP2B sia differente per le linee prese in esame, il contenuto totale di TOP2 è comparabile:

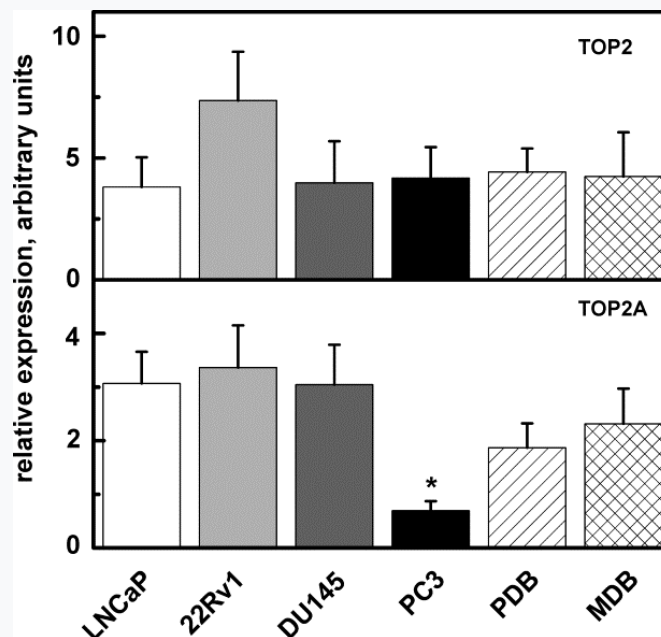


Figura 15.

Valutazione quantitativa dell'espressione totale di TOP2 (TOP2A + TOP2B) e TOP2A (FL + FR) negli estratti proteici totali delle linee cellulari LNCaP, 22Rv1, DU145, PC3, PDB e MDB.

L'istogramma rappresenta la media \pm SE di tre analisi WB.

Gli asterischi indicano la significatività statistica rispetto a LNCaP. * $p < 0,05$.

L'isoforma TOP2A full-length (TOP2A-FL) risulta scarsamente espressa nelle linee LNCaP, PDB e MDB, mentre viene maggiormente espressa nelle linee 22Rv1, DU145 e PC3 resistenti alla castrazione.

Le linee con fenotipo molto aggressivo DU145 e PC3 mostrano una minore ma significativa espressione di TOP2A in forma frammentata, rispetto alla linea di riferimento LNCaP.

Da notare, che l'etoposide in queste linee cellulari induce una significativa inibizione dell'invasione (ved. *Fig. 9, pg.37*).

L'isoforma TOP2B risulta over-espressa in modo statisticamente significativo nelle linee 22Rv1 e PDB rispetto alla linea LNCaP.

4.3. Coerenza tra i livelli di mRNA di TOP2 ed espressione della proteina.

Abbiamo quindi valutato il potenziale traslazionale dei nostri risultati in bioinformatica per studiare i profili trascrizionali delle proteine target TOP2A/B nei tessuti di PCa/CRPC e le eventuali corrispondenze a livello fenotipico.

Tramite il database GEPIA abbiamo confrontato i dati di espressione del messaggero con la proteina valutata in immunohistochimica (IHC) attraverso i dati riportati nello Human Protein Atlas (HPA).

Nonostante la significativa dispersione dei dati in entrambi gli approcci, l'analisi mostra che i profili di espressione di TOP2A/TOP2B sono coerenti con i livelli di mRNA nei tessuti tumorali e normali:

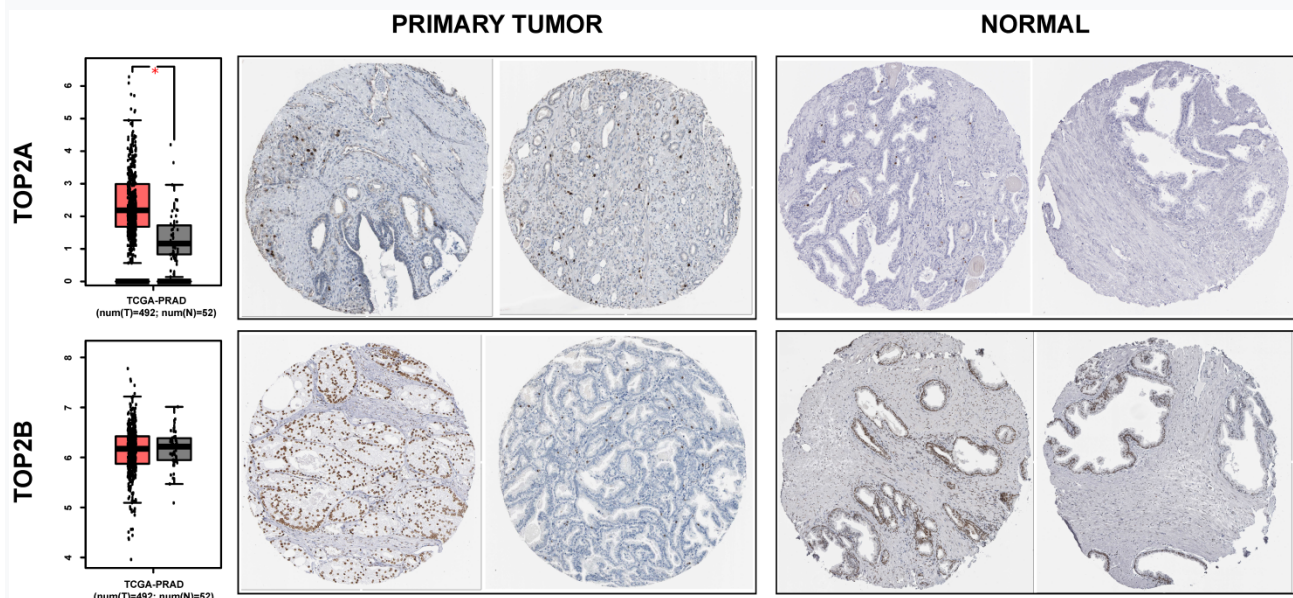


Figura 16.

Box plot della distribuzione dell'mRNA di TOP2A e TOP2B nell'adenocarcinoma prostatico TCGA (T; rosso) e nei dataset normali (N; grigio) ottenuti dal database GEPIA

($|\text{Log2FC}| = 1$, $*p < 0,001$). Tumore della prostata e immagini dei tessuti normali dei profili di espressione TOP2A e TOP2B utilizzando l'analisi in IHC recuperata dallo Human Atlas Protein (<https://www.proteinatlas.org/>).

4.4. Rilevanza delle alterazioni genetiche di TOP2A e TOP2B nei mCRPC.

Utilizzando i dati relativi alle mutazioni e alle copy number variations (CNV) forniti dal database cBioPortal, si nota che le alterazioni genetiche di TOP2A e di TOP2B sono raramente riportate nei PCa primari, mentre sono più frequentemente osservate in campioni di PCa metastatici.

Le amplificazioni di TOP2A e di TOP2B sono le alterazioni più frequenti, trovate nel 5% dei pazienti inclusi nel set di dati metastatici del Dream Team SU2C-Prostate Cancer Foundation (PCF) [20].

Nel dataset Neuroendocrine Prostate Cancer (NEPC), le amplificazioni di TOP2A e di TOP2B sono riscontrate nel 19% e nel 20% rispettivamente dei pazienti con PCa adeno-mCRPC e nel 30% e 27% di quelli con PCa mCRPC neuroendocrino [62].

In seguito, abbiamo studiato la relazione tra TOP2A e le amplificazioni di TOP2B incluse le CNV, in geni coinvolti principalmente nella biologia del PCa e nella differenziazione verso le forme neuro-endocrine NEPC.

