

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI VERONA

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA

SCUOLA DI DOTTORATO DI
SCIENZE DELLA VITA E DELLA SALUTE

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE CLINICHE E SPERIMENTALI

CICLO XXIX /ANNO 2014

TITOLO DELLA TESI DI DOTTORATO

CROSS-TALK TRA CELLULA ADIPOSA E CELLULA
NEOPLASTICA: MODELLI DI COCOLTURA

S.S.D. MED/09

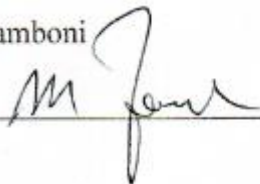
Coordinatore: Prof. Paolo Moghetti

Firma



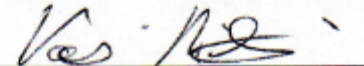
Tutor: Prof. Mauro Zamboni

Firma



Dottorando: Dott. Vanni Rizzatti

Firma



Sommario

Il tessuto adiposo bianco (WAT) viene considerato come un organo multifunzionale; oltre al ruolo centrale di accumulo di lipidi, ha infatti anche un'importante funzione endocrina di secrezione di diversi ormoni definiti adipochine (leptina, adiponectina), e di secrezione di altri fattori proteici quali citochine e chemochine ad esempio fattore di necrosi tumorale (TNF α) e interleuchina-6 (IL-6).

WAT è costituito da molti tipi di cellule: gli adipociti ed i preadipociti risultano essere i tipi cellulari più abbondanti. Il cancro è la principale causa di morte nei paesi sviluppati e la seconda causa di morte nei paesi in via di sviluppo. Il numero dei casi di cancro è previsto in aumento a causa del crescente invecchiamento della popolazione.

Studi epidemiologici hanno dimostrato che un aumentato rischio di avere diversi tipi di cancro, tra cui tumore al colon, all'endometrio, alla mammella, al rene, all'esofago, al pancreas, alla cistifellea, al fegato, e neoplasie ematologiche, è associato all'obesità; inoltre, questa condizione, può portare ad una riduzione dei risultati attesi dal trattamento, peggiora la prognosi, e porta ad un aumento della mortalità cancro-associata.

Diversi studi hanno dimostrato che nel tessuto adiposo bianco di soggetti obesi vi è una diminuzione della maturazione dei preadipociti ad adipociti, così come una rottura dell'equilibrio tra le due adipochine più importanti: leptina e adiponectina; inoltre, l'obesità viene associata a iperinsulinemia, iperglicemia, insulino-resistenza, aberrante metabolismo del glucosio, infiammazione cronica e produzione di alti livelli di IGF-1 che vengono riportati essere fattori di rischio per il cancro.

Numerosi studi hanno messo in luce la complessità dei tumori ed il microambiente in cui le cellule tumorali si trovano..

In particolare, il microambiente tumorale è costituito da cellule del sistema immunitario, cellule del sistema vascolare e dei vasi linfatici (cellule endoteliali), fibroblasti, periciti, adipociti e cellule stromali derivate dal tessuto adiposo.

Il ruolo del tessuto adiposo, e più nello specifico degli adipociti, nell'iniziazione, crescita e metastasi tumorale è un settore relativamente nuovo di indagine.

In alcuni tipi di tumore che crescono in un microambiente ricco in adipociti, è stato osservato che questi scompaiono con accumulo di cellule simil-fibroblastiche e formazione di uno stroma desmoplastico. Studi istologici di alcuni tipi di cancro confermano che gli adipociti che si trovano a

livello del fronte invasivo del tumore diventano più piccoli e il numero di cellule fibroblasto-simili aumenta.

E' stato ipotizzato che una delle possibili origini delle cellule simil-fibroblastiche possano essere adipociti che vadano incontro a fenomeni di dedifferenziamento.

Uno studio in coltura cellulare, utilizzando la linea di cellule 3T3-L1 differenziate ad adipociti, suggerisce che questo tipo cellulare possa promuovere la crescita, la proliferazione e la sopravvivenza di cellule umane di cancro mammario.

Tuttora non è del tutto chiarito il ruolo dell'adipocita nel microambiente tumorale in generale ed in altri tipi di cancro e in particolare se questo tipo di cellula possa contribuire in maniera diretta ai processi di proliferazione e invasività tumorale.

Pertanto, l'obiettivo principale di questa tesi è stato quello di studiare l'interazione tra adipociti e diversi tipi di cancro attraverso un modello di cocoltura in vitro. In particolare lo studio si è concentrato sull'interazione tra adipociti e cellule tumorali pancreatiche umane e tra adipociti e cellule di melanoma umano mediante un sistema di cocoltura tra la linea cellulare di fibroblasti murini 3T3-L1 differenziate ad adipociti e la linea cellulare MiaPaca2 e A375 rispettivamente.

Adipociti cocoltivati sia con le cellule di tumore pancreatico umano MiaPaca2 sia con le cellule di melanoma umano A375 mostrano una progressiva perdita di contenuto lipidico, i nuclei diventano più centralizzati e le cellule assumono una forma allungata, simile alla morfologia dei fibroblasti.

Inoltre, in entrambi i modelli di cocoltura, adipociti dedifferenziati perdono il profilo di espressione genica adipocitario e acquisiscono un profilo genico di riprogrammazione del processo cellulare.

Infine, cellule MiaPaca2 in cocoltura mostrano una up-regolazione di Wnt5a ed una maggior attivazione di STAT3 rispetto al controllo; è stato inoltre dimostrato che cellule 3T3-L1 in co-coltura con questa linea cellulare, presentano una maggior capacità di legare sia c-Jun che AP-1, due proteine attivate dal pathway Wnt5a. Cellule A375 in cocoltura mostrano una maggior capacità migratoria rispetto al controllo e una maggior espressione delle β -catenine e di Lef1.

La plasticità del tessuto adiposo e l'esistenza di fenomeni di de-differenziamento potrebbero quindi portare nuova luce nel complesso rapporto tra obesità, tessuto adiposo disfunzionale e aumento nel rischio di cancro.

Abstract

White adipose tissue (WAT) is considered as a complex organ with a central role in accumulation of lipids, and an important endocrine function with the secretion of several peptides as adipokines (leptin, adiponectin), cytokines and chemokines, tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-6 (IL-6).

Cancer is the leading cause of death in developed countries and the second leading cause of death in developing countries. The number of cancer cases is expected to rise due to the increasing aging population. Epidemiological studies have shown that an increased risk of several cancers, including colon cancer, endometrial, breast, kidney, esophagus, pancreas, gallbladder, liver, and hematological malignancies, is associated with obesity. Moreover, this condition can lead to a reduction in the expected results from treatment, to a worse prognosis and to an increase of the cancer-associated mortality.

Several studies have shown that in the white adipose tissue of obese subjects there is a decrease in the maturation of preadipocytes to adipocytes, as well as an imbalance between leptin and adiponectin; in addition, obesity is associated with hyperinsulinemia, hyperglycemia, insulin resistance, aberrant glucose metabolism, chronic inflammation and production of high levels of IGF-1, important risk factor for cancer.

Many studies have highlighted the complexity of the tumors and of their microenvironment. Tumor microenvironment is constituted by several different types of cells as immune system cells, cells of the vascular and lymphatic system (endothelial cells), fibroblasts, pericytes, adipocytes and stromal cells derived from adipose tissue. The role of adipose tissue, and more specifically of adipocytes, in cancer initiation, growth and metastatization is a relatively new area of investigation.

In tumors growing in a microenvironment dominated by adipocytes, it was observed that adipocytes disappear with an accumulation of fibroblast-like cells and subsequent formation of a desmoplastic stroma. Histological observations in some types of cancer, confirm that adipocytes localized at the tumor invasive front, become smaller and the number of fibroblast-like cells increases. It has been hypothesized that fibroblast-like cells could derived from dedifferentiation of adipocytes.

In a previous in vitro study with 3T3-L1 cells differentiated to adipocytes, adipocytes promoted the growth, proliferation and survival of human breast cancer cells.

However the role of adipocytes in the tumor microenvironment is only incompletely known; in particular in some types of tumors, as melanoma and pancreatic cancer, the role of adipocytes in cancer proliferation and invasiveness is not known. The main focus of this work was to study the interaction between adipocytes and cancer through a co-culture in vitro model. In particular, the study focused on the interaction between adipocytes and human pancreatic cancer cells and human melanoma cells, using a co-culture system between murine fibroblasts 3T3-L1 cell line differentiated to adipocytes and MiaPaca2 and A375 cell line respectively.

Adipocytes co-cultured with both types of cells (human pancreatic cancer MiaPaca2 and human melanoma A375 cells) show a progressive loss of lipid content with more centralized nuclei and an elongated shape, similar to the fibroblasts morphology.

Moreover, in both co-culture models, dedifferentiated adipocytes loste the adipocyte gene expression profile and acquire a gene profile of reprogramming cells.

Finally, MiaPaca2 cells in co-culture showed an up-regulation of Wnt5a and greater activation of STAT3 compared to control; 3T3-L1 cells in co-culture had a greater ability to bind both c-Jun and AP-1, two proteins activated by the Wnt5a pathway; A375 cells in co-culture showed an increased migratory capacity compared to controls and a greater expression of β -catenin and LEF1. The plasticity of AT and the existence of dedifferentiation phenomena could bring new light into the complex relation between obesity, AT dysfunction and increased cancer risk.

Indice

1 Introduzione	pag. 10
1.1 Il tessuto adiposo	pag. 10
1.1.1 Il tessuto adiposo bianco	pag. 10
1.1.2 Il tessuto adiposo bruno	pag. 18
1.2 L'obesità	pag. 19
1.2.1 Cause	pag. 19
1.2.2 Epidemiologia	pag. 23
1.2.3 Cancro, tessuto adiposo e obesità	pag. 24
1.3 Il microambiente tumorale	pag. 25
1.3.1 Cellule del microambiente tumorale e loro effetti	pag. 26
1.4 Wnt signaling	pag. 34
1.5 Il cancro al pancreas	pag. 38
1.5.1 Tipi di cancro al pancreas	pag. 38
1.5.2 Patogenesi molecolare e cellulare	pag. 39
1.5.3 Segni e sintomi	pag. 42
1.5.4 Stadiazione e sopravvivenza a 5 anni	pag. 43
1.5.5 Epidemiologia e fattori di rischio	pag. 45
1,6 Il melanoma	pag. 45
1.6.1 Tipi di melanma	pag. 46
1.6.2 Fattori di rischio	pag. 47
1.6.3 Epidemiologia	pag. 48
1.6.4 Segni e sintomi	pag. 48
1.6.5 Patogenesi molecolare e cellulare	pag. 49
1.6.6 Melanoma e invecchiamento	pag. 52
2 Scopo della tesi	pag. 52
3 Materiali e metodi	pag. 53
3.1 De-differenziamento degli adipociti in cocoltura con cellule di cancro al pancreas	pag. 53
3.1.1 Coltura cellulare	pag. 53
3.1.2 Colorazione Oil Red o e imaging	pag. 54
3.1.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM)	pag. 55

3.1.4 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)	pag. 55
3.1.5 Estrazione dell'RNA, sintesi del cDNA e real time PCR	pag. 55
3.1.6 Western Blotting	pag. 56
3.1.7 ELISA	pag. 57
3.1.8 Saggio di ritardo della mobilità elettroforetica	pag. 57
3.1.9 Analisi statistica	pag. 57
3.2 De-differenziamento degli adipociti in cocoltura con cellule di melanoma	pag. 58
3.2.1 Coltura cellulare	pag. 58
3.2.2 Colorazione Oil Red O e imaging	pag. 58
3.2.3 Immunofluorescenza	pag. 59
3.2.4 Estrazione dell'RNA, sintesi del cDNA e real time PCR	pag. 60
3.2.5 Test di invasività in matrigel	pag. 60
3.2.6 Scratch test	pag. 61
3.2.7 Western Blotting	pag. 61
3.2.8 Analisi statistica	pag. 62
4 Risultati	pag. 62
4.1 De-differenziamento degli adipociti in cocoltura con cellule di cancro al pancreas	pag. 62
4.1.1 Adipociti dedifferenziano a cellule fibroblasto-simili dopo co-coltura con cellule MiaPaCa	pag. 62
4.1.2 Adipociti dedifferenziati acquisiscono un profilo di riprogrammazione cellulare	pag. 67
4.1.3 Cellule MiaPaCa esprimono Wnt5a	pag. 78
4.1.4 Il de-differenziamento degli adipociti è associato all'attivazione di pathway Wnt5a dipendente	pag. 69
4.1.5 Inibizione di Wnt5a blocca in parte il de-differenziamento	pag. 70
4.2 De-differenziamento degli adipociti in cocoltura con cellule di melanoma	pag. 72
4.2.1 Adipociti maturi dedifferenziano a cellule fibroblasto-simili dopo co-coltura con cellule di	

melanoma A375	pag. 72
4.2.2 Adipociti dedifferenziati acquisiscono un profilo di riprogrammazione cellulare	pag. 74
4.2.3 Scratch test e test di invasione	pag. 75
4.2.4 Analisi di immunofluorescenza	pag. 77
4.2.5 Analisi mediante Western Blotting	pag. 81
5 Discussione	pag. 82
5.1 De-differenziamento degli adipociti in cocoltura con cellule di cancro al pancreas	pag. 82
5.2 De-differenziamento degli adipociti in cocoltura con cellule di melanoma	pag. 84
6 Bibliografia	pag. 88

1 Introduzione

1.1 Il tessuto adiposo

Il tessuto adiposo può essere suddiviso in 2 diversi tipi principali: tessuto adiposo bianco e tessuto adiposo bruno. Il tessuto adiposo bianco rappresenta la stragrande maggioranza del tessuto adiposo presente nell'organismo ed è il sito di accumulo dell'energia, mentre il ruolo principale del tessuto adiposo bruno è la termogenesi, in particolare nei piccoli mammiferi e nei neonati umani (1).

1.1.1 Il tessuto adiposo bianco

Il tessuto adiposo bianco (WAT) viene considerato come un organo multifunzionale; oltre al ruolo centrale di accumulo di lipidi quali ad esempio trigliceridi ad alta densità energetica, ha infatti un'importante funzione endocrina di secrezione di diversi ormoni, in particolare leptina e adiponectina (adipochine), e di una vasta gamma di altri fattori proteici quali citochine e chemochine come fattore di necrosi tumorale (TNF α) e interleuchina-6 (IL-6) (1-4).

WAT è costituito da molti tipi di cellule: gli adipociti risultano essere le cellule più abbondanti, gli altri tipi di cellule presenti sono inclusi nella frazione vasculostromale: circa il 10% è rappresentato da macrofagi CD14, CD31 positivi (1), altri importanti elementi cellulari presenti sono le cellule staminali multipotenti, preadipociti, fibroblasti, periciti, cellule endoteliali dei vasi sanguigni e linfatici, altre cellule del sistema immunitario quali linfociti B, linfociti T, natural killer, T helper, linfociti T regolatori e mastociti (figura 1).

WAT è innervato principalmente dal sistema nervoso simpatico (SNS), con fibre nervose presenti assieme ad arterie e arteriole.

Gli adipociti sono cellule grandi, di forma sferica, sostenuti da tessuto connettivo lasso riccamente vascolarizzato. La loro dimensione varia in funzione del contenuto lipidico da circa 30 μ m a circa 130 μ m di diametro.

Il volume di un adipocita è un fattore determinante di funzionalità della cellula, adipociti più grandi, in genere, hanno una maggiore attività metabolica e secernono più fattori chemiotattici per le cellule del sistema immunitario.

Gli adipociti maturi, hanno una unica grande goccia lipidica (lipid droplet, LD) posizionata a livello centrale che riempie quasi totalmente il volume della cellula, la LD

è circondata da un monostrato di fosfolipidi rafforzata da una struttura a gabbia di vimentina, perilipina e proteine CIDE.

Lipidi di nuova sintesi inizialmente formano piccole LDs nello strato periferico del citoplasma, vengono trasportate lungo i microtubuli ed eventualmente fuse con la LD centrale.

Il nucleo a forma di tazza è spostato verso la periferia, vicino al nucleo, il citoplasma diventa più spesso e contiene l'apparato di Golgi, il reticolo endoplasmatico liscio e rugoso, ribosomi liberi, grandi e allungati mitocondri con creste trasversali molto dense.

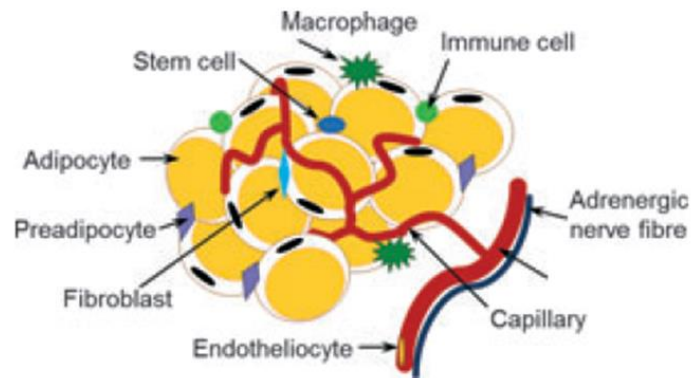
La membrana plasmatica contiene molti tipi di recettori per ormoni, neurotrasmettitori (principalmente noradrenalina), citochine e altre molecole di signaling, recettori Toll-like, responsabili per il riconoscimento di pattern molecolari associati ai patogeni e altre molecole di signaling per immunità innata e adattiva.

L'esoscheletro dell'adipocita è costituito da un reticolo di collagene di tipo 1 e fibre reticolari che formano il "collagenic peri-adipocyte basket" che protegge la cellula dalla rottura meccanica.

Ogni cellula produce una lamina basale con composizione tipica; adipociti e altre popolazioni di cellule presenti nel WAT sintetizzano collagene di tipo 1, 3 e 4, nonché collagene di tipo 6a1, che può interagire con il collagene di tipo 4 nel mediare l'attacco della lamina basale alle cellule adipose.

Lo scaffold formato dalla lamina basale degli adipociti e le proteine della matrice extracellulare (extra cellular matrix, ECM) (ad esempio fibronectina, decorina, tenascina C, osteonectina, osteopontina, metalloproteinasi) riducono le forze esterne e assicurano l'integrità strutturale e funzionale del tessuto adiposo (3).

(a)



(b)

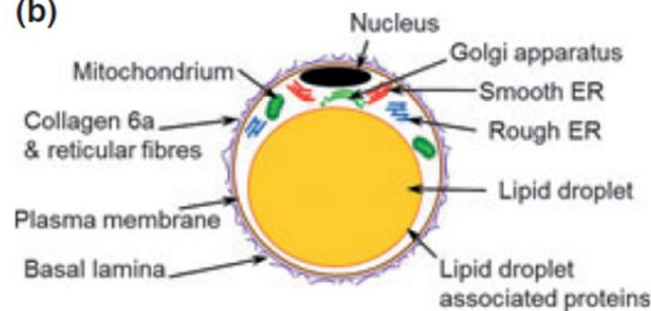


Figura 1: struttura del tessuto adiposo bianco: (a) tipi di cellule presenti e (b) struttura di un adipocita uniloculare (3)

Proteine secrete dal WAT

Leptina

La leptina, ormone proteico non glicosilato di 16-kDa, modula il peso corporeo, l'assunzione di cibo, e le riserve di grasso, i suoi livelli sono proporzionali ai livelli di insulina e inversamente proporzionali alla concentrazione di glucocorticoidi. Citochine infiammatorie, tra cui il TNF, interleuchina-1 (IL-1), e il fattore inibitorio della leucemia, inducono la produzione di leptina. Gli steroidi dei testicoli e gli steroidi ovarici ne fanno diminuire e aumentare le concentrazioni, rispettivamente.

La leptina regola le cellule insulari del pancreas, i livelli dell'ormone della crescita, l'omeostasi dell'immunologia, l'emopoiesi, l'angiogenesi, la guarigione dalle ferite, l'osteogenesi, e la funzione gastrointestinale. Nel cervello, la leptina ha dimostrato di influenzare la corteccia, l'ippocampo e l'ipotalamo esercitando il controllo sull'appetito, i livelli di steroidi sessuali, la tiroxina e l'ormone della crescita.

La diminuzione del signaling della leptina o della funzione del recettore, aumenta l'assunzione di energia e riduce il

dispendio energetico, il deficit di leptina è causa nota di grave obesità ad insorgenza precoce, ipogonadismo, iperinsulinemia, iperfagia e alterata immunità T-cell mediata, curabile con leptina ricombinante.

Gli alti livelli di leptina in pazienti obesi non influiscono la soppressione dell'appetito a causa della resistenza all'ormone, che è stato ipotizzato essere dovuto a difetti nel signaling da parte del recettore della leptina, e al blocco a valle dei circuiti neuronali e difetti nel trasporto attraverso la barriera emato-encefalica (5).

Adiponectina

L'adiponectina è stata caratterizzata in modo indipendente nel 1995 e 1996 da quattro gruppi di ricerca utilizzando metodi diversi, da qui i suoi nomi alternativi APM1 (adipose most abundant gene transcript 1), Acrp30 (adipocyte complement-related protein of 30 kDa), adipoQ e GBP28 (gelatin binding protein of 28kDa).

Adiponectina è un polipeptide di circa 30 kDa che contiene una sequenza segnale N terminale, un dominio variabile, un dominio collagene simile e un dominio globulare C-terminale, condivide una forte omologia di sequenza con il collagene di tipo VIII e X e con C1q del complemento; modifiche post-traslazionali per idrossilazione e glicosilazione, producono molteplici isoforme, che assemblano in strutture oligomeriche di ordine superiore.

L'adiponectina è altamente e specificamente espressa negli adipociti differenziati e circola ad alti livelli nel sangue.

Sono presenti due recettori per adiponectina definiti AdipoR1 e AdipoR2, questi, contengono 7 domini transmembrana ma sono strutturalmente e funzionalmente distinti da recettori accoppiati alla proteina G.

AdipoR1 è espressa principalmente nel muscolo e funziona come un recettore ad alta affinità per adiponectina globulare e bassa affinità per adiponectina "full-length".

AdipoR2 è espresso principalmente nel fegato e funziona come un recettore ad affinità intermedia per adiponectina globulare e "full-length" (7).

Adiponectina aumenta la produzione di ossido nitroso endoteliale che agisce come protettivo del sistema vascolare in quanto riduce l'aggregazione piastrinica e induce vasodilatazione.

L'adiponectina viene considerata, essa stessa, una molecola antiaterosclerotica, poiché agisce come un fattore antitrombotico endogeno, inibisce l'attivazione dei macrofagi e l'accumulo delle cellule schiumose (elementi citologici critici di ateroma).

Ictus, malattia coronarica, steatoepatite, insulino-resistenza, steatosi epatica non alcolica, e una vasta gamma di tumori sono stati associati con una diminuzione dei livelli di adiponectina; ipoadiponectinemia è stata correlata ad un aumento di composti aterosclerosi-correlati, tra cui adipocyte fatty-acid-binding protein (A-FABP), lipocalin-2, così come ad altri marcatori di stress ossidativo (5).

Resistina

Resistina venne scoperta nel 2001, è una proteina di 12,5 kDa, costituita da 108 aminoacidi nell'uomo e 114 aminoacidi nei topi, è chiamata anche adipocyte-secreted factor (ADSF) o found in inflammatory zone 3 (FIZZ3). Appartiene alla famiglia FIZZ, circola soprattutto come esamero ad alto peso molecolare ma anche come complesso a basso peso molecolare molto attivo, viene espressa non solo dal WAT ma anche dalla milza, ipotalamo, ghiandola surrenale, muscolo scheletrico, tratto gastrointestinale e dal pancreas.

Questa adipochina stimola citochine infiammatorie quali interleuchine IL-1, IL-6 e IL-12, e TNF α attraverso nuclear factor kappa B (NF-k-B) pathway, è associata dunque con l'aumento della infiammazione ma anche con il danno articolare e con l'aumento dei livelli di interleukin 1 receptor antagonist (IL-1RA) in pazienti di sesso femminile con artrite reumatoide, inoltre, riduce la produzione da parte delle cellule endoteliali di intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell-adhesion molecule-1 (VCAM-1), e CC chemokine ligand-2 (CCL-2).

Alla resistina è stato attribuito un ruolo diabetogenico nei topi, ma la sua funzione nella patogenesi del diabete umana rimane materia di dibattito (5, 6).

Lipocalina 2

Lipocalina 2 (LCN-2), nota anche come siderocalin, 24p3, uterocalin, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, è una glicoproteina da 25 kDa isolata da granuli dei neutrofili, anche se WAT è la fonte principale.

Questa adipochina lega piccole sostanze lipofile come gli steroidi e i lipopolisaccaridi.

E' stato riportato che LCN-2 svolge un ruolo nella induzione di apoptosi nelle cellule ematopoietiche, nel trasporto degli acidi grassi, nella modulazione dell'infiammazione e nella regolazione del metabolismo del ferro.

LCN-2 è elevata nei pazienti con danno renale acuto, suggerendo che questa adipochina potrebbe essere un promettente biomarker di questa malattia.

Alcuni risultati suggeriscono un suo potenziale ruolo nella infiammazione cronica di basso grado nelle persone obese. A questo proposito è stato riportato che topi LCN-2 -Ko accumulano meno macrofagi nel tessuto grasso ed i livelli di espressione di mRNA di MCP-1 e TNF α sono inferiori rispetto ai topi wild-type.

Recenti studi hanno riportato che i livelli di LCN-2 sono correlati con maggior danno al fegato in modelli animali con disturbi epatici; infine, Chakraborty et al. hanno mostrato che livelli di LCN-2 sono aumentati sia nei topi che nell'uomo con pancreatite acuta grave, suggerendo un suo ruolo potenziale come biomarker per la pancreatite acuta grave (6).

Visfatina

Visfatina, chiamata anche pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF) e nicotinamide phosphoribosyl transferase (Nampt), è un polipeptide di 471 aminoacidi (52 kDa) codificata da un gene localizzato sul braccio lungo del cromosoma 7. Scoperta inizialmente nel fegato, midollo osseo, e muscolo; tuttavia, è sintetizzata in modo significativo anche dal grasso viscerale.

È stato riportato che la visfatina è aumentata nell'obesità, e che leucociti di pazienti obesi ne producono una maggiore quantità rispetto ai soggetti magri. I granulociti e monociti sono le principali cellule che la producono così come i macrofagi in cui promuove la sopravvivenza e riduce l'apoptosi.

Visfatina è in grado di indurre IL-6 e metalloproteinase 1 e 3 (MMP-1 e MMP-3) nei fibroblasti sinoviali nell'artrite e prostaglandin-E2 (PGE2), MMP, e "a-disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs"

ADAMTSs in condrociti di topo. Inoltre, agisce come mediatore pro-infiammatorio nelle malattie degenerative articolari, aumenta nei pazienti con malattia renale cronica, i suoi livelli sierici correlano con ICAM e VCAM, correla anche con l'infiammazione endoteliale, viene considerata come link per elevato rischio cardiovascolare in pazienti con malattia renale cronica, aumenta nelle placche della carotide in pazienti con aterosclerosi ed è in grado di indurre espressione dell'endothelial nitric oxide synthase (eNOS) nelle cellule endoteliali. Infine, visfatina, potrebbe essere considerata come targeting nel trattamento della infiammazione epatica (Figura 2) (6).

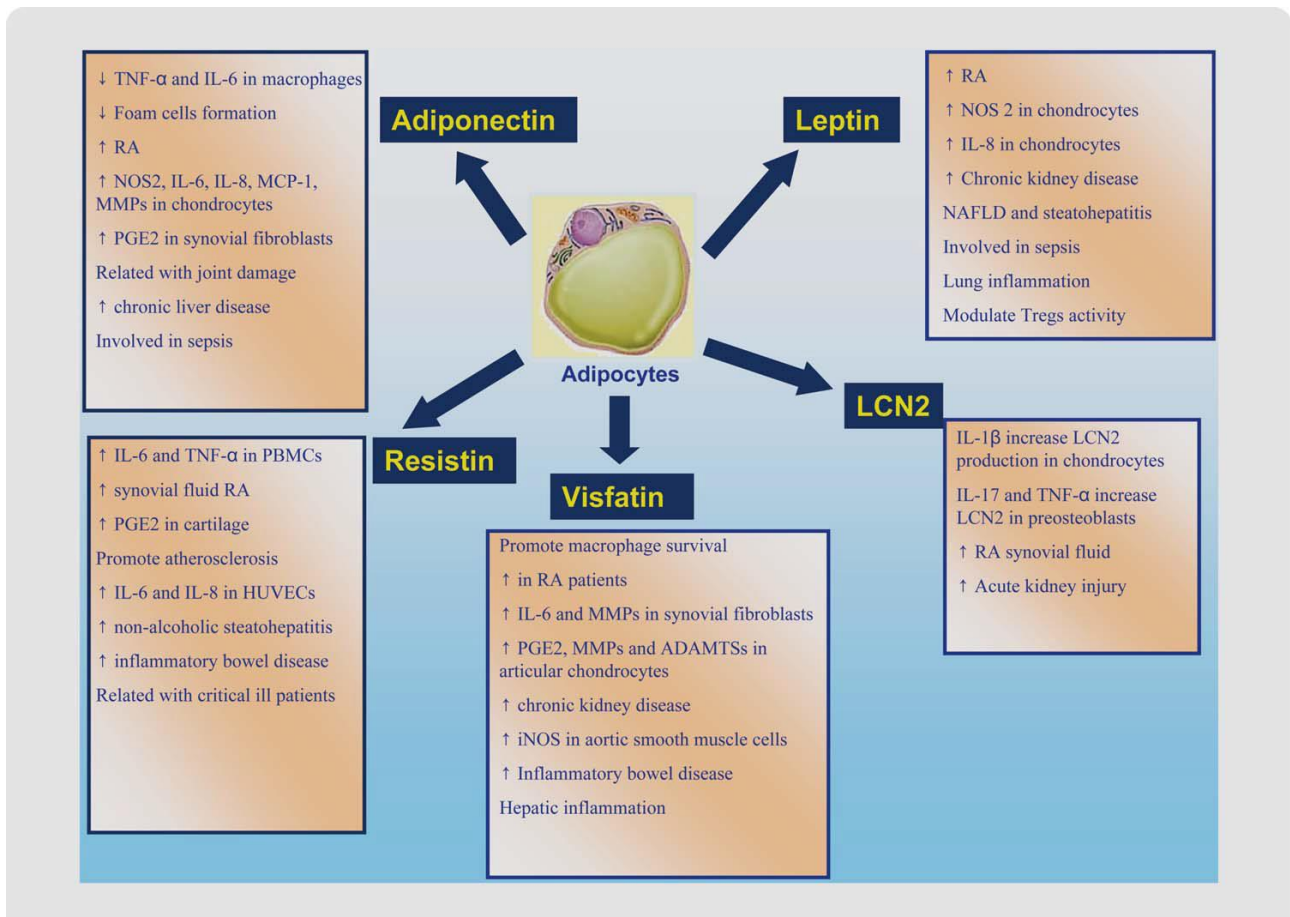


Figura 2: rappresentazione schematica della complessa interazione tra fattori biologici rilasciati dal tessuto adiposo bianco e diverse malattie infiammatorie (6).

IL-6 circolante si trova in molteplici forme glicosilate che vanno da 22 a 27 kDa, la sua concentrazione correla positivamente con l'obesità e la insulino resistenza, sia la sua espressione che i suoi livelli circolanti decrescono con la perdita di peso, la sua concentrazione plasmatica è predittiva per lo sviluppo del diabete di tipo II e delle malattie cardiovascolari.

IL-6 diminuisce il signaling insulinico nei tessuti periferici, riducendo l'espressione del recettore dell'insulina, induce soppressione del signaling della citochina interleuchina 3, un regolatore negativo della leptina e del signaling insulinico, inibisce adipogenesi e decresce la secrezione di adiponectina. Il suo recettore IL-6R è omologo al recettore della leptina ed esiste sia come proteina di membrana da 80-kDa sia come forma solubile da circa 50 kDa.

All'interno del tessuto adiposo, IL-6 e IL-6R sono espressi sia dagli adipociti che dalla matrice del tessuto adiposo; l'espressione e la secrezione di IL-6 è 2-3 volte maggiore nel tessuto adiposo viscerale rispetto al sottocutaneo, nel sangue vengono riportati alti livelli di IL-6 e di questi, circa 1/3 viene prodotto dal tessuto adiposo (7).

Fattore di necrosi tumorale (TNF α)

TNF α è una citochina inizialmente descritta come una endotossina che causa la necrosi dei tumori e, successivamente, è stato dimostrato che è identica a cachexin, un fattore secreto dai macrofagi in vitro; è una proteina transmembrana di 26kDa che viene scissa in una proteina biologicamente attiva da 17kDa che esercita i suoi effetti mediante recettori TNF α di tipo I e di tipo II. All'interno del tessuto adiposo, è espresso dagli adipociti e dalle cellule stromali vascolari.

La sua espressione è maggiore nel tessuto adiposo sottocutaneo rispetto al viscerale anche se dipende dalla quantità di massa grassa totale e regionale.