Tramite questa analisi si identificano correlazioni significative tra le amplificazioni di TOP2A / TOP2B e AURKA, e amplificazioni di MYCN, SRRM4, FOXA1 e FOXA2 come mostrato nella *figura 17* seguente:

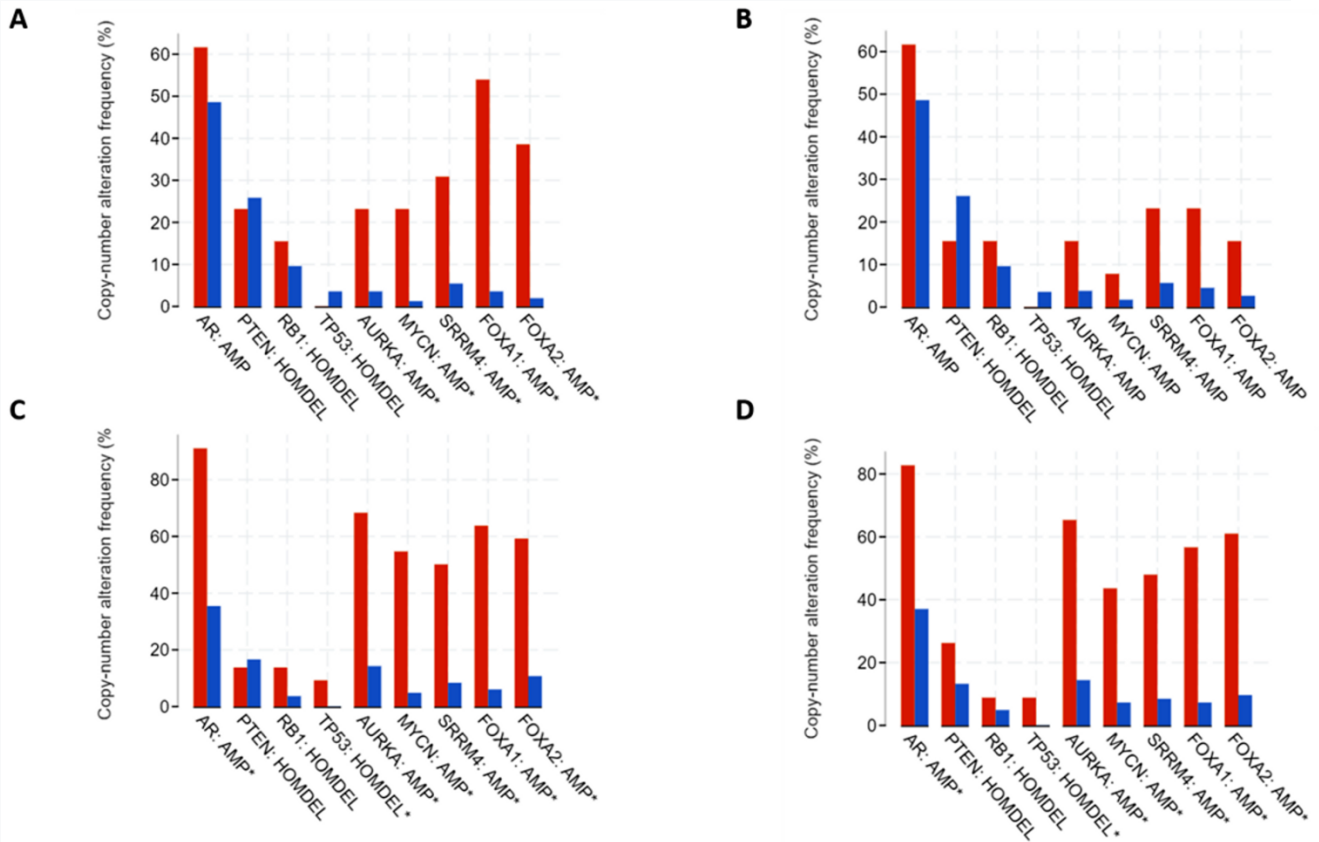


Figura 17.

Co-occorrenza di amplificazione di TOP2A (barre rosse in A e C) o amplificazione TOP2B (barre rosse in B e D) e altre alterazioni delle copy number variations nel dataset metastatico SUC2CF / PCF (A e B) e nel dataset Neuroendocrine Prostate Cancer (C e D). Le barre blu rappresentano la frequenza delle stesse alterazioni delle CNV in pazienti senza amplificazione TOP2A / TOP2B. HOMDEL: delezione omologa; AMP: amplificazione. * valore q statisticamente significativo (procedura Benjamini-Hochberg).

Da notare che l'amplificazione simultanea di TOP2A si trova nel dataset NEPC in 3 dei 4 pazienti NEPC con perdita di RB1; tuttavia non si identifica nessuna correlazione o associazione ricorrente tra le amplificazioni TOP2A o TOP2B e i dati clinici.

Inoltre, si trova una correlazione significativa tra queste amplificazioni e l'instabilità genica in entrambi i dataset [61,62].

4.5. Rilevanza dell'espressione dell'mRNA di TOP2A e di TOP2B nei mCRPC.

Abbiamo studiato la possibile associazione tra l'espressione dell'mRNA di TOP2A o TOP2B e i dati clinici per pazienti con tumore CRPC metastatico.

Nel dataset Neuroendocrine Prostate Cancer vi sono dati insufficienti sull' mRNA riguardante la topoisomerasi 2 [62] quindi non è stato possibile utilizzarlo.

Dall'analisi dei dati sui tumori metastatici provenienti dal dataset SU2C / PCF [20], si trova un'associazione statisticamente significativa tra l'over-espressione dell'mRNA di TOP2A e una scarsa sopravvivenza globale dei pazienti, come mostrato nella *figura 18* seguente:

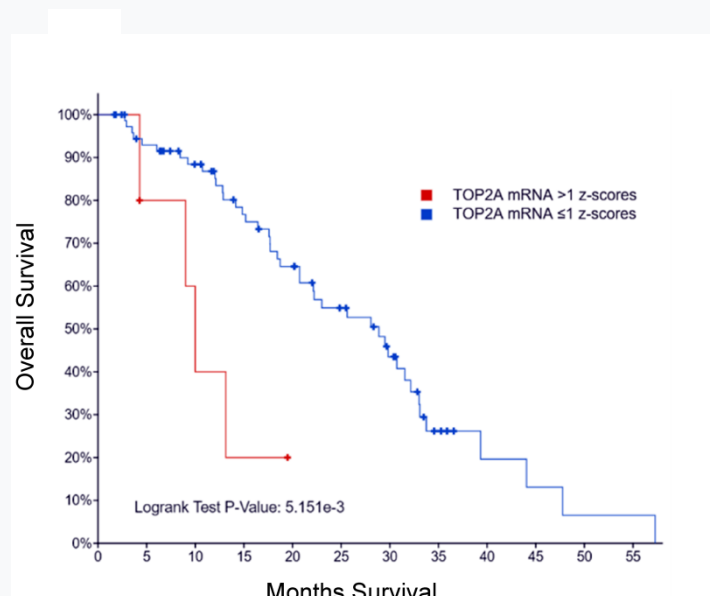


Figura 18.

Correlazione tra l'espressione dell'mRNA di TOP2A con i dati clinici nel dataset metastatico PCa SU2C / PCF. (UN)

Associazione tra l'espressione dell'mRNA di TOP2A e la sopravvivenza globale.

Nello stesso dataset, si identifica una correlazione significativa tra l'espressione dell'mRNA di TOP2A e le caratteristiche neuroendocrine e una correlazione inversa con lo score di AR come mostrato nella *figura 19* seguente:

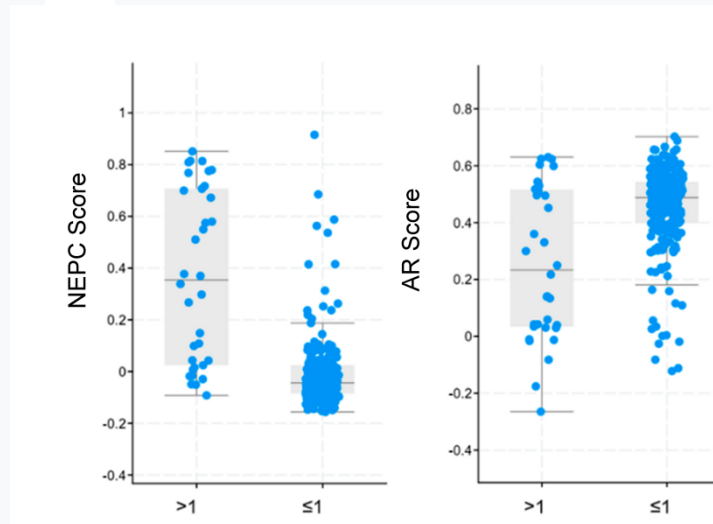


Figura 19.

Correlazione tra l'espressione dell'mRNA di TOP2A e le caratteristiche clinico/molecolari.

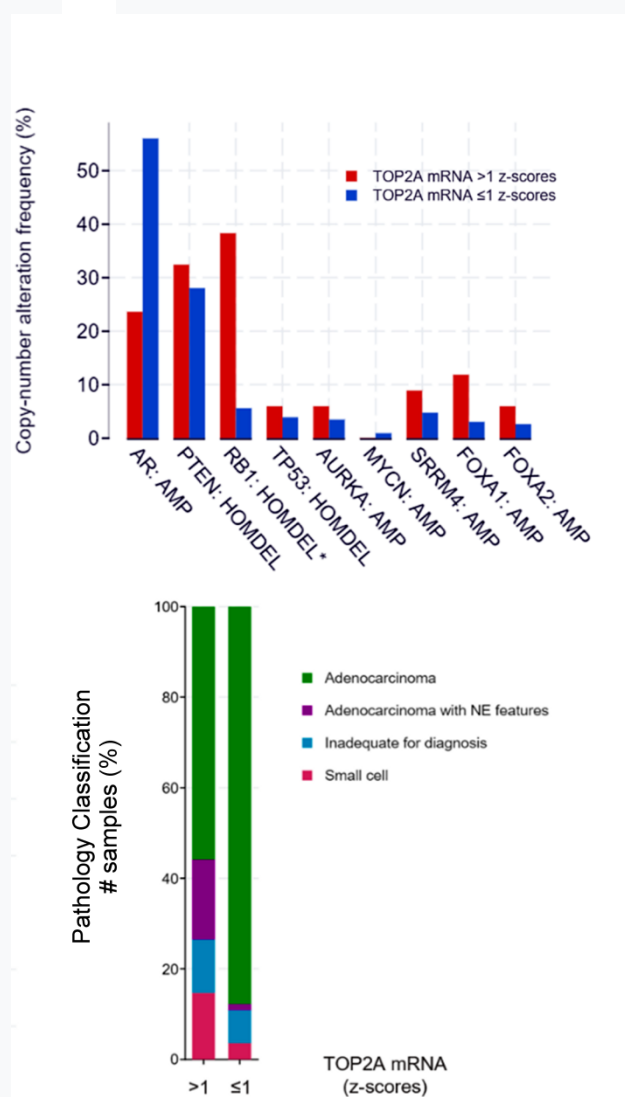


Figura 20.

Frequenza delle alterazioni delle copy number variations nei pazienti con maggiore espressione dell'mRNA di TOP2A rispetto a quelli con espressione inferiore di TOP2A.

I pazienti con maggiore espressione di mRNA di TOP2A (> 1 z-score) avevano maggiori probabilità di ospitare delezione/perdita di RB1.

AMP: amplificazione; HOMDEL: delezione omologa. * valore q statisticamente significativo, Benjamini-Procedura di Hochberg.

Questo dato è coerente con la nostra osservazione relativa alla maggiore espressione di TOP2A nelle linee cellulari resistenti alla castrazione, come a esempio nelle PC3 e nelle DU145 (*vedi Figura 13*).

Nessuna correlazione con le caratteristiche clinico-patologiche è vista nei pazienti che over-esprimono TOP2B [61].

Abbiamo indagato possibili correlazioni tra l'over-espressione di TOP2A e la presenza di modificazioni di geni comunemente alterati nei PCa metastatici e nei NEPC.

Abbiamo identificato i pazienti con maggior espressione di mRNA di TOP2A che avessero una probabilità significativamente maggiore di ospitare delezioni omologhe di RB1 rispetto a quelli che esprimevano meno mRNA di TOP2A (38,2% contro 5,5%) (*ved. Fig. 20, pg.55*).

Si osserva che i pazienti che hanno mRNA di TOP2A più espresso, sono meno soggetti a ospitare amplificazioni di AR (non statisticamente significativo).

Inoltre, l'mRNA di TOP2A è significativamente over-espresso in 43 pazienti metastatici con perdita di RB1, rispetto all'intera popolazione (valore $q = 0,007$) e che l'mRNA di RB1 è significativamente over-espresso nei PCa metastatici over-esprimenti TOP2A (valore $q < 0,001$).

Utilizzando il tool bio-informatico GEO2R, si nota che l'mRNA di TOP2A è significativamente over-espresso nei mCRPC rispetto ai PCa primari e ai tessuti normali:

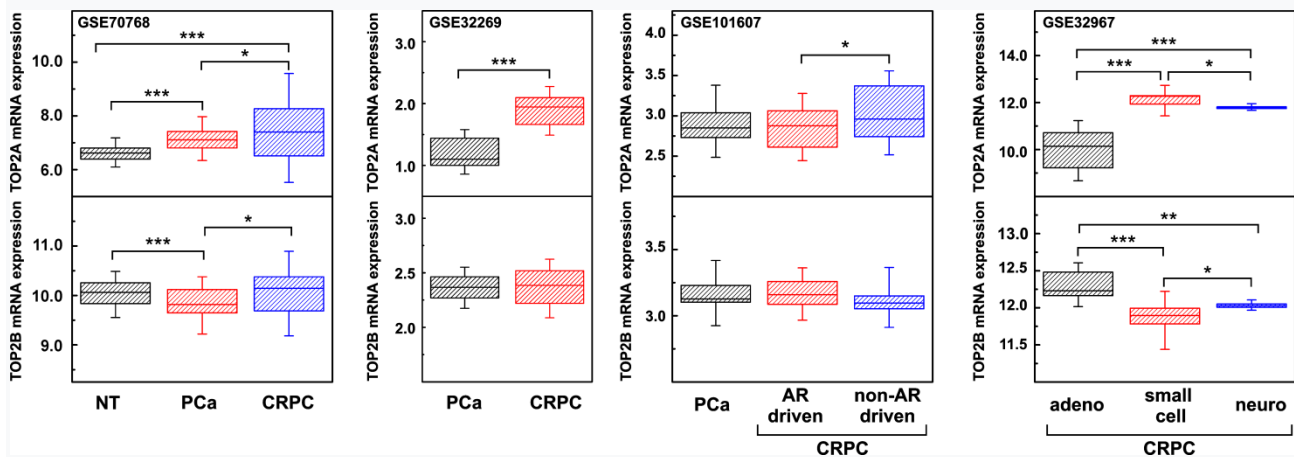


Figura 21.