TNF α è coinvolta nella patogenesi dell'obesità e nella insulino-resistenza, la sua espressione nel tessuto adiposo aumenta nei roditori e negli esseri umani obesi ed è positivamente correlata con adiposità e insulino resistenza; nel tessuto adiposo, reprime i geni coinvolti nell'uptake e nello stoccaggio degli acidi grassi non esterificati circolanti e del glucosio, sopprime geni per fattori di trascrizione coinvolti nell'adipogenesi e nella lipogenesi, e modifica l'espressione di diversi fattori secreti dall'adipocita tra cui adiponectina e IL-6.

La compromissione del signaling insulinico da parte di TNF- α è mediato direttamente dall'attivazione della serin-chinasi che aumenta la fosforilazione della serina del recettore dell'insulina substrato 1 e 2, aumentando la loro degradazione e indirettamente aumentando gli acidi grassi non esterificati circolanti che, in modo indipendente, inducono insulino resistenza in vari tessuti (7).

Proteina chemiotattica monocitaria (MCP-1)

L'espressione di MCP-1 da parte del tessuto adiposo, ed il suo livello circolante, aumentano nei roditori obesi. E' stato ipotizzato che MCP-1 media la infiltrazione di macrofagi nel tessuto adiposo contribuendo alle anomalie metaboliche obesità correlate e all'insulino-resistenza. MCP-1 ha sia effetti locali sia di tipo endocrino. Colture di adipociti incubati con MCP-1 hanno minor stimolo insulinico, minor uptake del glucosio e fosforilazione delle tirosine del recettore insulinico, indotta dall'insulina, suggerendo che MCP-1 direttamente contribuisce alla insulino-resistenza nel tessuto adiposo; inoltre, inibisce la crescita e la differenziazione adipocitaria diminuendo l'espressione di geni adipogenici.

L'aumento di MCP-1 circolante nei roditori obesi si associa ad un aumento dei monociti circolanti.

La somministrazione periferica di MCP-1 ai topi aumenta i monociti circolanti, promuove il loro accumulo nelle

arterie collaterali, e aumenta la formazione della neointima.

Questi risultati supportano la funzione endocrina di MCP-1 e implicano anche lo sviluppo di aterosclerosi (7).

Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5)

Sfrp5 è una proteina che è legata al pathway di signaling Wnt. Recentemente è stata definita come un'adipochina antinfiammatoria la cui espressione è perturbata in modelli di obesità e diabete di tipo 2.

Ad esempio, topi Sfrp5 deficienti, alimentati con una dieta ipercalorica, sviluppano una grave intolleranza al glucosio e steatosi epatica; inoltre, il loro tessuto adiposo mostra un accumulo di macrofagi attivati che è stato associato con l'attivazione della via di signaling con l'attivazione di "c-Jun N-terminal kinase". Infine, il "delivery" di Sfrp5 mediato da adenovirus in modelli murini di obesità, migliora l'intolleranza al glucosio e la steatosi epatica. Così, in un quadro di obesità, Sfrp5 secreta dagli adipociti esercita effetti benefici sulla disfunzione metabolica controllando le cellule infiammatorie all'interno del tessuto adiposo (8).

1.1.2 Il tessuto adiposo bruno

Il tessuto adiposo bruno (BAT) è principalmente costituito da adipociti bruni definiti anche cellule multiloculari in quanto a livello citoplasmatico presentano numerosi piccoli vacuoli lipidici.

La forma degli adipociti bruni è poligonale o ellissoide, con un diametro minimo compreso tra 15µm a 20 µm e massimo tra 40µm e 50 µm. Gli organelli più importanti sono i mitocondri, i quali sono numerosi, grandi e ricchi di creste trasversali; inoltre, al microscopio elettronico a trasmissione, sono anche visibili altri organelli quali perossisomi, complesso di Golgi, reticolo endoplasmatico liscio e rugoso e vescicole (9).

BAT si trova in diverse località anatomiche distinte tra le quali vi è l'area sottocutanea, intraperitoneale e siti intratoracici. I depositi sottocutanei si trovano a livello delle regioni interscapolare e sottoscapolare, dorsale-cervicale, soprasternale e ascellare; i depositi intraperitoneali si trovano principalmente attorno ai reni e alle ghiandole surrenali (perirenale e surrenale), e i principali depositi intratoracici circondano il grande mediastino, i vasi sanguigni, il cuore, la trachea, l'esofago e l'aorta discendente.

La funzione principale del BAT è quella di produrre calore (termogenesi): i mitocondri degli adipociti bruni contengono uncoupling protein-1 (UCP1).che, quando

attivata, aumenta la perdita dei protoni facilitando la traslocazione di questi nella matrice con il conseguente crollo della forza motrice protonica alla membrana mitocondriale interna; questo stato completamente disaccoppiato a sua volta porta ad una massima attività della catena respiratoria; il calore viene quindi generato dalla combustione del substrato disponibile e viene distribuito al resto del corpo attraverso la circolazione (10).

1.2 L'obesità

L'obesità viene definita come una condizione medica in cui un eccesso di accumulo di grasso corporeo si associa a effetti negativi sulla salute determinando un aumento della comorbilità e riducendo l'aspettativa di vita. Le persone sono generalmente considerate obese quando il loro indice di massa corporea (BMI) (una misura ottenuta dividendo il peso corporeo per il quadrato dell'altezza) è superiore a 30 kg / m², mentre sono sovrappeso se il BMI è compreso tra 25-30 kg / m².

L'obesità aumenta il rischio di varie malattie, quali patologie coronariche, ictus, diabete di tipo 2, ipertensione, dislipidemia, apnea ostruttiva del sonno, alcuni tipi di cancro, l'osteoartrite, steatoepatite non alcolica, con conseguente riduzione dell'aspettativa di vita e notevole aumento della spesa sanitaria (11-13).

1.2.1 Cause

I risultati di studi trasversali e prospettici suggeriscono che il consumo eccessivo di cibo e uno stile di vita prevalentemente sedentario può causare l'obesità, mentre l'adozione di uno stile di vita più sano può impedirla. È stato dimostrato che la mancanza di attività, il tempo trascorso a guardare la televisione, ed il modello alimentare occidentale possono aumentare notevolmente le probabilità di diventare obesi; allo stesso tempo, una vita più sana che comprende livelli elevati di attività fisica e consumo alimentare prudente, riducono in modo significativo tale rischio (14).

Nutrizione

Una rapida crescita economica, cambiamenti nelle scelte alimentari, nella disponibilità di alimenti e nella dieta hanno contribuito alla promozione di un bilancio energetico positivo e alla over-nutrizione.

Negli ultimi decenni si è assistito ad un aumento globale del consumo di grassi, prodotti animali e oli vegetali e ad una diminuzione del consumo di cereali e ortaggi.

Numerosi studi epidemiologici hanno associato l'assunzione di carne rossa e trasformati ad un aumento di peso, oltre ad un maggior rischio di diabete di tipo 2, malattie cardiache e alcuni tipi di cancro.

Per quanto riguarda il consumo di grassi, gli alimenti ricchi di grassi monoinsaturi e polinsaturi sono stati associati con numerosi benefici per la salute, mentre i grassi saturi e trans sono stati associati ad aumentato rischio cardiometabolico e insulino-resistenza.

Inoltre l'alimentazione dei paesi industrializzati si caratterizza per l'assunzione di carboidrati raffinati e lavorati con conseguente rimozione della fibra, di numerosi micronutrienti e sostanze fitochimiche. I carboidrati raffinati, che producono un alto indice e carico glicemico ed escursioni rapide di glucosio nel sangue, sono stati associati con aumentato rischio di obesità e di diabete di tipo 2.

Negli ultimi quarant'anni, il consumo di zucchero, sottoforma di bevande zuccherate, è aumentato drammaticamente in tutto il mondo; questo tipo di bevande promuovono l'aumento di peso in quanto non inducono alti livelli di sazietà. Inoltre, le bevande zuccherate contribuiscono ad un aumento del rischio di diabete di tipo 2 indotto non solo dall'aumento di peso, ma anche dagli effetti glicemici di consumo di grandi quantità di zuccheri rapidamente assorbibili e dagli effetti metabolici del fruttosio. Studi epidemiologici hanno mostrato una forte associazione tra l'assunzione di bevande dolcificate ed aumento di peso, obesità, diabete di tipo 2 e malattie coronariche.

In uno studio clinico randomizzato, la sostituzione di bevande caloriche con bevande non caloriche per 6 mesi ha provocato perdite di peso medio di 2,0-2,5%; questi dati dimostrano che limitare il consumo di bevande zuccherate può essere una strategia efficace per ridurre l'apporto calorico e quindi l'obesità e le comorbilità correlate, in tutto il mondo (15).

Sedentarietà

Numerosi studi epidemiologici sostengono il ruolo dell'esercizio fisico nella prevenzione dell'obesità e diabete mellito di tipo 2, al contrario, un comportamento di tipo sedentario è associato con un aumento di peso e con l'obesità.

Inoltre, la prevalenza di obesità è risultata essere più bassa tra gli uomini di mezza età che mantengono un livello relativamente alto di vigorosa attività fisica nel tempo, rispetto a quelli che sono relativamente sedentari. L'aumento dei livelli di attività fisica risulta essere positivamente associato con il colesterolo HDL e

inversamente con la leptina ed il peptide-C, mentre la sedentarietà si associa positivamente con il colesterolo LDL e con i livelli di leptina e inversamente con HDL e apolipoproteina A-1 (16, 17).

Fattori genetici

Come molte altre condizioni mediche, l'obesità è il risultato di una interazione tra fattori genetici e ambientali. L'obesità genetica è il risultato di variazioni strutturali o mutazioni che interessano geni che codificano proteine coinvolte nella regolazione dell'appetito e del metabolismo.

Mediante studi di associazione genome-wide, è stato possibile definire il gene "fat mass and obesity associated" (FTO) come gene di suscettibilità all'obesità.

Un gruppo di varianti nel primo introne del gene FTO ha mostrato una forte associazione altamente significativa con tratti correlati all'obesità in tre studi indipendenti di associazione genome-wide, confermati da altri studi sia negli adulti che nei bambini di discendenza europea.

Omozigoti per l'allele di rischio, pesano in media 3-4 kg in più ed hanno un rischio di obesità pari a 1,67 volte rispetto a quelli che non hanno ereditato un allele di rischio.

Studi condotti su esseri umani e roditori hanno suggerito un ruolo centrale del gene FTO attraverso la regolamentazione dell'assunzione di cibo, mentre altri hanno proposto un ruolo periferico con effetto sull'attività lipolitica nel tessuto adiposo (18).

Inoltre, lo studio dell'estrema obesità dovuta a singole mutazioni geniche ha fornito preziose informazioni sul ruolo del pathway melanocortina-leptina nel bilancio energetico.

Una mutazione omozigote frameshift del gene della leptina, con conseguente trascrizione tronca della proteina, è stata scoperta nel 1997 in due cugini gravemente obesi all'interno di una famiglia di consanguinei di origine pakistana; inoltre, uno studio su due pazienti con obesità grave ad insorgenza precoce con mutazione omozigote del gene leptina ha rivelato che tale mutazione influisce sulla sua funzione proteica piuttosto che sull'espressione, portando ad una proteina leptina bioinattiva.

Manifestazioni cliniche di pazienti con mutazioni del gene per la leptina includono rapido aumento di peso entro il primo anno di vita, grave iperfagia e comportamento insofferente in condizioni di restrizione alimentare, ipogonadismo ipogonadotropo con conseguente ritardo della pubertà, difettiva immunità mediata da cellule T e bassa pressione sanguigna nonostante la grave obesità. Le caratteristiche cliniche che derivano da deficit di leptina possono essere invertite con la terapia con leptina: ad

esempio dodici mesi di trattamento in una bambina di 9 anni con deficit di leptina, ha comportato la riduzione di peso dovuto principalmente alla perdita di grasso corporeo, ridotto apporto energetico e aumento delle concentrazioni di gonadotropine.

Anche mutazioni che portano alla perdita di funzione della proteina adattatore SH2B1, regolatore chiave della leptina, provoca grave obesità ad esordio precoce, iperfagia, altezza ridotta e anomalie comportamentali.

La prima forma recessiva di obesità causata da carenza di proopiomelanocortina (POMC) è stata scoperta nel 1998. Oltre all'obesità, i pazienti con mutazioni POMC, mostrano ipocortisolismo, capelli rossi, pelle ipopigmentata, ipoglicemia neonatale, convulsioni, colestasi e appetito vorace.

Tre pazienti con una forma monogenica recessiva di obesità sono stati trovati ad essere carenti del gene “pro-protein convertase subtilisin/kexin type 1” (PCSK1). La completa carenza di “prohormone convertase 1” (PC1 / 3), codificato da PCSK1, determina esordio precoce dell'obesità, iperfagia, ipoglicemia postprandiale e altre disfunzioni endocrine, a causa del suo ruolo nella scissione della proinsulina in insulina e POMC in “alpha-melanocyte-stimulating hormone” (α -MSH).

Pazienti con deficit del gene “melanocortin 4 receptor” (MC4R) mostrano aumento di massa grassa e di massa magra, iperinsulinemia, aumento della crescita staturale e aumento della massa ossea sia nei bambini che negli adulti.

Una mutazione missenso del gene “tyrosine kinase receptor type 2” (NTRK2) è stata trovata in un ragazzo con insorgenza precoce di obesità, iperfagia, ritardo dello sviluppo e compromissione della memoria a breve termine; la neurogenesi ipotalamica alterata nei pazienti con mutazioni NTRK2 può spiegare l'iperfagia e l'obesità osservata.

“Kinase suppressor of Ras 2” (KSR2) è una proteina scaffolding coinvolta in molteplici vie di signaling attraverso cascate chinasi collegate alla regolazione dell'assunzione di cibo, al contenuto di grasso corporeo e omeostasi del glucosio. Mutazioni che portano alla perdita di funzione di KSR2, sono state identificate negli esseri umani e sono state associate con iperfagia, obesità ad esordio precoce, bassa frequenza cardiaca, ridotto metabolismo basale e grave insulino resistenza.

Mutazioni in “Tubby bipartite transcription factor” (TUB) sono state osservate in un ragazzo di 11 anni appartenente ad una famiglia di consaguinei caucasici. I sintomi includevano il deterioramento della vista, l'obesità e normali livelli di glucosio, colesterolo e triacilgliceroli (19).

1.2.2 Epidemiologia

Dal 1980, la prevalenza di obesità a livello globale, standardizzata per età, è quasi raddoppiata dal 6,4% nel 1980 al 12,0% nel 2008 (Figura 3). Statistiche globali hanno rivelato che nel 2008 circa 1,46 miliardi di persone avevano un BMI ≥ 25 kg / m² e 508 milioni di persone erano obese. Nello stesso periodo, il numero di adulti in sovrappeso e obesi, nei paesi in via di sviluppo, è triplicato da 250 milioni nel 1980 a 904 milioni nel 2008. La maggior prevalenza è stata osservata nelle persone di sesso femminile rispetto a quelle di sesso maschile. Sia le popolazioni rurali che urbane sono interessate; in alcune regioni vi è un maggior aumento della prevalenza di persone sovrappeso e obese nelle zone rurali, tuttavia, a livello globale, la prevalenza è più alta nelle aree urbane. Negli Stati Uniti, nel 2011 / 2012 circa il 35% degli adulti sono risultati essere obesi, il 33.5% uomini e 36.1% donne ((BMI) ≥ 30 kg / m²). I tassi di prevalenza sono risultati essere significativamente più elevati negli adulti di mezza età (tra 40 e 59 anni), rispetto a quelli di età superiore ai 60 anni, e a quelli di età compresa tra i 20 ed i 39 anni (39.5% rispetto al 35.4% e 30.3% rispettivamente); inoltre, la prevalenza di obesità è risultata essere significativamente più elevata tra gli adulti delle aree rurali rispetto a quelli delle aree urbane (39.6% rispetto al 33.4%).

Se si considerano i gruppi etnici e razziali, gli adulti asiatici hanno la più bassa prevalenza di obesità (10.8%), seguiti dai non ispanici bianchi (32.6%), ispanici (42.5%), e non ispanici neri (47.8%); all'interno dei gruppi razziali ed etnici non ci sono differenze significative tra maschi e femmine, ad eccezione delle donne nere non ispaniche (56.6% donne e 37.1% uomini) (20).