Espressione dell'mRNA di TOP2A e di TOP2B nel tessuto non tumorale (NT), in PCa primario e in diversi fenotipi di mCRPC (adenocarcinoma, a piccole cellule o neuroendocrino) o classificati in relazione all'attività di AR (AR driven o non-AR driven) come riportato in GSE70768, dataset GSE32269, GSE101607 e GSE32967. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Inoltre, l'espressione dell'mRNA di TOP2A risulta più alta nei PCa AR non-driven, rispetto ai PCa sotto il controllo di AR, così come nei PCa a piccole cellule o nei PCa NE rispetto ai PCa adeno.

Per quanto riguarda i valori relativi all'espressione dell'mRNA di TOP2B, nessuna differenza sostanziale è riscontrata tra PCa primari e mCRPC; tuttavia, si osserva una significativa minore espressione di TOP2B nei PCa primari rispetto ai tessuti normali e nei PCa a piccole cellule o neuroendocrini rispetto ai PCa.

4.6. Rete di interazione di TOP2A e analisi di arricchimento funzionale.

Al fine di identificare potenziali interattori di TOP2A, abbiamo analizzato gli arricchimenti di mRNA nei pazienti con alta espressione del messaggero di TOP2A, sia nei dataset di PCa primari sia in quelli di PCa metastatici [61-62].

Separatamente per ogni gruppo di un dataset, abbiamo selezionato i primi 150 mRNA con il più alto arricchimento statisticamente significativo nei pazienti con alta espressione di TOP2A, comparati ai pazienti con espressione inferiore di TOP2A.

Nei pazienti con tumore over-esprimenti TOP2A si identifica una rete di interazione di 63 geni significativamente co-espressi con TOP2A nei dataset dei PCa primari e metastatici.

Questo network è visualizzato attraverso il database STRING e mostra un arricchimento proteina-proteina a bassa interazione con p-value (PPI) di ($<1.0e-16$), come visualizzato nella figura seguente:

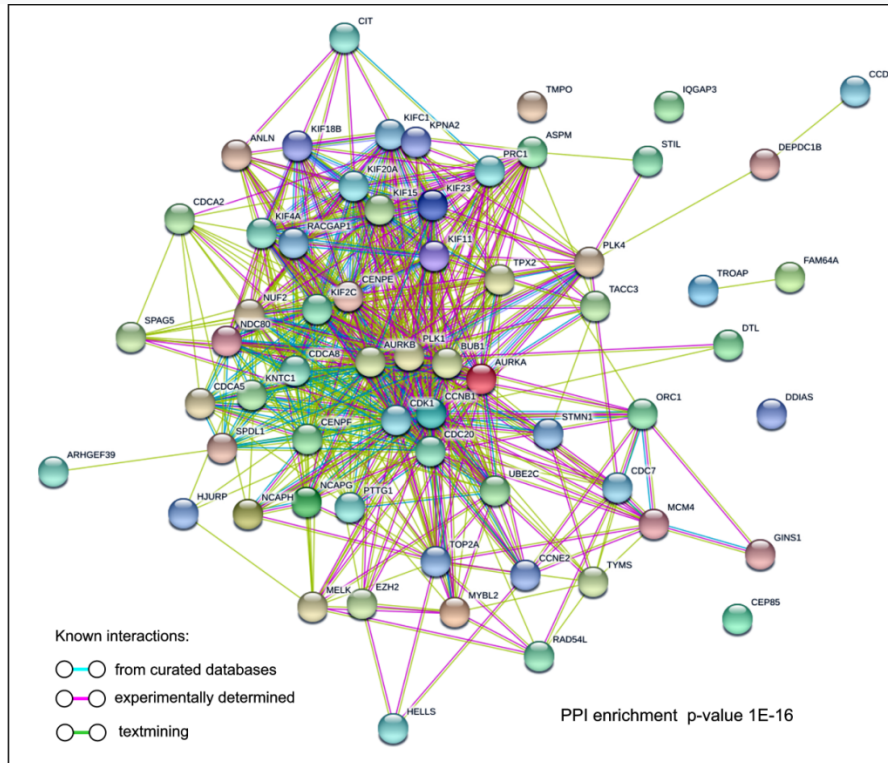


Figura 22.

Rete di interazione STRING di 63 proteine significativamente co-esprese con TOP2A sia in PCa primari che in PCa metastatici.

L'analisi dell'arricchimento in gene ontology rivelato la presenza un set di geni strettamente coinvolti nel ciclo cellulare e in processi cellulari mitotici, come AURKA, AURKB e della famiglia dei geni associati alla regolazione del ciclo cellulare.

5. DISCUSSIONE

Negli anni '90 diversi studi hanno valutato il ruolo dell'etoposide somministrata in monoterapia o in combinazione con altri agenti terapeutici per il trattamento dei carcinomi prostatici in forma mCRPC.

In questo contesto, il regime etoposide-estramustina è risultato efficace nei PCa diventando una opzione valida inclusa nelle linee guida internazionali [44].

In uno studio clinico di fase 2 nel quale sono stati arruolati 42 pazienti mCRPC “chemio-naïve”, il trattamento con estramustina associata all’etoposide, entrambe in forma orale, ha dimostrato una diminuzione del PSA ($\geq 50\%$) nel 54,7% dei pazienti e una risposta in 6/13 pazienti con malattia misurabile [64].

Nonostante i benefici, purtroppo questo tipo di terapia ha mostrato effetti indesiderati di tossicità; sono state osservate neutropenia di grado 3-4, nausea e vomito di qualsiasi grado riportati rispettivamente nel 13% e nel 76% dei pazienti [44].

L’etoposide somministrata come singolo agente per via orale senza estramustina, ha mostrato una minor tossicità, seppure con una minore attività antitumorale.

Un vecchio studio ha testato questo farmaco su 24 pazienti mCRPC, mostrando 2 risposte parziali, 2 malattie stabili e un calo del PSA di breve durata (19-68%) in 7/24 pazienti [65].

In un più recente studio randomizzato GETUG-P02, sono stati testati diversi agenti in pazienti anziani e/o fragili dopo trattamenti chemioterapici, a scopo palliativo [66].

Nella terapia con etoposide orale in associazione a prednisone, è stata osservata una diminuzione del PSA del 50% in 4/29 pazienti e una risposta analgesica nel 43% dei casi.

Sebbene questi risultati siano piuttosto deludenti, essi suggeriscono che sottopopolazioni di pazienti mCRPC attentamente selezionate, potrebbero trarre beneficio dal trattamento con questo inibitore della TOP2.

Attualmente, l'impiego dell'etoposide in combinazione con altri agenti a base di platino è valutato come opzione per il trattamento di pazienti NEPC sulla base di pochi dati sui NEPC e sulla nota efficacia di questa combinazione in pazienti con tumore del polmone a piccole cellule [4, 26, 27].

La perdita di TP53 e di RB1 è un tipo di alterazione caratteristica dei NEPC associata a cattiva prognosi [45,69].

Queste alterazioni tuttavia si riscontrano anche nei pazienti con adenocarcinoma prostatico primario e avanzato, senza caratteristiche NEPC [70].

La forma NEPC può sorgere de novo, ma spesso compare nelle fasi successive dei mCRPC come meccanismo di resistenza [71-73].

In questo contesto, la variante aggressiva del cancro alla prostata AVPC sta emergendo come un'importante entità clinica che influenza l'esito dei pazienti con mCRPC [74-75].

Le AVPC includono forme di PCa molecularmente indipendenti dalla via di AR caratterizzate da un rapido e progressivo decorso clinico [74].

Uno studio di fase II ha valutato l'attività della terapia di prima linea con carboplatino-docetaxel, seguita da cisplatino-etoposide come trattamento di seconda linea in 113 pazienti con AVPC [76].

Due cicli di seconda linea con cisplatino-etoposide hanno indotto una risposta parziale nel 30% (n = 10) dei pazienti che hanno ricevuto questo regime terapeutico e nella metà di loro (n = 17), la malattia è rimasta stabile.

In particolare, 7 pazienti (9,4%) hanno mostrato una risposta alla combinazione cisplatino-etoposide ma non a quella carboplatino-docetaxel.

Questa osservazione suggerisce che l'uso dell'etoposide potrebbe essere utile nel contesto delle strategie di trattamento delle forme AVPC.

Nel nostro lavoro abbiamo studiato l'attività dell'etoposide in modelli cellulari di PCa e la possibile relazione con l'espressione di TOP2A e TOP2B.

A questo scopo, abbiamo utilizzato il modello LNCaP sensibile alla castrazione (alla terapia di androgeno-deprivazione), modelli intermedi di resistenza alla castrazione PDB, MDB [16] e i modelli resistenti 22RV1, PC3 e DU145.

Lo studio mostra che l'etoposide risulta più attiva nelle linee resistenti alla castrazione DU145, PC3, PDB e MDB rispetto alle linee LNCaP ormono-sensibili. (*ved. Tab. 1, pg.9*).

La TOP2A è significativamente over-espressa nelle linee 22Rv1, DU145 e PC3 rispetto alla linea LNCaP, mentre l'espressione di TOP2B è aumentata nelle linee 22Rv1 e PDB rispetto alla linea LNCAP (*ved. Fig. 13, pg.45*).

L'etoposide esercita una marcata inibizione della proliferazione e dell'invasione nelle linee PC3 e DU145 che tra l'altro, mostrano un'alta espressione di TOP2A nella forma full-length (FL) e una bassa espressione di TOP2A nella forma frammentata (FR) (*ved. Fig. 14, pg.46*).

Da notare che in altri studi evidenze sperimentali hanno dimostrato che l'integrità di TOP2 è correlata con una sua maggiore attività e funzionalità [77,78].

Dato che la linea DU145 mostra una significativa sensibilità all'etoposide, nonostante i bassi livelli di TOP2B, i nostri dati suggeriscono che l'over-espressione di TOP2A, piuttosto che di TOP2B, potrebbe essere un importante marker predittivo di risposta per questo farmaco.

Le linee PDB e MDB mostrano una significativa sensibilità all'etoposide durante il trattamento con bicalutamide, mentre dopo la sospensione dell'antiandrogeno, l'attività dell'etoposide risulta diminuita (*ved. Fig. 12, pg.44*).

Un dato interessante è dato dalla linea 22Rv1 esprime la variante costitutivamente attiva del recettore androgenico AR-V7 che guida la proliferazione.

Sebbene in queste cellule si osservi un'alta espressione di TOP2A e di TOP2B, l'attività dell'etoposide risulta simile a quella osservata nelle linee LNCaP e comunque inferiore rispetto alle altre cellule resistenti all'ADT (*ved. Fig. 8 e Tab. 3, pg.36 e pg.42*).

Basandosi sulla conoscenza che l'etoposide esercita i propri effetti citotossici bloccando il legame del ligando con AR, pare logico supporre che un'asse di AR efficiente o costitutivamente attivo potrebbe antagonizzare l'attività di questo farmaco [56].

In questo contesto molecolare, i nostri modelli cellulari non solo differiscono sulla base dell'espressione di TOP2 e sull'attività di AR, ma anche su alterazioni genetiche distinte (vedi Tabella S1), pertanto l'etoposide potrebbe aumentare la propria attività farmacologica, sulla base di specifiche alterazioni presenti.

Nello specifico, le cellule della linea DU145 ospitano la mutazione non-sense RB1 K715 * che causa la perdita di funzionalità di RB1 e due mutazioni missense per TP53 (V274F, P223L).

Le cellule PC3 mostrano un'elevata espressione di RB1 con wild-type RB1, ma ospitano la delezione di PTEN e il frame-shift di TP53 K139Rfs * 31, [79,80].

Le cellule PC3 condividono anche alcune caratteristiche presenti nei NEPC [40]. Globalmente i nostri dati preclinici indicano che il trattamento con etoposide potrebbe essere una valida opzione strategica per i pazienti con AVPC caratterizzati da diverse alterazioni molecolari e che hanno maggiori probabilità di sviluppare pathways indipendenti dagli androgeni che sostengano la sopravvivenza e la proliferazione cellulare [82].

Tramite le analisi bio-informatiche dei vari dataset, abbiamo esplorato la prevalenza e la rilevanza delle alterazioni di TOP2A e di TOP2B, che rappresentano i bersagli specifici dell'etoposide nei pazienti con PCa.

Abbiamo osservato che le amplificazioni di TOP2A e di TOP2B sono l'alterazione genetica più frequente segnalata nei database disponibili, in particolare nei pazienti di PCa metastatici che però non correlano con le caratteristiche cliniche.

Inoltre, abbiamo osservato che i pazienti che presentavano l'amplificazione di TOP2A e TOP2B hanno maggiori probabilità di ospitare amplificazioni in altri geni comunemente coinvolti nella differenziazione verso il fenotipo neuroendocrino (*ved. Fig. 17, pg.51*).

Queste osservazioni devono tener conto del fatto che è noto che l'amplificazione di TOP2A è correlata al carico mutazionale del tumore e che l'associazione di queste alterazioni con le copy-number variations potrebbero aver influenzato questo risultato.

Nel corso degli esperimenti, abbiamo anche esplorato le possibili associazioni tra i livelli trascrizionali delle isoforme di TOP2 e i dati clinici, identificando una correlazione significativa tra l'over-espressione dell'mRNA di TOP2A e una più breve sopravvivenza globale nei mCRPC, mentre in questo senso non è rilevata alcuna correlazione con TOP2B (*ved. Fig. 18, pg.53*).

L'over-espressione dell'mRNA di TOP2A correla in modo significativo con lo score dei NEPC, inoltre esiste una correlazione inversa con lo score di AR (*ved. Fig. 19, pg.54*).

Questi risultati sono coerenti con i nostri dati osservati in vitro ed evidenziano che l'over-espressione di TOP2A è associata alle caratteristiche aggressive dei PCa e alla tendenza verso la progressione al fenotipo neuroendocrino.

Ancora più importante, il nostro studio ha evidenziato che i pazienti che esprimono alti livelli di mRNA di TOP2A hanno maggiori probabilità di ospitare delezioni geniche profonde per RB1 (*ved. Fig. 20, pg.55*).

In questo contesto, la perdita di RB1 è stata recentemente identificata come uno dei più importanti e rilevanti indicatori prognostici nel trattamento del PCa, dato che questa alterazione è coinvolta nello sviluppo delle forme NEPC e nell'insorgenza delle forme resistenti all'ADT [42, 43].

Queste informazioni suggeriscono che i tumori che manifestano perdita di RB1 possono mostrare over-espressione di TOP2A e che il trattamento con etoposide potrebbe essere utile nei pazienti che presentano questa alterazione specifica.