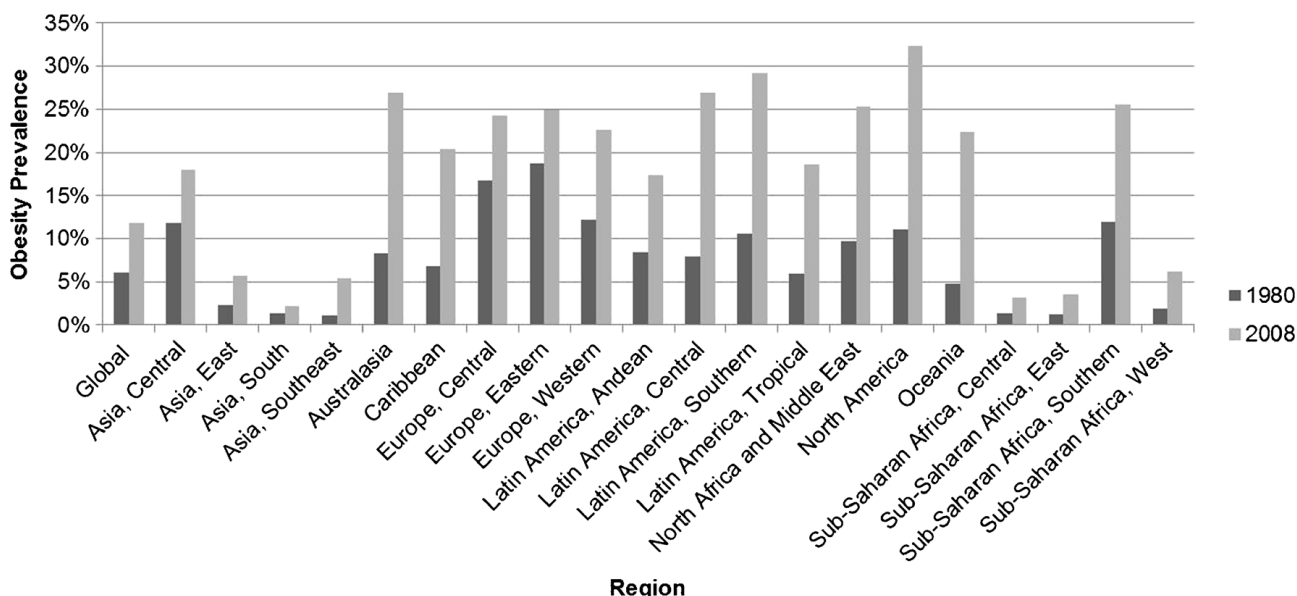


Figura 3: prevalenza di obesità per regione tra gli adulti di età superiore ai 20 anni (1980 e 2008) (20).

1.2.3 Cancro, tessuto adiposo e obesità

Il cancro è la principale causa di morte nei paesi sviluppati e la seconda causa di morte nei paesi in via di sviluppo. Il numero dei casi di cancro è previsto in aumento a causa del crescente invecchiamento della popolazione.

Studi epidemiologici hanno dimostrato che l'obesità è associata ad un aumentato rischio di diversi tipi di cancro, tra cui colon, endometrio, mammella, rene, esofago, pancreas, cistifellea, fegato, e neoplasie ematologiche; inoltre, l'obesità può portare ad una riduzione dei risultati attesi dal trattamento, peggiora la prognosi, e porta ad un aumento della mortalità cancro-associata.

Meccanismi biologici alla base del rapporto tra obesità e cancro comprendono gli ormoni correlati all'obesità, fattori di crescita, la modulazione del bilancio energetico e della restrizione calorica, molteplici vie di signaling e processi infiammatori che interessano la promozione e la progressione delle cellule tumorali (21).

Inoltre, diversi studi indicano che nel tessuto adiposo bianco di soggetti obesi vi è una diminuzione della maturazione dei preadipociti ad adipociti, così come una rottura dell'equilibrio tra le due adipochine più importanti: leptina e adiponectina.

Preadipociti producono citochine per creare un microambiente favorevole per la loro proliferazione e per il reclutamento di precursori endoteliali necessari per generare un afflusso di sangue; inoltre, citochine secrete da preadipociti attirano monociti, che contribuiscono alla locale produzione di fattori pro-angiogenici e alla produzione di citochine proinfiammatorie che

compromettono la maturazione degli adipociti dai preadipociti; questi meccanismi danno luogo ad un microambiente tossico nel tessuto adiposo di pazienti obesi che è favorevole alla crescita tumorale.

Citochine proinfiammatorie mediano il reclutamento di macrofagi e cellule T; macrofagi infiltranti a loro volta secernono mediatori del sistema immunitario che aumentano i livelli sia locali che circolanti delle citochine stesse (22).

La leptina, ormone secreto dal tessuto adiposo bianco, è stata ampiamente studiata come un potenziale mediatore dell'obesità legata al cancro, induce infatti la progressione tumorale attraverso l'attivazione di vari pathways: "phosphatidylinositol 3-kinase" (PI3K), "mitogen-activated protein kinases" (MAPK) e "signal transducer and activator of transcription 3" (STAT3).

L'adiponectina, polipeptide prodotto esclusivamente dagli adipociti, ed in particolare dal tessuto adiposo viscerale, al contrario della leptina, può esercitare effetti antitumorali diminuendo la insulina, "insuline-like growth factor" (IGF-1) e "mammalian target of rapamycin" (mTOR) signaling attraverso l'attivazione di "5' AMP-activated protein kinase" (AMPK) ed esercitando azioni anti-infiammatorie attraverso l'inibizione di "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells" (NFkB) (21).

Comunque, l'obesità viene associata a iperinsulinemia e / o iperglicemia, a insulino-resistenza, aberrante metabolismo del glucosio, infiammazione cronica e produzione di alti livelli di IGF-1 che viene riportato essere un fattore di rischio per molti tipi di cancro; anche l'attivazione di mTOR è aumentata nei tumori e nei tessuti sani di modelli animali obesi e / o diabetici, inoltre, l'inibizione di mTOR blocca in modo specifico gli effetti dell'obesità sul tumore nei modelli murini (23).

1.3 Il microambiente tumorale

Numerosi studi hanno messo in luce la complessità dei tumori ed il microambiente in cui le cellule tumorali si trovano: all'interno cioè di una popolazione eterogenea di cellule stromali.

In particolare, il microambiente tumorale è costituito da un insieme eterogeneo di diversi tipi cellulari, tra cui, oltre alle cellule maligne, sono presenti cellule del sistema immunitario, cellule del sistema vascolare e dei vasi linfatici (cellule endoteliali), fibroblasti, periciti, adipociti e cellule stromali derivate dal tessuto adiposo. Queste cellule vengono spesso contraddistinte mediante marcatori cellule-tipo-specifici che sono spesso molecole presenti sulla superficie cellulare (24, 25).

Le cellule presenti nel microambiente tumorale possono essere coinvolte nella chemioresistenza che le cellule tumorali acquisiscono. I meccanismi di chemioresistenza sarebbero dovuti (a) alle interazioni cellula-cellula e cellula-matrice che influenzano la sensibilità delle cellule tumorali all'apoptosi; (b) al rilascio locale di fattori solubili che promuovono la sopravvivenza e la crescita tumorale (crosstalk tra le cellule stromali e tumorali); (c) alle interazioni dirette cellula-cellula con le cellule tumorali; (d) alla generazione di specifiche nicchie all'interno del microambiente tumorale che facilitano l'acquisizione di resistenza ai farmaci; (e) alla conversione delle cellule tumorali a cellule staminali del cancro (24).

1.3.1 Cellule del microambiente tumorale e loro effetti

Linfociti T

Ci sono varie popolazioni di cellule T nel microambiente tumorale che infiltrano le aree tumorali, queste possono trovarsi al margine del tumore invasivo e negli organi linfoidi di drenaggio.

Tra queste, le cellule T citotossiche di memoria CD8(+) (CD8+ CD45RO+), sono in grado di uccidere le cellule tumorali e quindi vengono associate con una buona prognosi.

Le cellule T CD8(+) sono supportate dalle cellule T helper 1 (Th1) CD4(+) caratterizzate dalla produzione di citochine quali interleuchina-2 (IL-2) e interferone gamma (IFN- γ); un numero elevato anche di queste cellule correla con una buona prognosi.

Altre popolazioni di cellule CD4(+), come le cellule TH2 che producono IL-4, IL-5 e IL-13, che supportano la risposta delle cellule B, o le cellule TH17, che producono IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 vengono generalmente descritte come cellule che promuovono la crescita tumorale, sebbene siano state anche associate ad esito favorevole nel caso delle cellule TH2 nel cancro al seno e TH17 nel caso dei tumori dell'esofago.

Le cellule T CD4(+), che vengono descritte come cellule tumore favorenti, sono cellule T regolatorie immunosoppressive caratterizzate dall'espressione di FOXP3 e CD25 che svolgono la loro funzione immunosoppressiva mediante produzione di IL-10, "transforming growth factor beta" (TGF- β) e "cell-mediated contact through cytotoxic T-lymphocyte antigen-4" (CTLA4), inibendo il riconoscimento delle cellule tumorali dal sistema immunitario; un alto numero di queste cellule nel microambiente tumorale, correla con una prognosi sfavorevole nella maggior parte dei tumori.

Linfociti T $\gamma\delta$, con caratteristiche dell'immunità innata piuttosto che adattativa, sembrano mostrare una attività citotossica contro un'ampia gamma di cellule maligne, tra cui le cellule staminali tumorali (25).

Linfociti B

Le cellule B possono essere trovate al margine invasivo dei tumori, e più spesso nei linfonodi drenanti e nelle strutture linfoidei adiacenti al microambiente tumorale. La loro infiltrazione nel microambiente tumorale sembra essere associata con una buona prognosi, ad esempio nel cancro al seno e alle ovaie, anche se in modelli animali vengono descritte come inibenti della risposta delle cellule T citotossiche tumore specifiche.

Una popolazione immunosoppressiva di cellule B, conosciute come cellule B regolatorie o B10 (B regs) produttrici IL-10, sono associate con un aumento della massa tumorale e inibiscono la risposta immunitaria tumore-specifica nel cancro della pelle infiammazione indotta e, infine, favoriscono le metastasi polmonari in un modello murino di cancro al seno.

Questo tipo di cellule, nei modelli animali, sembra influenzare altre cellule immunitarie circostanti il tessuto linfoide o dei linfonodi drenanti, nonché andando a modulare l'attività di cellule mieloidi.

Rimane comunque da stabilire se hanno ruoli simili nei tumori umani (25).

Cellule Natural Killer (NK) e Natural Killer T (NKT)

Linfociti citotossici NK e NKT della immunità innata, infiltrano lo stroma del tumore ma non sono a stretto contatto con le cellule tumorali.

Questi tipi di cellule sembrano essere correlate con una buona prognosi in molti tipi di tumore, quali il cancro al colon-retto, dello stomaco, del polmone, cancro al rene e del fegato.

Però, anche se presenti nel microambiente tumorale, le cellule NK potrebbero anche non essere in grado di esercitare la loro capacità di uccidere le cellule tumorali (25).

Macrofagi tumore associati (TAMs)

TAMs sono abbondanti sia nei tumori di origine umana sia in quelli murini sperimentali e sembra che la loro attività sia di tipo pro-tumorigenica in quanto promuovono la migrazione, l'invasione, la metastasi delle cellule maligne e l'angiogenesi.

La maggior parte di queste cellule hanno un fenotipo IL-10^{high} e IL-12^{low} ed esprimono recettore per il mannosio e recettore scavenger di classe A (SR-A o SCARA).

Ci sono evidenze pre-cliniche e cliniche che l'abbondanza dei TAM nel microambiente tumorale sia associata a prognosi sfavorevole indipendente da altre variabili cliniche.

L'interazione bidirezionale tra macrofagi e microambiente tumorale modella il loro fenotipo e la loro risposta alle condizioni ambientali.

TAMs accumulano in aree di necrosi e di ipossia dei tumori per effetto del rilascio di fattori chemiotattici quali ad esempio "vascular endothelial growth factor" (VEGF) ed "endothelial-monocyte-activating polypeptide II" (EMAP2 o AIMP1) (25).

Cellule soppressorie di derivazione mieloide (MDSCs)

MDSCs vengono definite come cellule immunitarie inibitorie ed aumentano come numero in una varietà di tumori sia nel topo che nell'umano. La loro caratterizzazione è difficile in quanto il loro fenotipo è molto variabile, inoltre, possono anche differenziarsi in TAMs.

MDSCs sia murine che umane inibiscono l'attivazione delle cellule T CD8(+) mediante l'espressione di "nitric oxide synthase 2" (NOS2) e dell'arginase (ARG1), inoltre inducono lo sviluppo delle cellule T regolatorie e la polarizzazione dei macrofagi ad un fenotipo TAM-like (25).

Cellule dendritiche

In generale, le cellule dendritiche hanno importanti funzioni nel processamento e presentazione degli antigeni. Cellule dendritiche che si trovano nel microambiente tumorale non possono adeguatamente stimolare una risposta immunitaria agli antigeni associati al tumore. L'ipossia e il microambiente infiammatorio compromettono ulteriormente le cellule dendritiche ad attivare la funzione immunitaria. Infine, sono state trovate anche alcune di queste cellule in grado di sopprimere le risposte delle cellule T nel sito del tumore (25).

Neutrofili tumore associati (TANs)

Il contributo dei TANs alla crescita e alla metastasi del tumore primario è piuttosto controversa.

Ci sono evidenze che i neutrofili promuovono la crescita del tumore primario in modelli di cancro del topo, con effetti pro-tumoralmente dovuti all'aumento dell'angiogenesi,

aumento della degradazione della matrice extracellulare e all'attività immunosoppressiva; al contrario, una funzione antitumorale di queste cellule è stata osservata dopo l'attivazione con citochine: in queste condizioni, i neutrofili possono eliminare le cellule tumorali disseminate ed inibire TGF- β (25).

Fibroblasti cancro associati (CAF)

Quando i tessuti sono danneggiati, fibroblasti residenziali si differenziano in miofibroblasti in seguito alla risposta ai segnali paracrini. L'induzione di miofibroblasti può causare fibrosi dell'organo, che aumenta il rischio di sviluppo del cancro. Miofibroblasti sono abbondanti nel microambiente tumorale e, in questo sistema, sono stati anche chiamati fibroblasti cancro-associati (CAF).

I CAF possono derivare da vari precursori residenti, quali le cellule endoteliali, le cellule muscolari lisce, le cellule mioepiteliali e le cellule staminali mesenchimali (Balkwill 2012); inoltre, recenti studi hanno dimostrato che i CAF possono derivare da fenomeni di de-differenziamento degli adipociti peritumorali sia in modelli di cancro in vivo sia in modelli in vitro (26).

Questo tipo di cellule secerne fattori di crescita quali i membri della famiglia "Epidermal Growth Factor" (EGF), "hepatocyte growth factor" (HGF), "fibroblast growth factor" (FGFs), "insulin-like growth factor 1" (IGF1) che hanno attività mitogenica per le cellule tumorali, TGF- β che induce la transizione epitelio-mesenchimale delle cellule maligne e contribuisce all'attività immunosoppressiva nel microambiente e infine chemochina CXCL12 che può promuovere la crescita e la sopravvivenza delle cellule maligne ed ha anche proprietà chemotattiche che stimolano la migrazione di altri tipi di cellule stromali e loro progenitori nel microambiente tumorale.

In modelli murini di cancro alla pelle, al seno e tumori pancreatici, CAF esprimono geni proinfiammatori che contribuiscono alla crescita tumorale mediante neovascolarizzazione e reclutamento di cellule immunitarie; inoltre CAF producono componenti della matrice extracellulare (ECM) ed enzimi di rimodellamento della stessa (25).

Cellule endoteliali vascolari

Molti fattori solubili presenti nel microambiente tumorale, come VEGF, FGF, "platelet-derived growth factors" (PDGFs) e chemochine stimolano le cellule endoteliali ed i periciti ad esse associati durante la neovascolarizzazione necessaria per la crescita del cancro.

Quando un vaso sanguigno quiescente rileva un segnale angiogenico derivato da cellule maligne o infiammatorie, o da condizioni di ipossia nel microambiente tumorale, viene stimolata l'angiogenesi e quindi si formano nuovi vasi dal sistema vascolare esistente.

Il sistema vascolare del tumore è anormale in quasi tutti gli aspetti della sua struttura e funzione: ad esempio, i vasi sanguigni sono eterogenei con ramificazioni a struttura caotica e lume irregolare.

La perdita di permeabilità dei vasi aumenta la pressione del fluido interstiziale causando irregolarità del flusso di sangue, ossigenazione, nutrimento e distribuzione del farmaco nel microambiente tumorale; questo aumenta l'ipossia e facilita la metastasi.

VEGF è il fattore angiogenico predominante nel microambiente tumorale ed è prodotto sia da cellule maligne sia da cellule infiammatorie (25).

Periciti

Le cellule stromali perivascolari, dette periciti, sono parte integrante del sistema vascolare del tumore ed hanno la funzione di fornire supporto strutturale ai vasi sanguigni. Studi clinici nel cancro alla vescica e al retto, suggeriscono che una bassa copertura da parte dei periciti del sistema vascolare correla con prognosi infausta e ad un aumento di metastasi. Uno studio in vivo che ha utilizzato modelli di topi con deplezione dei periciti, ha osservato un aumento di ipossia, attivazione di recettori "epithelial-mesenchymal transition" (EMT) e "mesenchymal-epithelial transition" (MET) che correla con una prognosi sfavorevole nelle donne con carcinoma mammario invasivo e aumento di metastasi (25).