È interessante notare che la nostra analisi di arricchimento funzionale individua un network STRING proteina-proteina di trascritti, up-regolati sia nei PCa primari sia in quelli metastatici associati all'over-espressione di TOP2A (*ved. Fig. 22, pg.59*).

Questo network mostra interazioni significative tra le proteine coinvolte nel ciclo cellulare e nei processi delle cellule mitotiche, supportando il ruolo di TOP2A nei meccanismi di proliferazione delle cellule di PCa.

Tra questi geni, l'over-espressione di AURKA è ben nota nel contesto dei NEPC sottolineando un potenziale coinvolgimento diretto di TOP2A nello sviluppo dei NEPC.

Nel complesso, i nostri risultati suggeriscono che lo spettro di pazienti di PCa che potrebbero trarre beneficio dai trattamenti con l'etoposide potrebbe essere più ampio di quello attualmente previsto; l'efficacia dell'etoposide dovrebbe essere studiata sia per i pazienti patologicamente definiti NEPC, sia per quelli con caratteristiche cliniche o molecolari specifiche come l'over-espressione di TOP2A, la ridotta funzionalità di AR e la perdita di RB1.

6.0 CONCLUSIONI.

Globalmente, i nostri dati mostrano che l'etoposide è attiva nei modelli di PCa resistenti alla castrazione, suggerendo che questo inibitore della topoisomerasi 2 dovrebbe essere rivalutato in studi clinici su pazienti con forme AVPC o con specifiche alterazioni molecolari.

L'over-espressione di TOP2A, piuttosto che di TOP2B, sembra avere implicazioni significative di valore prognostico e predittivo.

Sebbene siano necessari più dati sperimentali, i nostri risultati supportano anche una relazione stretta tra la funzionalità di AR e l'attività dell'etoposide.

Ulteriori indagini sono comunque necessarie per determinare il ruolo della TOP2A nei mCRPC e per valutare l'efficacia dell'etoposide, usata da sola o impiegata in combinazione con altri agenti terapeutici, per il trattamento di pazienti con CRPC metastatico soprattutto nel caso delle forme avanzate che attualmente necessitano di trattamenti più efficaci.

REFERENZE

- [1]. AIOM-AIRTUM. I numeri del cancro in Italia. Brescia: intermedia Editore; 2018.
- [2]. Shaneyfelt T, Husein R, Bublely G, Mantzoros Cs. Hormonal predictors of prostate cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol* 2000; 18(4):847-53.
- [3]. Hemminki K. Familial risk and familiar survive in prostate cancer. *World J Urol* 2012; 30 (2):143-8.
- [4]. Montie JE. Observations on the Epidemiology and natural history of prostate cancer. *Urology* 1994; 44(16):2-8.
- [5]. Kheirandish P, Chinegwundoh F. Ethnic differences in prostate cancer. *British Journal of cancer* 2011; 105(4): 481-5.
- [6]. Kolonel LN, Nomura AM, Cooney RV. Dietary fat and prostate cancer: current status. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91(5):414-28.
- [7]. Pernar Ch, Ebot EM, Mucci LA. The epidemiology of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015 16:5137-5141.
- [8]. Bashir MN. Epidemiology of prostate cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015 16:5137-5141.
- [9]. Treatment of Advanced Prostate Cancer. Min Yuen Teo, Dana E. Rathkopf, and Philip Kantoff. *Annu Rev Med*. 2019 January 27; 70: 479–499.
doi:10.1146/annurev-med-051517-011947.
- [10]. Scher HI, Halabi S, Tannock I, et al. 2008. Design and end points of clinical trials for patients with progressive prostate cancer and castrate levels of testosterone: recommendations of the Prostate Cancer Clinical Trials Working

Group. *J. Clin. Oncol* 26:1148–59 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

[11]. Scher HI, Morris MJ, Stadler WM, et al. 2016. Trial design and objectives for castration-resistant prostate cancer: updated recommendations from the Prostate Cancer Clinical Trials Working Group 3. *J. Clin. Oncol* 34:1402–18 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

[12]. Huggins C 1942. Effect of orchiectomy and irradiation on cancer of the prostate. *Ann. Surg* 115:1192–200 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

[13]. Huggins C 1944. The treatment of cancer of the prostate: the 1943 address in surgery before the royal college of physicians and surgeons of Canada. *Can. Med. Assoc. J* 50:301–7 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].

[14]. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016*. CA Cancer J Clin, 2016. 66(1): p. 7-30. AIOM-2

[15]. AIRTUM, *I numeri del cancro in Italia*. 2015, Brescia: Intermedia Editore.

[16]. Shafi, A.A., A.E. Yen, and N.L. Weigel, *Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer*. Pharmacol Ther, 2013. 140(3): p. 223-38.

[17]. Oxnard, G.R., *The cellular origins of drug resistance in cancer*. Nat Med, 2016. 22(3): p. 232-4. [a] *I numeri del cancro in Italia*. Brescia: Intermedia Editore; 2018.

- [18]. Emmons, M.F., F. Faiao-Flores, and K.S. Smalley, *The role of phenotypic plasticity in the escape of cancer cells from targeted therapy*. *Biochem Pharmacol*, 2016. 122: p. 1-9.
- [19]. Abhimanyu Thakur , Aishwarya Roy , Arijit Ghosh , Mohit Chhabra , Sugato Banerjee · *Abiraterone acetate in the treatment of prostate cancer*. *Biomed Pharmacother*. 2018 May; 101:211-218. doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.067. Epub 2018 Feb 26.
- [20] Pedro C. Barata MD, MSc, A. Oliver Sartor MD. *Metastatic castration-sensitive prostate cancer: Abiraterone, docetaxel, or...* *Cancer*. 2019 Jun 1;125(11):1777-1788. doi: 10.1002/cncr.32039. Epub 2019 Apr 1.
- [21]. Dutt, S.S. and A.C. Gao, *Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression*. *Future Oncol*, 2009. 5(9): p. 1403-13.
- [22]. Ferraldeschi, R., et al., *Targeting the androgen receptor pathway in castration-resistant prostate cancer: progresses and prospects*. *Oncogene*, 2015. 34(14): p. 1745-57.
- [23]. Robinson, D., et al., *Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer*. *Cell*, 2015. 161(5): p. 1215-28.
- [24]. Antonarakis, ES; Lu, C.; Wang, H.; Luber, B.; Nakazawa, M.; Roeser, JC; Chen, Y.; Mohammad, TA; Chen, Y.; Fedor, HL; et al. AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 2014, 371, 1028–1038. *N. Engl. J. Med.* 2014, 371, 1028-1038.

- [25]. Cattrini, C; Rubagotti, A; Zinoli, L; Cerbone, L; Zanardi E; Capaia, M; Barboro, P; Boccardo, F. Role of Circulating Tumor Cells (CTC), Androgen Receptor Full Length (AR-FL) and Androgen Receptor Splice Variant 7 (AR-V7) in a Prospective Cohort of Castration-Resistant Metastatic Prostate Cancer Patients. *Cancers* 2019, *11*(9), 1365; <https://doi.org/10.3390/cancers11091365>
- [26]. Sittadjody, S., et al., *Non-androgen Signaling Pathways in Castration-Resistant Prostate Cancer*, in *Managing Metastatic Prostate Cancer in Your Urological Oncology Practice*, S.I. Publishing, Editor. 2016. p. 35-36.
- [27]. Qin, J., et al., *The PSA(-/lo) prostate cancer cell population harbors self-renewing long-term tumor-propagating cells that resist castration*. *Cell Stem Cell*, 2012. **10**(5): p. 556-69.
- [28]. Mahal, B.A., et al., *Association of very low prostate-specific antigen levels with increased cancer-specific death in men with high-grade prostate cancer*. *Cancer*, 2016. **122**(1): p. 78-83.
- [29]. Sittadjody, S., Thangasamy, T., NickKolgh, B., Balaji, K.C., 2016. *Non-androgen Signaling Pathways in Castration-Resistant Prostate Cancer*. Springer International Publishing, Switzerland.
- [30]. Deshmukh, D. and Y. Qiu, *Role of PARP-1 in prostate cancer*. *Am J Clin Exp Urol*, 2015. **3**(1): p. 1-12.

- [31]. Brenner, J.C., et al., *Mechanistic rationale for inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in ETS gene fusion-positive prostate cancer*. *Cancer Cell*, 2011. **19**(5): p. 664-78.
- [32]. Robinson, D., et al., *Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer*. *Cell*, 2015. **161**(5): p. 1215-28.
- [33]. Hussain, M., et al., *Co-targeting androgen receptor (AR) and DNA repair: A randomized ETS gene fusion-stratified trial of abiraterone + prednisone (Abi) +/- the PARP1 inhibitor veliparib for metastatic castration-resistant prostate cancer (mCRPC) patients (pts) (NCI9012)—A University of Chicago phase II consortium trial*. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(suppl; abstr 5010).
- [34]. Tran C, Ouk S, Clegg NJ, et al. 2009. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. *Science* 324:787–90 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].
- [35]. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, et al; TAX 327 Investigators. *Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer*. *N Engl J Med*. 2004; 351: 1502- 1512.
- [36]. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MH, et al. *Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer*. *N Engl J Med*. 2004; 351: 1513- 1520.
- [37]. Sweeney CJ, Chen YH, Carducci M, et al. *Chemohormonal therapy in metastatic hormone-sensitive prostate cancer*. *N Engl J Med*. 2015; 373: 737- 746.

[38]. James ND, de Bono JS, Spears MR, et al; STAMPEDE Investigators. Abiraterone for prostate cancer not previously treated with hormone therapy. *N Engl J Med*. 2017; 377: 338- 351.

[39]. Pritchard CC, Mateo J, Walsh MF, et al. 2016. Inherited DNA-repair gene mutations in men with metastatic prostate cancer. *N. Engl. J. Med* 375:443–53 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar].

[40]. Abida W, Armenia J, Gopalan A, et al. 2017. Prospective genomic profiling of prostate cancer across disease states reveals germline and somatic alterations that may affect clinical decision making. *J. Clin. Oncol. Precision Oncol* 10.1200/PO.17.00029 [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar]

[41]. Mateo J, Carreira S, Sandhu S, et al. 2015. DNA-repair defects and olaparib in metastatic prostate cancer. *N. Engl. J. Med* 373:1697–708 [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]

[42]. Tannock IF, Osoba D, Stockler MR, Ernst DS, Neville AJ, Moore MJ, Armitage GR, Wilson JJ, Venner PM, Coppin CM, Murphy KC: Chemotherapy with mitoxantrone plus prednisone or prednisone alone for symptomatic hormone-resistant prostate cancer: a Canadian randomized trial with palliative end points. *J Clin Oncol* 1996, 14:1756-1764.

- [43]. Green AK, Corty RW, Wood WA, Meeneghan M, Reeder-Hayes KE, Basch E, Milowsky MI, Dusetzina SB: Comparative effectiveness of mitoxantrone plus prednisone versus prednisone alone in metastatic castrate-resistant prostate cancer after docetaxel failure. *Oncologist* 2015, 20:516-522.
- [43]. Kamradt JM, Pienta KJ: Etoposide in prostate cancer. *Expert Opin Pharmacother* 2000, 1:271-275.
- [44]. Conteduca V, Oromendia C, Eng KW, Bareja R, Sigouros M, Molina A, Faltas BM, Sboner A, Mosquera JM, Elemento O, et al: Clinical features of neuroendocrine prostate cancer. *Eur J Cancer* 2019, 121:7-18.
- [45]. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C: DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol* 2010, 17:421-433.
- [46]. Oser MG, Fonseca R, Chakraborty AA, Brough R, Spektor A, Jennings RB, Flaifel A, Novak JS, Gulati A, Buss E, et al: Cells Lacking the RB1 Tumor Suppressor Gene Are Hyperdependent on Aurora B Kinase for Survival. *Cancer Discov* 2019, 9:230-247.
- [47]. Uxa S, Bernhart SH, Mages CFS, Fischer M, Kohler R, Hoffmann S, Stadler PF, Engeland K, Muller GA: DREAM and RB cooperate to induce gene repression and cell-cycle arrest in response to p53.
- [48]. Schaefer-Klein JL, Murphy SJ, Johnson SH, Vasmatazis G, Kovtun IV: Topoisomerase 2 Alpha

Cooperates with Androgen Receptor to Contribute to Prostate Cancer Progression.

PLoS One 2015,

Page 13/20 10: e0142327.

[48]. Chevillet JC, Karnes RJ, Therneau TM, Kosari F, Munz JM, Tillmans L, Basal E, Rangel LJ, Bergstralh E, Kovtun IV, et al: Gene panel model predictive of outcome in men at high-risk of systemic progression and death from prostate cancer after radical retropubic prostatectomy. *J Clin Oncol* 2008, 26:3930-3936.

[49]. Hughes C, Murphy A, Martin C, Fox E, Ring M, Sheils O, Loftus B, O'Leary J: Topoisomerase II-alpha expression increases with increasing Gleason score and with hormone insensitivity in prostate carcinoma. *J Clin Pathol* 2006, 59:721-724.

[50]. Willman JH, Holden JA: Immunohistochemical staining for DNA topoisomerase II-alpha in benign, premalignant, and malignant lesions of the prostate. *Prostate* 2000, 42:280-286.

[51]. de Resende MF, Vieira S, Chinen LT, Chiappelli F, da Fonseca FP, Guimarães GC, Soares FA, Neves I, Pagotty S, Pellionisz PA, et al: Prognostication of prostate cancer based on TOP2A protein and gene assessment: TOP2A in prostate cancer. *J Transl Med* 2013, 11:36.

[52]. Haffner MC, Aryee MJ, Toubaji A, Esopi DM, Albadine R, Gurel B, Isaacs WB, Bova GS, Liu W, Xu J, et al: Androgen-induced TOP2B-mediated double-strand breaks and prostate cancer gene rearrangements. *Nat Genet* 2010, 42:668-675.

- [53]. Atwal M, Swan RL, Rowe C, Lee KC, Lee DC, Armstrong L, Cowell IG, Austin CA: Intercalating TOP2 Poisons Attenuate Topoisomerase Action at Higher Concentrations. *Mol Pharmacol* 2019, 96:475- 484.
- [54]. Mantoni TS, Reid G, Garrett MD: Androgen receptor activity is inhibited in response to genotoxic agents in a p53-independent manner. *Oncogene* 2006, 25:3139-3149.
- [55]. Ferrari N, Granata I, Capaia M, Piccirillo M, Guarracino MR, Vene R, Brizzolara A, Petretto A, Inglese E, Morini M, et al: Adaptive phenotype drives resistance to androgen deprivation therapy in prostate cancer. *Cell Commun Signal* 2017, 15:51.
- [56]. Capaia M, Granata I, Guarracino M, Petretto A, Inglese E, Cattrini C, Ferrari N, Boccardo F, Barboro P: A hnRNP K \square AR-Related Signature Reflects Progression toward Castration-Resistant Prostate Cancer. *Int J Mol Sci* 2018, 19.
- [57]. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, et al: The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012, 2:401-404.
- [58]. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, et al: Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013, 6:p11.