Cellule endoteliali linfatiche

Neoplasie guidano la linfoangiogenesi e la iperplasia linfatica attraverso la produzione di VEGFC e VEGFD. Anche se le cellule tumorali possono invadere i vasi linfatici esistenti, se le cellule maligne o macrofagi secernono alti livelli di VEGFC o VEGFD, nel microambiente tumorale saranno presenti molti più vasi linfatici; cellule endoteliali linfatiche e i nuovi vasi linfatici presenti nel microambiente tumorale, hanno una funzione importante nella diffusione delle cellule maligne (25).

Adipociti

Il ruolo del tessuto adiposo, e più nello specifico degli adipociti, nell'iniziazione, nella crescita e nella metastasi tumorale è un settore relativamente nuovo di indagine. Il ruolo del tessuto adiposo nel cancro sta emergendo grazie a due principali osservazioni: la prima riguarda la dimostrazione, mediante studi epidemiologici, dell'associazione tra obesità e alcuni tipi di tumore (ad esempio esofago ed endometrio), e la seconda riguarda il fatto che adipociti costituiscono una componente fondamentale del microambiente tumorale per quanto riguarda ad esempio il cancro al seno e tumori addominali (gastrico, al colon, ed ovarico). Inoltre, sono state trovate diverse analogie tra un tumore dominato da un microambiente adipocitario e la funzione del tessuto adiposo nel diabete di tipo II e nell'obesità (Figura 4). I due microambienti condividono caratteristiche istologiche simili, tra cui la presenza di cellule infiammatorie, in particolare macrofagi, che secernono citochine infiammatorie e adipociti che producono adipochine che sostengono uno stato attivo del tessuto, e promuovono la progressione di entrambe le malattie (27).

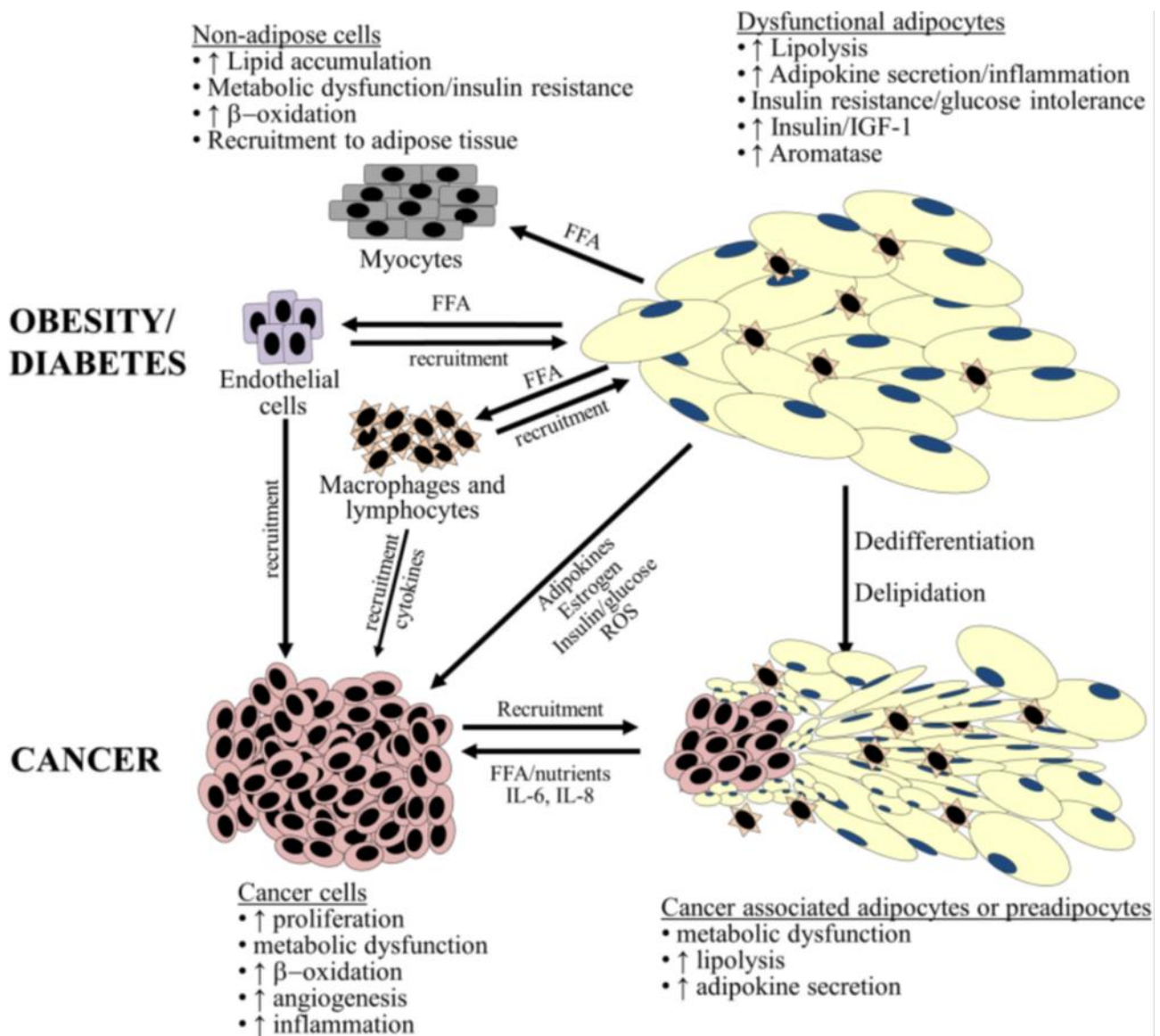


Figura 4: adipociti nell'obesità e nel cancro: esistono somiglianze tra adipociti coinvolti nella tumorigenesi e nell'obesità. Queste patologie determinano reclutamento delle cellule immunitarie comprese macrofagi e linfociti, la secrezione di citochine da adipociti (leptina, IL-6, IL-8 e TNF- α), la loro delipidizzazione e potenziale de-differenziamento a cellule simil-fibroblasti, espulsione di nutrienti quali acidi grassi liberi che vengono assimilati da cellule tumorali o da altre cellule non adipose (miociti, macrofagi e cellule endoteliali vascolari) (27).

Nei tumori che crescono in un microambiente dominato da adipociti, è stato osservato che questi scompaiono e si accumulano cellule simil-fibroblasti con conseguente formazione di uno stroma desmoplastico. Ad esempio, sia nel cancro ovarico sia nel tumore renale, cellule tumorali sostituiscono ed invadono il microambiente adipocitario e gli adipociti svaniscono. Studi istologici di questi e altri tipi di cancro dell'addome (colon, stomaco e pancreas) confermano che gli adipociti

che si trovano a livello del fronte invasivo del tumore diventano più piccoli e il numero di cellule fibroblasto-simili aumenta. Si ipotizza pertanto che cellule simil-fibroblasti possono essere preadipociti derivati dal de-differenziamento degli adipociti (27).

Studi in coltura cellulare utilizzando la linea di cellule murine preadipociti 3T3-L1 differenziate ad adipociti, suggeriscono che questi promuovono la crescita, la proliferazione e la sopravvivenza di linee cellulari di cancro al seno umano in condizioni di siero limitato. Medium condizionato da 3T3-L1 differenziate, iniziano un programma trascrizionale che supporta l'invasione delle cellule di cancro al seno attraverso fattore trascrizionale AP-1 e la proliferazione attraverso NF κ B e Ciclyn D1; tuttavia, rimane da chiarire quali fattori presenti nel medium condizionato mediano questi effetti.

Altre evidenze che stabiliscono un cross-talk tra adipociti e cellule del cancro al seno vengono riportate in uno studio molto importante che utilizza cellule murine preadipociti 3T3-F442A differenziate.

La co-coltura degli adipociti con entrambe le linee di cellule di cancro al seno murine ed umane aumenta la invasività delle cellule tumorali in vitro.

È importante notare che le cellule sono state coltivate in un sistema transwell che impedisce il contatto diretto tra le cellule tumorali e gli adipociti, questo indica che i fattori secreti dagli adipociti erano i probabili responsabili della maggiore invasione delle cellule del cancro al seno.

In un altro studio, le cellule di topo del cancro alla mammella in coltura con adipociti maturi e iniettate nella vena della coda di topo, hanno determinato un maggior carico tumorale metastatico rispetto alle cellule tumorali che non sono state coltivate con adipociti. I ricercatori, in questo studio, hanno anche indicato che adipociti esposti a cellule del cancro al seno hanno subito cambiamenti fenotipici tra cui delipidizzazione, perdita di marcatori terminali (APN, resistina, e FABP4) e aumento di espressione di citochine proinfiammatorie, tra cui IL-6 e PAI-1.

Un ulteriore esempio di crosstalk tra gli adipociti e le cellule tumorali è dato dalla reversione degli adipociti ad un fenotipo di fibroblasti / preadipociti da parte delle cellule maligne. Questo è compatibile con la teoria che gli adipociti e fibroblasti hanno origine dalle stesse cellule staminali mesenchimali.

Il cross-talk tra adipociti e le cellule tumorali può rappresentare un nuovo target per la prevenzione del cancro; sembra che fattori adipocitari TGF- β e TNF- α , e la sovraregolazione della metalloproteinasi-11 (MMP-11), siano probabilmente in parte responsabili degli effetti della promozione del tumore da parte dei preadipociti; in

particolare, MMP-11 è indotta negli adipociti vicini al fronte di invasione delle cellule tumorali, da queste stesse cellule; in presenza di MMP-11, adipociti dedifferenziano in preadipociti / fibroblast-like che sostengono l'invasione delle cellule tumorali, pertanto, se il de-differenziamento degli adipociti normali fosse bloccato, i primi passaggi della cancerogenesi potrebbero essere evitati (27).

In studi di cancro alla prostata, è stato osservato che gli adipociti possono anche fornire mediatori lipidici per sostenere la tumorigenesi, come evidenziato dalla traslocazione di lipidi da adipociti a cellule di cancro alla prostata mediante tecnica spettroscopica FTIR; è inoltre interessante notare che nelle cellule tumorali della prostata la β -ossidazione è una delle principali fonti di utilizzo di energia e l'utilizzo di glucosio risulta essere basso.

Questo fenomeno è stato osservato anche nel cancro ovarico in cui, una volta che le cellule tumorali ovariche interagiscono con gli adipociti, ha inizio la lipolisi mediata da "hormone-sensitive lipase" (HSL) per cui si ha la liberazione degli acidi grassi che vengono poi ripresi dalle cellule di cancro ovarico per la produzione di energia mediante stimolo del metabolismo mitocondriale che supporta una veloce crescita delle cellule tumorali (27).

1.4 Wnt signaling

Wnt signaling pathways sono un gruppo di vie di trasduzione del segnale costituito da proteine che passano i segnali in una cellula attraverso i recettori di superficie cellulare (28). Le proteine Wnt hanno un peso di circa 40kDa e contengono molte cisteine conservate.

Nonostante la scoperta iniziale di Wnt quasi 30 anni fa, una produzione efficiente e una caratterizzazione biochimica di proteine Wnt rimane ancora oggi difficile. Il primo successo di purificazione di Wnt3a attiva nel topo ha rivelato che Wnts sono dei lipidi modificati; uno di questi è un acido grasso mono-insaturi (acido palmitoleico) fissato ad una serina conservata.

I lipidi presenti nelle proteine Wnts sono necessari per l'efficienza del signaling e possono essere importanti per la secrezione di Wnt.

Quando interagiscono con le cellule bersaglio, le proteine Wnt legano un recettore eterodimerico costituito dalla proteina Frizzled (Fz) e LRP5 / 6. Le dieci proteine di mammifero Fz sono recettori transmembrana (7TM) con un grande dominio N-terminale extracellulare ricco di cisteina (CRD) che fornisce una piattaforma primaria per il legame di Wnt. La struttura del CRD mostra più superfici di legame, una delle quali contenente un incavo idrofobo che interagisce con un lipide della molecola Wnt. L'interazione Wnt-FZ è promiscua: un singolo Wnt può

legare più proteine Fz e vice versa. FZs cooperano con una molecola transmembrana della famiglia LRP conosciuta come “Arrow” in *Drosophila* e LRP5 e 6 nei vertebrati. Come molte vie di trasduzione del segnale, signaling da recettori dimerici per Wnt, includono un cambiamento conformazionale ligando indotto dei recettori seguito da fosforilazione di proteine bersaglio chiave. Uno step fondamentale per il signaling è il legame di Axin alla coda citoplasmatica di LRP6. Il legame Axin-LRP6 è regolato dalla fosforilazione della coda LRP6 da parte di almeno due chinasi separate GSK3 e CK1 γ . GSK3 fosforila la serina nel motivo PPPSP trovato in un certo numero di componenti di Wnt signaling, compresi β -catenina, Axin, APC, e potenzialmente LRP6. La via di Wnt trasduce i segnali in modo diverso rispetto ad altre molecole. In molte cascate di segnalazione, fosforilazione di proteine amplifica il segnale, così come singole molecole chinasi catalizzano la modificazione di più molecole substrato. Al contrario, la fosforilazione di LRP6 indotta da Wnt titola Axin, un regolatore negativo, fornendo un meccanismo stechiometrico piuttosto che un meccanismo catalitico di trasduzione del segnale. Allo stesso modo, è stato proposto che la regolamentazione della GSK3 da parte di Wnt è stechiometrica, causata dal sequestro dell'enzima all'interno di endosomi multivescicolari (29). La via di Wnt è comunemente suddivisa in β -catenina dipendente (Canonica) e segnalazione indipendente (non canonica) (figura 5) (30).

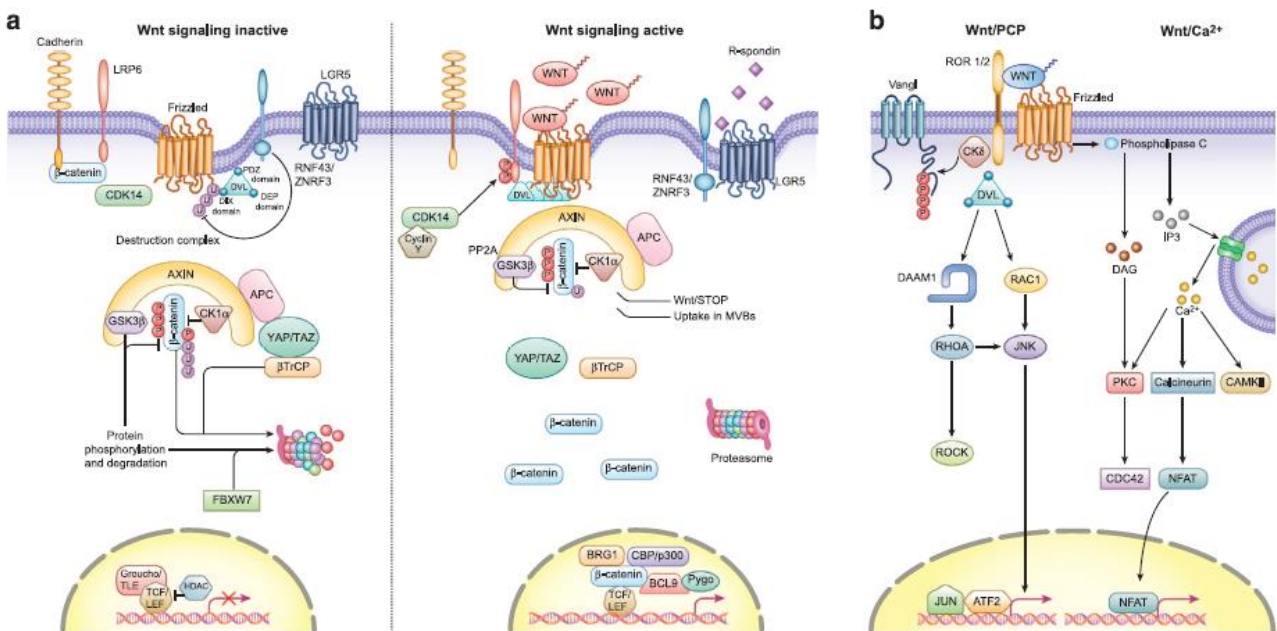


Figura 5: panoramica della via di signaling canonica e non canonica di Wnt. a) nella via di Wnt canonica, assenza di ligandi Wnt (Wnt signaling inattivo, a sinistra della figura) porta alla fosforilazione

di β -catenina dal complesso che contiene la proteina scaffold Axin, APC e le chinasi GSK3 β e caseina chinasi (CK1 α). In questo stato, β -catenina è fosforilata da GSK3 β , ubiquitinata da β -TrCP e degradata a livello del proteasoma. In assenza di β -catenina nucleare, un complesso repressivo contenente TCF / LEF e “transducing-like enhancer protein” (TLE / Groucho) recluta HDACs per reprimere i geni bersaglio.

La via canonica viene attivata in seguito al legame di Wnt secreti (ad esempio, Wnt3a e Wnt1) ai recettori Fzd e co-recettori LRP (Wnt signaling attiva, a destra della figura (a)). Recettori LRP sono poi fosforilati da CK1 α e GSK3 β , che reclutano proteine Dishevelled (Dvl) alla membrana plasmatica dove polimerizzano e si attivano inattivando così il complesso deputato alla distruzione di β -catenina mediante ad esempio il sequestro in corpi multivescicolari; ciò provoca la stabilizzazione e l'accumulo di β -catenina, che trasloca poi nel nucleo dove forma un complesso attivo con le proteine LEF (lymphoid enhancer factor) e TCF (fattore delle cellule T) dislocando i complessi TLE / Groucho e reclutando co-attivatori di modifica degli istoni quali CBP / p300, BRG1, BCL9 e Pygo. Questo switch trascrizionale porta a molteplici cambiamenti nei processi cellulari. b) Signaling di Wnt non canonico è definito da meccanismi di segnali di trasduzione β -catenina-indipendenti. Durante il signaling Wnt / PCP, ligandi Wnt si legano al recettore Frizzled-ROR per reclutare e attivare Dvl. Dvl si lega a “small GTPase Rho” dalla de-inibizione della proteina citoplasmatica (Dvl associated activator of morphogenesis 1) DAAM1. La “small GTPase Rac1” e Rho, insieme, attivano ROCK (Rho kinase) e JNK. Questo porta a riarrangiamenti del citoscheletro e / o a risposte trascrizionali tramite per esempio, ATF2 (fattore di attivazione della trascrizione 2). Accanto a Dvl, Vangl, un membro chiave del signaling Wnt / PCP, viene attivato dalla fosforilazione in Wnt5a modo dipendente. Il signaling Wnt / Ca²⁺ è avviato da proteine G innescate dall'attività della fosfolipasi C che porta a flussi intracellulari di calcio e risposte trascrizionali e/o risposte da parte del citoscheletro che sono dipendenti a valle del calcio (30).

Wnt: secrezione e ambiente extracellulare

Dopo processamento di Wnt da parte del reticolo endoplasmico (ER) e del Golgi, Wnt viene indirizzata per la secrezione (figura 6): un recettore di sorting, proteina transmembrana, codificato dal gene Wntless (Wls o Evenness interrupted/Evi, Sprinter, MIG-14, e Gpr177), lega e accompagna Wnt alla superficie cellulare.

Per il rilascio delle proteine Wnt è richiesta acidificazione vacuolare; farmaci inibitori della V-ATPasi, una pompa protonica necessaria per l'acidificazione vacuolare, impediscono il rilascio da parte di Wls di Wnt con conseguente accumulo di complessi Wnt-Wls nelle cellule e a livello della membrana plasmatica.

Una volta che Wnt viene rilasciata dalla cellula, Wls viene riciclato tramite gli endosomi e il complesso “retromer” al Golgi, dove agisce nuovamente per accompagnare una nuova proteina Wnt alla superficie delle cellule;

interferendo sia sull'espressione di Wls sia sul suo riciclo attraverso il "retromer", si ha inibizione della secrezione di Wnt (31).

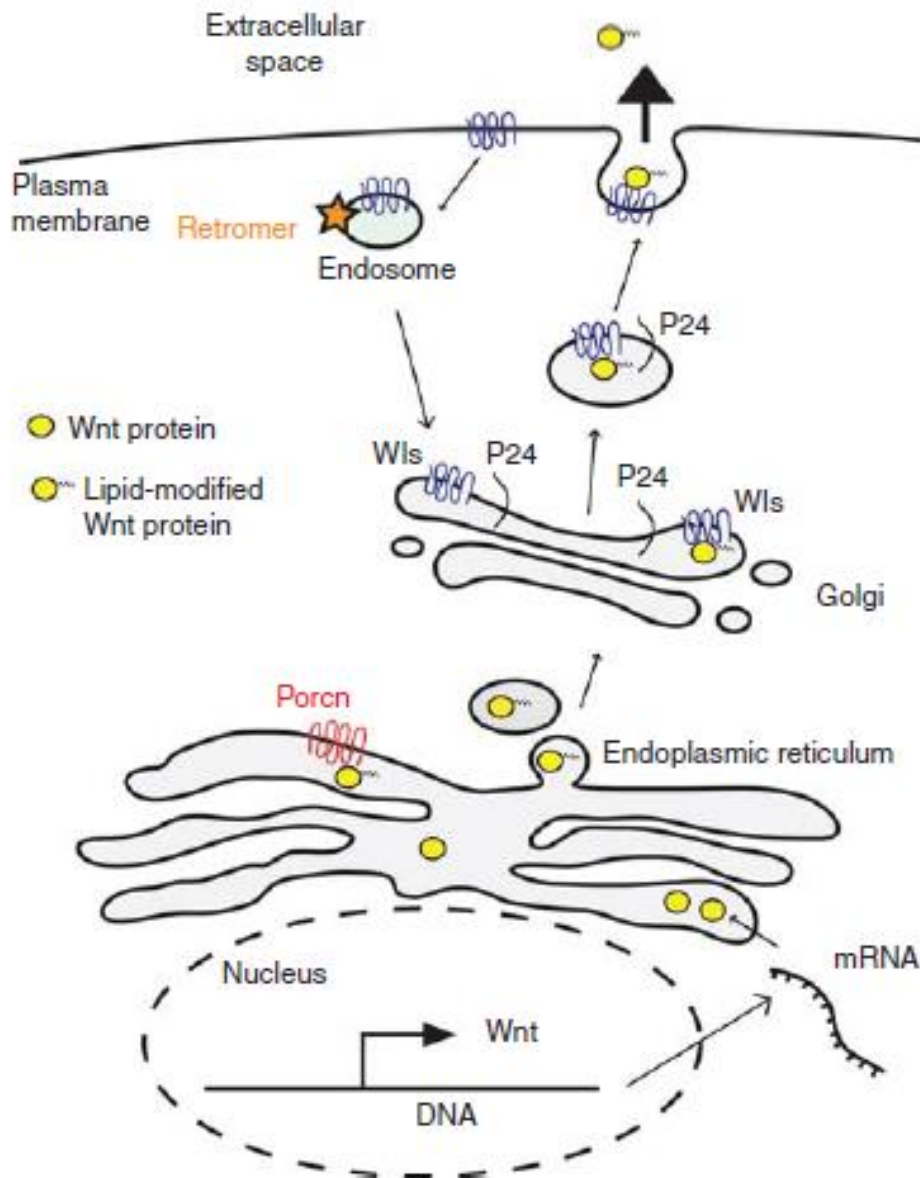


Figura 6: secrezione di Wnt: dopo la traduzione, le proteine Wnt (in giallo), subiscono una serie di modifiche al loro transitare attraverso la via secretoria e vengono associate con diverse proteine, tra cui Porcn nel reticolo endoplasmatico e Wls nel Golgi. la secrezione efficiente di Wnt richiede anche il riciclo di Wls tramite il complesso "Retromer"(31).

Mentre raggiungono la superficie delle cellule, le proteine Wnt incontrano una miriade di molecole che interagiscono con Wnts. I primi studi biochimici hanno rivelato una elevata affinità di Wnts per i composti polianionici, inclusi eparina e suramina. Molteplici studi biochimici e genetici da allora hanno sottolineato la importanza delle interazioni

tra Wnt e catene di carboidrati extracellulari. Studi biochimici hanno rivelato che i componenti dello spazio extracellulare, come ad esempio glicani ed il biglicano, modulano le interazioni tra Wnts ed il suo recettore e possono influenzare in modo significativo l'output e la forza del signaling. Oltre alle loro complesse interazioni con i glicani nello spazio extracellulare, Wnts incontra più partner di proteine leganti, tra cui WIF, Sfrp (proteine di secrezione che potenzialmente sono antagoniste di Wnt signaling), e recettori di superficie cellulare (31).

1.5 Il cancro al pancreas

Il pancreas è una ghiandola situata nello spazio retroperitoneale, la cui porzione esocrina permette la digestione degli alimenti (circa 25.000 kg di cibo ingerito durante una vita media). Ha una notevole capacità di riserva, per cui la sua insufficienza funzionale non è clinicamente riconoscibile fino a quando la maggior parte del pancreas non è stato distrutto.

La parte esocrina della ghiandola è suscettibile a tre malattie principali: pancreatite acuta, pancreatite cronica e cancro al pancreas (32).

1.5.1 Tipi di cancro al pancreas

I vari tipi di cancro pancreatico possono essere suddivisi in due grandi gruppi: il primo gruppo comprende il 99% dei casi e si verifica nella parte del pancreas esocrino che produce enzimi digestivi, il secondo gruppo insorge nel pancreas endocrino produttore ormoni (tumori neuroendocrini) (33, 34).

Il gruppo del cancro al pancreas esocrino è rappresentato dall'adenocarcinoma pancreatico (PDAC), di gran lunga il tipo più comune, rappresenta infatti circa l'85% di tutti i tumori del pancreas. Questo tumore origina nei condotti che portano le secrezioni pancreatiche e circa il 60-70% degli adenocarcinomi si verificano nella 'testa' del pancreas. Il secondo tipo più comune di cancro esocrino è rappresentato dal carcinoma a cellule acinose; esso rappresenta il 5% dei tumori del pancreas esocrino; cistoadenocarcinoma rappresenta invece l'1% dei tumori pancreatici ed ha una prognosi migliore rispetto agli altri tipi di cancro esocrino; pancreatoblastoma è una forma ancora più rara, con prognosi relativamente buona. Altri tumori della parte esocrina includono carcinomi adenosquamosi, carcinomi a cellule "ad anello con castone", carcinomi mucinosi, carcinomi indifferenziati, e carcinomi indifferenziati con cellule giganti simil osteoclasti. Infine, il tumore solido pseudopapillare è una rara neoplasia a basso grado che colpisce soprattutto le

donne più giovani, e in generale ha una prognosi molto buona (35-37).

La piccola minoranza dei tumori che si presenta in altre parti del pancreas sono principalmente tumori neuroendocrini pancreatici (PanNETs). I tumori neuroendocrini sono un gruppo eterogeneo di tumori che originano da cellule neuroendocrine responsabili dell'integrazione del sistema nervoso ed endocrino. Nel pancreas I tumori neuroendocrini di tipo maligno sono considerati rari e vengono raggruppati in tipi "funzionanti" e tipi 'non funzionanti', a seconda del grado in cui essi producono ormoni. I tipi funzionanti secernono ormoni come insulina, gastrina e glucagone nel sangue dando luogo a sintomi gravi come ad esempio ipoglicemia. I più comuni, tra i tumori "funzionanti", sono insulinomi e gastrinomi, dal nome degli ormoni che secernono. I tipi "non funzionanti" non secernono ormoni in quantità sufficiente a dar luogo a sintomi clinici manifesti. Per questo motivo, PanNETs "non funzionanti" sono spesso diagnosticati solo dopo che il tumore si è diffuso ad altre parti del corpo (38, 39).

1.5.2 Patogenesi molecolare e cellulare

Il cancro al pancreas ha origine a livello dell'epitelio duttale ed evolve da lesione precancerosa a cancro invasivo: la lesione pancreaticata chiamata neoplasia intraepiteliale, è il precursore istologico più caratterizzato di cancro pancreatico. La progressione da epitelio minimamente displastico (neoplasia pancreaticata intraepiteliale di grado 1A e 1B) a displasia più severa (neoplasia pancreaticata intraepiteliale di grado 2 e 3) ed infine a carcinoma invasivo, è parallela all'accumulo successivo di mutazioni che includono l'attivazione dell'oncogene KRAS2, inattivazione del gene soppressore del tumore CDKN2A (che codifica per "inhibitor of cyclin-dependent kinase 4" [INK4A]), e, infine, inattivazione del gene tumore-soppressore TP53 e del gene "deleted in pancreatic cancer 4" (DPC4, anche noto come "SMAD family member 4" [SMAD4]). Questa sequenza di eventi di carcinogenesi del pancreas è supportata da studi in modelli murini in cui l'attivazione mirata di KRAS2, con concomitante inattivazione di Trp53 o CDKN2A / INK4A, ha come conseguenza lo sviluppo del cancro, in modo identico a ciò che accade nell'uomo.

Altre lesioni precancerose meno ben caratterizzate, includono la neoplasia mucinosa intrapancreatica e la neoplasia cistica mucinosa.

Quasi tutti I pazienti con cancro al pancreas, portano una o più delle quattro mutazioni sopra riportate.

Il 90% dei tumori hanno mutazioni attivanti l'oncogene KRAS; la trascrizione del gene KRAS mutante produce una anormale proteina Ras che viene "bloccata" nella sua forma attivata, causando l'attivazione aberrante di vie di signaling per la proliferazione e la sopravvivenza; analogamente, il 95% dei tumori hanno inattivazione del gene CDKN2A, con la conseguente perdita della proteina p16 (un regolatore della transizione G1-S del ciclo cellulare) ed un corrispondente aumento della proliferazione cellulare. TP53 è anormale nel 50 - 75% dei tumori, permette alle cellule di bypassare il controllo dei danni al DNA e i segnali apoptotici, contribuendo all'instabilità genomica. DPC4 viene perso in circa il 50% dei tumori, con conseguente segnalazione aberrante di "transforming growth factor β cell-surface receptor" (TGF- β).

Una recente analisi genetica di 24 tumori pancreatici ha dimostrato che la base genetica di cancro è estremamente complessa ed eterogenea. In questo studio, una media di 63 anomalie genetiche per tumore, principalmente mutazioni puntiformi, sono state classificate come probabili cause rilevanti e possono essere organizzate in 12 pathways. Tuttavia, non tutti i tumori hanno alterazioni in tutti i pathways, e le mutazioni chiave di ciascuna via sembrano differire da un tumore all'altro.

Una caratteristica del cancro pancreatico è la formazione di uno stroma denso, definito reazione desmoplastica (figura 7). Le cellule stellate pancreatiche (note anche come miofibroblasti) giocano un ruolo fondamentale nella formazione e nel turnover dello stroma: l'attivazione mediata da fattori di crescita quali TGF β 1, "platelet-derived growth factor" (PDGF) e fattore di crescita dei fibroblasti, induce queste cellule a secernere collagene e altri componenti della matrice extracellulare; cellule stellate sono anche responsabili della minor vascolarizzazione che è caratteristica di questo tumore. Inoltre, cellule stellate regolano il riassorbimento ed il turnover dello stroma, principalmente attraverso la produzione di metalloproteinasi della matrice. Lo stroma non è solo una barriera meccanica; piuttosto, costituisce un comparto dinamico che è coinvolto nel processo di formazione, progressione, invasione e metastasi del tumore. Cellule stromali esprimono molteplici proteine come cicloossigenasi-2, recettore PDGF, fattore di crescita vascolare endoteliale, fattore derivato dalle cellule stromali, chemochine, integrine, "secreted protein acidic cysteine-rich" (SPARC) che sono stati associati con prognosi sfavorevole e resistenza al trattamento; queste proteine possono rappresentare dei nuovi bersagli terapeutici (40).