- [59]. Abida W, Cyrta J, Heller G, Prandi D, Armenia J, Coleman I, Cieslik M, Benelli M, Robinson D, Van Allen EM, et al: Genomic correlates of clinical outcome in advanced prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019.
- [60]. Beltran H, Prandi D, Mosquera JM, Benelli M, Puca L, Cyrta J, Marotz C, Giannopoulou E, Chakravarthi BV, Varambally S, et al: Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer. *Nat Med* 2016, 22:298-305.
- [61]. Hoadley KA, Yau C, Hinoue T, Wolf DM, Lazar AJ, Drill E, Shen R, Taylor AM, Cherniack AD, Thorsson V, et al: Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell* 2018, 173:291-304.e296.
- [62]. Berruti A, Fara E, Tucci M, Tarabuzzi R, Mosca A, Terrone C, Gorzegno G, Fasolis G, Tampellini M, Porpiglia F, et al: Oral estramustine plus oral etoposide in the treatment of hormone refractory prostate cancer patients: a phase II study with a 5-year follow-up. *Urol Oncol* 2005, 23:1-7.
- [63]. Hussain MH, Pienta KJ, Redman BG, Cummings GD, Flaherty LE: Oral etoposide in the treatment of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer* 1994, 74:100-103.
- [64]. Joly F, Delva R, Mourey L, Sevin E, Bompas E, Vedrine L, Ravaud A, Eymard JC, Tubiana-Mathieu N, Linassier C, et al: Clinical benefits of non-taxane

chemotherapies in unselected patients with symptomatic metastatic castration-resistant prostate cancer after docetaxel: the GETUG-P02 study. *BJU Int* 2015, 115:65-73.

[65]. Papandreou CN, Daliani DD, Thall PF, Tu SM, Wang X, Reyes A, Troncoso P, Logothetis CJ: Results of a phase II study with doxorubicin, etoposide, and cisplatin in patients with fully characterized smallcell carcinoma of the prostate. *J Clin Oncol* 2002, 20:3072-3080.

[66]. Beltran H, Tomlins S, Aparicio A, Arora V, Rickman D, Ayala G, Huang J, True L, Gleave ME, Soule H, et al: Aggressive variants of castration-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2014, 20:2846-2850.

[67]. Aggarwal R, Huang J, Alumkal JJ, Zhang L, Feng FY, Thomas GV, Weinstein AS, Friedl V, Zhang C, Witte ON, et al: Clinical and Genomic Characterization of Treatment-Emergent Small-Cell Neuroendocrine Prostate Cancer: A Multi-institutional Prospective Study. *J Clin Oncol* 2018, 36:2492- 2503.

[68]. Hamid AA, Gray KP, Shaw G, MacConaill LE, Evan C, Bernard B, Loda M, Corcoran NM, Van Allen EM, Choudhury AD, Sweeney CJ: Compound Genomic Alterations of TP53, PTEN, and RB1 Tumor Suppressors in Localized and Metastatic Prostate Cancer. *Eur Urol* 2019, 76:89-97.

[69]. Akamatsu S, Inoue T, Ogawa O, Gleave ME: Clinical and molecular features of treatment-related neuroendocrine prostate cancer. *Int J Urol* 2018, 25:345-351.

[70]. Vlachostergios PJ, Puca L, Beltran H: Emerging Variants of Castration-Resistant Prostate Cancer. *Curr Oncol Rep* 2017, 19:32.

[71]. Ge R, Wang Z, Montironi R, Jiang Z, Cheng M, Santoni M, Huang K, Massari F, Lu X, Cimadamore A, et al: Epigenetic modulations and lineage plasticity in advanced prostate cancer. *Ann Oncol* 2020, 31:470-479.

[72]. Montironi R, Cimadamore A, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Aurilio G, Santoni M, Massari F, Cheng L: Morphologic, Molecular and Clinical Features of Aggressive Variant Prostate Cancer. *Cells* 2020, 9.

[73]. Tsaor I, Heidegger I, Kretschmer A, Borgmann H, Gandaglia G, Briganti A, de Visschere P, Mathieu R, Valerio M, van den Bergh R, et al: Aggressive variants of prostate cancer - Are we ready to apply specific treatment right now? *Cancer Treat Rev* 2019, 75:20-26.

[74]. Aparicio AM, Harzstark AL, Corn PG, Wen S, Araujo JC, Tu SM, Pagliaro LC, Kim J, Millikan RE, Ryan C, et al: Platinum-based chemotherapy for variant castrate-resistant prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2013, 19:3621-3630.

[75]. Heck MM, Hittelman WN, Earnshaw WC: Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukaryotic cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988, 85:1086-1090.

- [76]. Constantinou A, Henning-Chubb C, Huberman E: Novobiocin- and phorbol-12-myristate-13-acetate-induced differentiation of human leukemia cells associated with a reduction in topoisomerase II activity. *Cancer Res* 1989, 49:1110-1117.
- [77]. Tan HL, Sood A, Rahimi HA, Wang W, Gupta N, Hicks J, Mosier S, Gocke CD, Epstein JI, Netto GJ, et al: Rb loss is characteristic of prostatic small cell neuroendocrine carcinoma. *Clin Cancer Res* 2014,20:890-903.
- [78]. Namekawa T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S: Application of Prostate Cancer Models for Preclinical Study: Advantages and Limitations of Cell Lines, Patient-Derived Xenografts, and Three-Dimensional Culture of Patient-Derived Cells. *Cells* 2019, 8.
- [79]. Tai S, Sun Y, Squires JM, Zhang H, Oh WK, Liang CZ, Huang J: PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate* 2011, 71:1668-1679.
- [80]. Cattrini C, Zanardi E, Vallome G, Cavo A, Cerbone L, Di Meglio A, Fabbroni C, Latocca MM, Rizzo F, Messina C, et al: Targeting androgen-independent pathways: new chances for patients with prostate cancer? *Crit Rev Oncol Hematol* 2017, 118:42-53.
- [81]. Mateo J, Seed G, Bertan C, Rescigno P, Dolling D, Figueiredo I, Miranda S, Nava Rodrigues D, Gurel B, Clarke M, et al: Genomics of lethal prostate cancer at diagnosis and castration resistance. *J Clin Invest* 2020, 130:1743-1751.

[82]. Ku SY, Rosario S, Wang Y, Mu P, Seshadri M, Goodrich ZW, Goodrich MM, Labbe DP, Gomez EC, Wang J, et al: Rb1 and Trp53 cooperate to suppress prostate cancer lineage plasticity, metastasis, and antiandrogen resistance. *Science* 2017, 355:78-83.

Ringraziamenti.

Ringrazio il Tutor Prof. Francesco Boccardo, che mi ha dato l'opportunità di lavorare a questo progetto di grande valore scientifico nell'ambito della ricerca sul carcinoma prostatico e tutte le persone che ho incontrato durante questo periodo, afferenti al laboratorio di Oncologia Medica.

Ringrazio la Dott. Paola Barboro quale responsabile scientifico, per avermi sostenuto e favorito in ogni modo per arrivare a questo traguardo e per gli anni di lavoro intenso che abbiamo condiviso in laboratorio.

Ringrazio tutti i miei amici e colleghi per essermi stati accanto in questo importante percorso lavorativo e che continuano a credere in me.