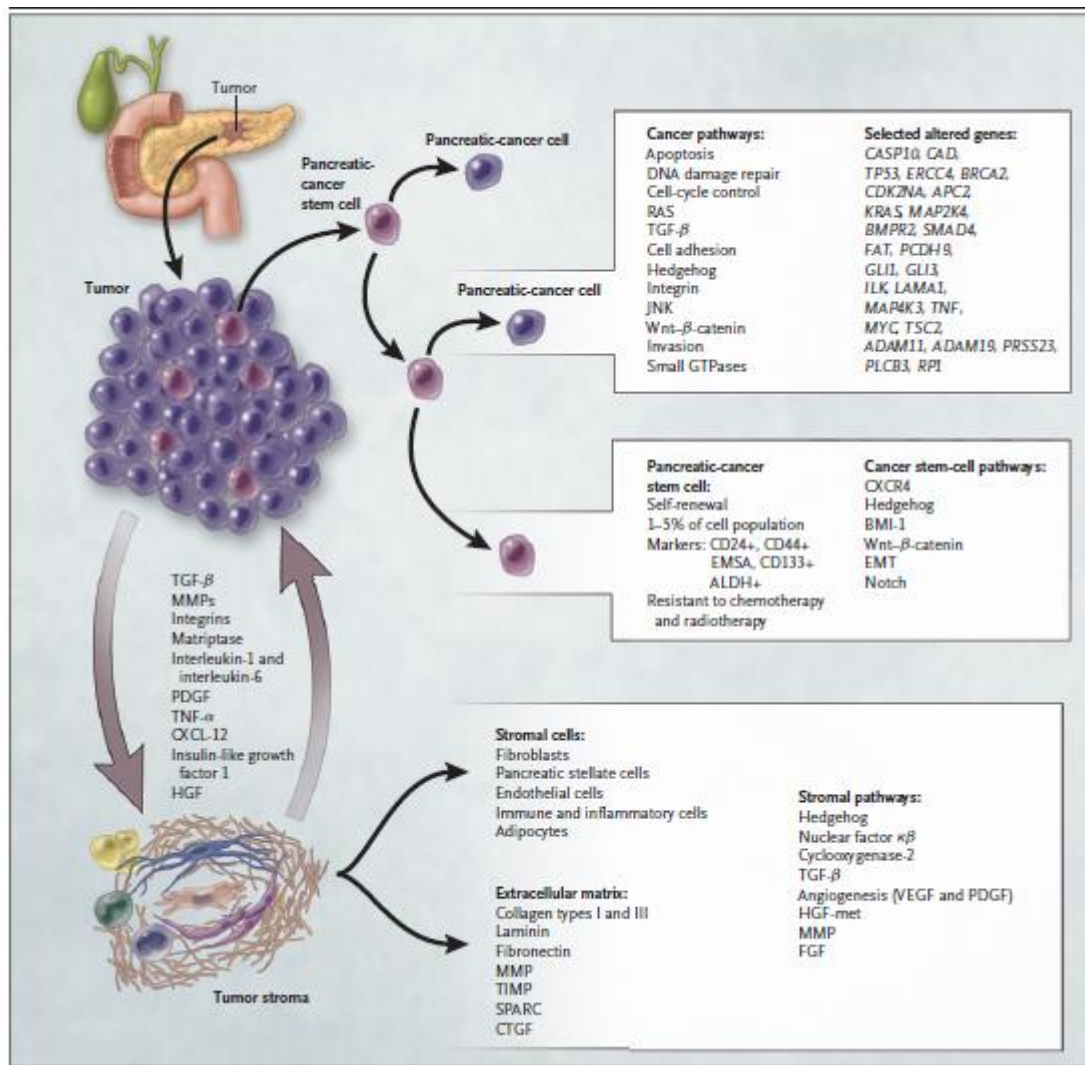


Figura 7: tumori pancreatici sono costituiti da vari elementi distinti, comprese le cellule tumorali, le cellule staminali del cancro al pancreas, e lo stroma del tumore. In particolare, le cellule staminali del cancro al pancreas sono resistenti al trattamento convenzionale e mostrano alterazioni in pathways quali Notch, hedgehog, e wingless in drosophila (Wnt)- β -catenin che possono essere nuovi bersagli terapeutici. Il tumore al pancreas è caratterizzato da un fitto stroma poco vascolarizzato; questo microambiente contiene sia elementi cellulari sia elementi non cellulari. Cellule stellate pancreatiche sono un elemento cellulare chiave dello stroma; sono caratterizzate dall'espressione di desmina, proteina acida fibrillare della glia, e goccioline di grasso intracellulari. Mediante stimolazione con fattori di crescita, cellule stellate del pancreas esprimono α -smooth-muscle actine (α SMA) e producono abbondanti fibre di collagene che contribuiscono all'ipossia del tumore (40).

1.5.3 Segni e sintomi

I sintomi del cancro al pancreas dipendono dalla posizione del tumore all'interno della ghiandola, nonché dallo stadio della malattia. La maggior parte dei tumori si sviluppa nella testa del pancreas (60-70%) causando colestasi ostruttiva. Sono comuni vaghi disturbi addominali e nausea; più raramente, un tumore al pancreas può anche causare ostruzione duodenale o sanguinamento gastrointestinale; questo tipo di tumore è spesso causa di un sordo profondo dolore addominale che si localizza in linea di massima nella zona tumorale. L'ostruzione del dotto pancreatico può portare a pancreatite.

I pazienti affetti da cancro del pancreas spesso hanno disglicemia. In effetti, questa neoplasia, dovrebbe essere considerata nella diagnosi differenziale di pancreatite acuta e diabete di nuova diagnosi; il diabete è presente in almeno il 50% dei pazienti.

Alla presentazione, la maggior parte dei pazienti hanno anche manifestazioni sistemiche della malattia, come astenia, anoressia e perdita di peso; altre manifestazioni meno comuni includono trombosi venosa profonda e superficiale, pannicolite, anomalie nella funzione del fegato, ostruzione gastrica, aumentata circonferenza addominale e depressione. L'esame obiettivo può rivelare ittero, atrofia temporale, linfadenopatia periferica, epatomegalia e ascite. Risultati degli esami di routine del sangue sono in genere aspecifici e possono includere lievi anomalie nei test di funzionalità epatica, iperglicemia e anemia.

La valutazione di un paziente, in cui si sospetta il cancro al pancreas, dovrebbe concentrarsi sulla diagnosi e stadiazione della malattia, la valutazione di resecabilità e palliazione dei sintomi.

Tomografia computerizzata multifase (CT), con somministrazione endovenosa di mezzo di contrasto, è la procedura di imaging di scelta per una valutazione iniziale. Alcuni pazienti necessitano di ulteriore studi diagnostici: ecografia endoscopica è utile in pazienti in cui si sospetta tale tipo di cancro, anche se non c'è massa visibile identificabile con CT. Nei pazienti che hanno tumori di grandi dimensioni, soprattutto nel corpo e nella coda della ghiandola, così come altre indicazioni di avanzata malattia come la perdita di peso, un elevato livello dell'antigene carboidrato 19-9 (CA 19-9), ascite, o reperti CT equivoci, una laparoscopia può determinare con precisione un coinvolgimento metastatico e vascolare.

Ci sono molti potenziali biomarcatori sierici per la diagnosi, la stratificazione della prognosi, e il monitoraggio della terapia. Comunque, CA 19-9 è l'unico biomarker che ha dimostrato utilità clinica ed utilità per il

monitoraggio terapeutico e la individuazione precoce di malattia recidiva dopo il trattamento in pazienti con tumore noto, anche se presenta limitazioni importanti in quanto i suoi livelli possono essere elevati anche in altre condizioni come la colestasi.

Uno screening primario universale per il cancro al pancreas non è attualmente raccomandato, considerati gli strumenti disponibili e le loro prestazioni.

Più del 90% dei pazienti che hanno ricevuto una diagnosi di cancro al pancreas muoiono della malattia. Circa il 70% di questi pazienti muoiono per malattia metastatica estesa, l'altro 30% ha malattia metastatica limitata al momento della morte, ma la maggior parte dei pazienti presenta una neoplasia primaria voluminosa. (40, 41).

1.5.4 Stadiazione e sopravvivenza a 5 anni

Lo "staging" del cancro è il processo per determinarne lo sviluppo attraverso la sua diffusione.

Si assegna un numero da I a IV: con I si intende un cancro isolato e IV un cancro che si è diffuso al limite delle misure di valutazione. Le fasi generalmente tengono conto delle dimensioni del tumore, dell'invasività agli organi adiacenti, del numero dei linfonodi regionali in cui si è diffuso, e se è apparso in luoghi più distanti (metastasi).

Lo "staging" del cancro può essere diviso in stadio clinico e in stadio patologico.

Nel sistema TNM (tumor, node, metastasis), lo stadio clinico e lo stadio patologico sono contrassegnate da una "c" o da una "p" prima della fase. Questo sistema di stadiazione viene utilizzato per la maggior parte delle forme di cancro.

Parametri obbligatori sono:

T dimensione o misura diretta del tumore primario:

Tx: tumore non può essere valutata

Tis: carcinoma in situ

T0: nessun segno di tumore

T1, T2, T3, T4: dimensioni e / o estensione del tumore primario

N grado di diffusione ai linfonodi regionali:

Nx: linfonodi non possono essere valutati

N0: assenza cellule tumorali nei linfonodi regionali

N1: metastasi linfonodi regionali presente

N2: tumore diffuso in misura tra N1 e N3

N3: diffusione del tumore in più dei distanti linfonodi o numerosi linfonodi regionali

M presenza di metastasi a distanza:

M0: nessuna metastasi a distanza

M1: metastasi in organi distanti (oltre i linfonodi regionali)

Altri parametri sono:

G (1-4): il grado di cellule tumorali (vale a dire che sono "low grade" se sembrano simili alle cellule normali, e

"high grade" se appaiono scarsamente differenziate)

S (0-3): elevazione dei marcatori tumorali sierici

R (0-2): la completezza delle operazioni (resezione-confini liberi dalle cellule tumorali o meno)

L (0-1): l'invasione in vasi linfatici

V (0-2): l'invasione in vena (no, microscopico, macroscopico)

C (1-5): modificatore della certezza (qualità) dell'ultimo parametro menzionato

Modificatori del prefisso:

c: stadio dato in esame clinico del paziente.

p: stadio dato da esame istologico di un campione chirurgico

y: stadio valutato dopo la chemioterapia e / o radioterapia.

r: stadio per un tumore recidivante in un individuo che ha avuto un certo periodo di "time free" da malattia.

a: fase determinata all'autopsia.

u: fase determinata dalla ecografia o ecoendoscopia (42)

La stadiazione del tumore al pancreas avviene in accordo alla classificazione dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC) tumor-node-metastasis che si basa sulla valutazione di resecabilità da analisi CT: T1, T2, e T3 sono tumori potenzialmente resecabili, mentre i tumori T4, che coinvolgono l'arteria mesenterica superiore o il tronco celiaco, non sono operabili. I tumori che coinvolgono la vena mesenterica superiore, vena porta, o vena splenica sono classificati come T3, dal momento che queste vene possono essere asportate e ricostruite (40).

Dopo attenta valutazione, solo il 15% - 20% dei pazienti sono considerati candidati per la resezione chirurgica, e molti di questi pazienti hanno margini microscopicamente positivi al momento dell'intervento. (41).

La prognosi dei pazienti affetti da cancro del pancreas è estremamente povera con un tasso di sopravvivenza relativa a 5 anni di circa il 6% (43).

Table 1. Staging of Pancreatic Cancer.*

Stage	Tumor Grade	Nodal Status	Distant Metastases	Median Survival† <i>mo</i>	Characteristics
IA	T1	N0	M0	24.1	Tumor limited to the pancreas, ≤2 cm in longest dimension
IB	T2	N0	M0	20.6	Tumor limited to the pancreas, >2 cm in longest dimension
IIA	T3	N0	M0	15.4	Tumor extends beyond the pancreas but does not involve the celiac axis or superior mesenteric artery
IIB	T1, T2, or T3	N1	M0	12.7	Regional lymph-node metastasis
III	T4	N0 or N1	M0	10.6	Tumor involves the celiac axis or the superior mesenteric artery (unresectable disease)
IV	T1, T2, T3, or T4	N0 or N1	M1	4.5	Distant metastasis

* N denotes regional lymph nodes, M distant metastases, and T primary tumor.

† Data are from Bilimoria et al.⁴⁵

Tabella 1: stadiazione del cancro al pancreas (40)

1.5.5 Epidemiologia e fattori di rischio

Il tumore al pancreas è la quarta causa di decessi per cancro nel mondo, con una stima di 227 000 decessi ogni anno ed è destinato a diventare la seconda causa di morte per cancro nel 2030 negli Stati Uniti (44).

Il tumore al pancreas non è prevalente nei pazienti sotto i 20 anni di età e la media di insorgenza è 71 anni.

La pancreatite ereditaria è un fattore di rischio grave per questo tipo di cancro con un rischio di sviluppo del 40-55%; il fumo aumenta il rischio di cancro in questi pazienti e abbassa l'età media della diagnosi da 71 anni nei non fumatori a 56 anni nei fumatori (45).

Altri fattori di rischio sono l'obesità: un BMI > 35 aumenta il rischio relativo di circa la metà, la storia familiare (5% - 10% dei casi di cancro del pancreas), con il rischio che aumenta se più di un parente di primo grado ha avuto la malattia, e in modo più modesto se hanno sviluppato il tumore prima dei 50 anni, la pancreatite cronica che ne triplica il rischio, il quale aumenta in soggetti con pancreatite familiare, ed infine il diabete di tipo 2 per cui, una diagnosi superior a dieci anni, porta ad avere un aumento del rischio del 50%, rispetto ai non diabetici; infine, il diabete di nuova insorgenza può essere considerato un segno precoce di malattia (41, 46-49).

1.6 Il melanoma

Il melanoma, noto anche come melanoma maligno, è un tumore maligno dei melanociti, cellule che producono il pigmento melanina, derivanti dalla cresta neurale. Sebbene la maggior parte dei melanomi si presentano nella pelle, possono anche formarsi nella bocca, intestino o in altri siti

di migrazione delle cellule della cresta neurale, compreso il tratto uveale (50).

1.6.1 Tipi di melanoma

La classificazione del melanoma distingue 4 tipologie differenti:

- 1) Melanoma a diffusione superficiale
- 2) Melanoma lentigo maligna
- 3) Melanoma nodulare
- 4) Melanoma lentiginoso acrale

Un altro schema di classificazione distingue due tipi di melanoma: il primo su pelle non glabra non danneggiata cronicamente dal sole, con mutazioni frequenti del gene BRAF e senza mutazioni KIT ed il secondo tipo su pelle danneggiata dal sole, caratterizzato da rare mutazioni di BRAF e con mutazioni del gene KIT in circa il 20% dei casi.

Melanoma che origina su pelle glabra o sulle unghie si distingue come melanoma acrale sulla base di caratteristiche genetiche quali amplificazione e mutazioni o solo amplificazione del gene KIT nel 40% dei casi.

Melanomi della mucosa (cioè melanomi primari derivanti dalle membrane mucose), anche questi con amplificazione e mutazioni o solo amplificazione del gene KIT nel 40% dei casi, sono stati separati in base a modelli di aberrazioni cromosomiche.

Gli studi molecolari hanno permesso di separare anche i melanomi uveali e melanomi da proliferazione dei melanociti intradermici della pelle (morfologicamente rientranti nello spettro dei nevi azzurri). Entrambi hanno mostrato mutazioni frequenti nella famiglia Gq delle proteine G: GNAQ e GNA11.

Le somiglianze tra approcci di classificazione basata esclusivamente su caratteristiche istopatologiche e cliniche e quelli basati su caratteristiche molecolari, sono notevoli e forniscono un forte sostegno per quanto riguarda la esistenza a livello genetico di diversi sottotipi di melanoma: in particolare, mutazioni di BRAF sono più comuni nel melanoma a diffusione superficiale, e meno frequenti nel melanoma lentigo maligna e nel melanoma lentiginoso acrale; mentre, in questi ultimi, sono più frequenti le mutazioni KIT.

Tuttavia esistono importanti differenze tra i due diversi sistemi e ciò suggerisce che l'incorporazione delle caratteristiche molecolari può aiutare a perfezionare la classificazione: ad esempio, gli studi molecolari non hanno trovato nessuna caratteristica genetica o caratteristica clinica associate al melanoma nodulare, che

può quindi rappresentare un tipo di melanoma che può verificarsi in ciascuno degli altri 3 generi (51).

1.6.2 Fattori di rischio

I fattori di rischio per il melanoma comprendono sia fattori intrinseci di tipo genetico e fenotipico sia estrinseci ambientali o da esposizione.

Importante fattore di rischio di tipo genetico è la storia familiare di melanoma; il 30-40% dei casi di storia familiare si spiega con mutazioni ereditarie di due geni ad alta penetranza che hanno un ruolo critico nel controllo del ciclo cellulare, vale a dire CDKN2A e CDK4.

Una mutazione in BRCA-proteina associata-1 (BAP1) è stata identificata in famiglie con casi di parentele con melanoma uveale e cutaneo.

Tra i geni a bassa penetranza, quello più associato al melanoma è il gene per il recettore della melanocortina 1 (MC1R), una proteina G recettore accoppiata che si lega all'ormone α -melanocita stimolante (α -MSH).

Per quanto riguarda i fattori fenotipici, i principali fattori di rischio includono caratteristiche pigmentarie della pelle, scarsa capacità abbronzante, nevi multipli, nevi atipici o displastici e lentiggini.

Fattori di rischio ambientali o da esposizione comprendono l'esposizione solare (esposizione a raggi ultravioletti UV naturali) e l'esposizione a raggi UV artificiali come ad esempio la radiazione UV dei lettini abbronzanti.

UV naturali hanno effetti dannosi sulla pelle attraverso meccanismi diretti e indiretti, come ad esempio la formazione di dimeri di pirimidina ciclobutano, mutazioni genetiche, immunosoppressione e stress ossidativo. Una elevata prevalenza di melanoma è stata descritta nelle popolazioni che migrano da un ambiente con bassa concentrazione di UV ad un ambiente con elevata concentrazione di UV e in individui di pelle chiara rispetto a quelli di pelle scura. Tuttavia, le differenze nei tassi tra lavoratori interni ed esterni e le variazioni nella distribuzione anatomica suggeriscono una più complessa associazione del melanoma con esposizione a raggi UV che non al semplice modello di dose rapporto.

Infine, per quanto riguarda l'esposizione a raggi UV artificiali dei lettini abbronzanti, è stata riportata una dose-dipendenza espressa in base alla lunghezza, la durata o al numero di trattamenti / sessioni.

Un recente studio di Boniol et al. ha dimostrato un rischio relativo (RR) di sviluppo di melanoma di 1.2 in individui che utilizzano lettini abbronzanti, ed un aumento del rischio di 1.8% per ogni sessione aggiuntiva dell'uso del lettino all'anno (52, 53).

1.6.3 Epidemiologia

A livello globale, nel 2012, il melanoma si è verificato in 232000 persone e ha provocato 55.000 morti (54).

Nel 2016, viene stimato in 76380 nuovi casi negli Stati Uniti (46870 casi nei maschi e 29510 casi nelle femmine) e 10130 morti per la malattia; il tasso di incidenza è raddoppiato dal 1973, con un drammatico aumento del numero di casi nel corso degli ultimi decenni negli Stati Uniti. Si tratta dell'aumento più rapido rispetto a qualsiasi altro tumore.

Il melanoma è il terzo tumore più comune tra le donne di età compresa tra 20-39 anni e il secondo più comune negli uomini di età tra i 20 e i 39 anni (le persone di età inferiore ai 45 anni rappresentano il 25% di tutti i casi); è considerato il tumore della pelle più mortale e rappresenta l'1% di tutti i casi di tumore alla pelle (55).

Il melanoma cutaneo ha un'incidenza che aumenta più velocemente rispetto agli altri tumori solidi, con un'incidenza globale di circa 160000 nuovi casi all'anno e 48000 decessi. L'incidenza più elevata è stata registrata in Queensland (Australia) con 56 casi su 100000 all'anno negli uomini, e 41 casi su 100000 all'anno nelle donne. Nei bianchi non ispanici degli Stati Uniti, l'incidenza annuale è di 19 casi su 100000 per gli uomini, e 14 casi su 100 000 nelle donne.

In Europa, l'incidenza massima annua viene riportata in Austria con 21.5 casi per 100000 negli uomini e 17.5 casi per 100000 nelle donne, Norvegia con 16.1 casi per 100000 negli uomini e 15.7 casi per 100000 nelle donne e Svizzera con 15.3 casi per 100000 negli uomini e 15.5 casi per 100000 nelle donne (56).

Il melanoma delle mucose e il melanoma oculare hanno una incidenza minore rispetto a quello cutaneo, con un'incidenza di meno di 1 per 100000 persone all'anno; in particolare, lo studio di Bishop et al. ha determinato il tasso di incidenza per il melanoma oculare essere di 5.6 casi per milione di persone per anno e di 2.3 per milione per il melanoma delle mucose, valori molto lontani rispetto ad un tasso di 171.6 casi per milione che si riferiscono al melanoma cutaneo (57).

1.6.4 Segni e sintomi

I segni precoci di melanoma sono identificabili da modifiche della forma o colore dei moli esistenti o, nel caso del melanoma nodulare, la comparsa di un nuovo grumo sulla pelle. Nelle fasi successive, la mole può dare prurito, ulcerarsi o sanguinare.

I segni precoci di melanoma sono riassunti dalla "ABCDE" mnemonica:

- A: forma asimmetrica, moli con forme irregolari,
- B: bordi ed angoli irregolari
- C: cambiamento nel colore
- D: diametro maggiore di 6mm
- E: evoluzione nel corso del tempo

Questa classificazione, tuttavia, non si applica per la forma più pericolosa di melanoma, il melanoma nodulare, che ha la sua classificazione:

- E: elevati al di sopra della superficie della pelle
- F: ferma al tatto
- G: in crescita (58, 59)

1.6.5 Patogenesi molecolare e cellulare

Nello stadio embrionale noto come gastrula, la cresta neuronale genera progenitori melanociti-gliali bipotenti destinati alla produzione dei melanoblasti che generano le cellule staminali melanociti (MSC) che assicurano la continua generazione di melanociti normali produttori melanina (60).

Per quanto riguarda invece la patogenesi del melanoma, il modello di Clark è il più prevalente, esiste poi il modello di tipo speculativo di Mihaloglou

In accordo al modello di Clark et al. (61), il primo cambiamento fenotipico nei melanociti normali è lo sviluppo di Nevo melanocitico benigno.

Il Nevo melanocitico è un tumore clonale benigno, che temporaneamente prolifera tramite via di signaling oncogenica BRAF, seguita dall'arresto della crescita a causa di senescenza oncogene indotta.

Lo step successivo verso l'evoluzione del melanoma è il nevo displastico che, a livello istopatologico, mostra atipia strutturale e citologica.

In questa fase di progressione, l'anomalia molecolare può essere dovuta all'interruzione della via p16INK4a-retinoblastoma (Rb) per inattivazione di CDKN2A, un gene che codifica per p16INK4a e p19ARF.

Il terzo step nella progressione è rappresentato dalla fase di crescita radiale (RGP), con estensione progressiva del melanoma all'interno o appena sotto l'epidermide.

In questa fase di progressione si ha l'attivazione della telomerasi umana trascrittasi inversa (hTERT) con induzione dei melanociti neoplastici immortali.

Pertanto, la carenza della via p16INK4a-Rb così come l'attivazione di hTERT appaiono necessari per l'immortalizzazione dei melanociti; inoltre, il deficit della via p16INK4a determinerebbe un alto tasso di cellule melanociti umani in apoptosi che però viene soppressa dai

cheratinociti o dai loro prodotti; la ipotesi è dunque che le cellule di melanoma RGP richiedono cheratinociti (o i loro prodotti) per la sopravvivenza, e possono crescere solo nell'epidermide o vicino ad essa.

La fase finale della progressione del melanoma è definita fase di crescita verticale (VGP); in questa fase si ha la crescita in profondità nel derma; questa fase è metastasi competente.

Per la progressione a VGP, sono necessarie mutazioni che reprimono l'apoptosi in grado di consentire alle cellule di sopravvivere in assenza di cheratinociti. Queste includono la perdita di PTEN, che inibisce l'apoptosi attraverso l'attivazione di AKT, la sovra-espressione di un certo numero di proteini chinasi o l'attivazione di RAS, e l'attivazione della β -catenina. La progressione da RGP a VGP è anche dovuta alla perdita di E-caderina, nonché all'abberrante espressione di N-caderina e $\alpha V\beta 3$ integrina (62).

Mentre il modello di Clark è quello prevalente, alcuni ricercatori, considerato che il melanoma emerge anche nella pelle normale, sostengono che la maggior parte dei melanomi primari sorgono "de novo", non associati al Nevo melanocitico.

Mihaloglou et al. ha ipotizzato che il primo evento nel "de novo" sviluppo del melanoma sarebbe un "hit" non identificato che consentirebbe ai melanociti di evadere dalla senescenza oncogene indotta in collaborazione con l'inattivazione di p16INK4a-Rb dovuto a mutazione o metilazione del promotore del gene CDKN2A, amplificazione di CCND1 o CDK4 o a mutazione di Rb. Quando un melanocita con questo "hit" acquista una mutazione proliferativa come ad esempio BRAFV600E, potrebbe sfuggire alla senescenza oncogene indotta e riuscire a proliferare.

.Infine, la completa trasformazione oncogenica a melanoma VGP può richiedere ulteriori fattori genetici o epigenetici quali la soppressione dell'apoptosi, i cambiamenti di molecole di adesione, e up-regulation di fattori di crescita, come discusso nel modello di Clark (62).

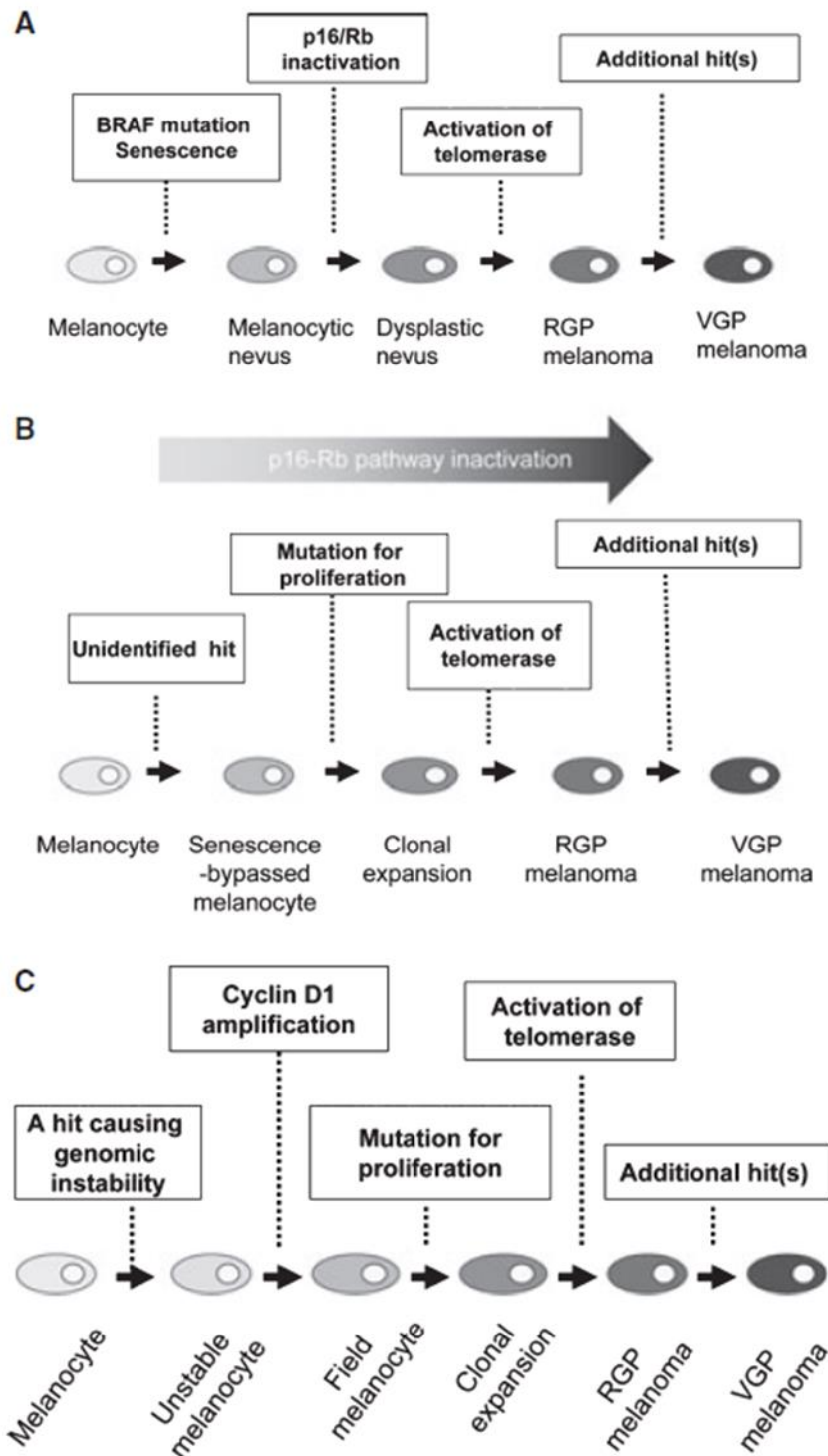


Figura 8: modelli di progressione del melanoma: A) modello di Clark: questo modello evidenzia una serie di cambiamenti istopatologici a partire dal nevo melanocitico benigno, arrivando al melanoma attraverso il nevo displastico, e prevede che la mutazione di BRAF sia un passo cruciale per la neoplasia melanocitica. La progressione da nevo benigno a nevo displastico richiede la “fuga” dalla senescenza tramite inattivazione del pathway p16INK4a-Rb; B) modello genetico “de novo” melanoma, in cui il primo evento sarebbe un “hit” non identificato che potrebbe collaborare assieme all’inattivazione del pathway p16INK4a-Rb. Quando un melanocita già soffre di questo “hit”, acquista una mutazione proliferativa come ad esempio BRAFV600E, sfuggendo alla senescenza e proliferando come clone; C)

ipotetico modello di progressione genetica del melanoma acrale: melanociti normali, che hanno acquisitato instabilità genomica e amplificazione di CCND1, danno origine a cellule precursori del melanoma RGP; la progressione da cellule precursori a melanoma RGP può richiedere mutazioni per la proliferazione, come KIT e per la immortalizzazione (62).

1.6.6 Melanoma e invecchiamento

L'incidenza del melanoma cutaneo nella popolazione anziana continua a crescere nell'emisfero occidentale e, con il rapido incremento degli anziani, il melanoma diventerà un problema di salute pubblica importante nel 21° secolo, rendendo necessaria una maggior caratterizzazione e stratificazione del rischio in questo gruppo di età. Rispetto ai giovani, la mortalità è significativamente più alta negli anziani e quindi l'aumento dell'età viene considerato come fattore prognostico negativo; la presentazione clinica e le caratteristiche patologiche nel melanoma degli anziani differisce da quello dei più giovani con maggiore incidenza di ulcerazioni, elevato indice mitotico e più elevato indice di Breslow (indice di spessore del melanoma escisso) (63, 64).

Circa il 50% delle persone che ricevono una diagnosi di melanoma hanno una età maggiore di 65 anni.

Lo studio di Kaur et al. pone una grande importanza nell'invecchiamento del microambiente nella progressione del melanoma; durante l'invecchiamento, l'architettura della pelle cambia in modo sostanziale, il DNA dei fibroblasti, simile a quello dei melanociti, accumula danni con conseguente alterazione nella composizione del secreto proteico. Con l'età, fibroblasti hanno una maggior tendenza ad andare incontro a senescenza, uno stato di arresto proliferativo stabile indotto da stress cellulare, erosione dei telomeri, danno al DNA e signaling oncogenico; ciò sarebbe collegato con una maggior progressione del melanoma, metastasi e ad una minor risposta terapeutica BRAFV600E mirata (65, 66).

2 Scopo della tesi

Alcuni studi hanno dimostrato che il microambiente tumorale, costituito da un insieme eterogeneo di diversi tipi cellulari, tra cui, cellule del sistema immunitario, cellule del sistema vascolare, fibroblasti, periciti, adipociti e cellule stromali derivate dal tessuto adiposo, in generale, promuove la progressione e la metastasi delle cellule tumorali; i meccanismi alla base di questi processi, però, non sono stati ancora del tutto chiariti.

Sulla base delle premesse discusse fino a questo momento, l'obiettivo principale di questa tesi è stato quello di studiare l'interazione tra adipociti e cancro attraverso un modello di cocoltura in vitro. In particolare lo studio si è concentrato sull'interazione tra adipociti e cellule tumorali pancreatiche umane e tra adipociti e cellule di melanoma umano.

Pochi sono gli studi sinora pubblicati in letteratura volti ad indagare i meccanismi di interazione tra adipociti e melanoma e tra adipociti e cancro al pancreas, con evidenze di un'azione unicamente passiva del tessuto adiposo in grado di fornire substrati energetici ad entrambi i tipi cellulari.

Tuttora non è del tutto chiarito il ruolo dell'adipocita nel microambiente tumorale e in particolare se esso possa contribuire in maniera diretta ai processi di proliferazione e invasività tumorale.

Lo scopo pertanto di questa tesi è stato quello di valutare in modelli in vitro di co-cultura:

1. Le caratteristiche morfologiche e funzionali degli adipociti maturi in co-cultura con cellule umane di melanoma e con cellule umane di cancro al pancreas, confrontate con adipociti non in co-cultura definiti controllo
2. I pathways attivati dal cross-talk adipocita-cancro al pancreas e adipocita-melanoma
3. La capacità di migrazione delle cellule di melanoma cresciute in terreno normale e in terreno da co-cultura o da coltura degli adipociti.

3 Materiali e metodi

3.1 De-differenziamento degli adipociti in cocoltura con cellule di cancro al pancreas

3.1.1 Coltura cellulare

Linea cellulare del cancro al pancreas umano, MiaPaCa2 (ATCC) e cellule di fibroblasti murini 3T3-L1 (ECACC Sigma Aldrich) sono state coltivate a 37 ° C in 5% CO₂ rispettivamente in medium RPMI1640 e medium DMEM / Glutamax (Gibco), entrambi contenenti FBS al 10% e 1% soluzione di antibiotico antimicotico (SIGMA). All'85-90% di confluenza, le cellule 3T3-L1 sono state staccate mediante tripsina-EDTA (Gibco) e seminate in piastre da 6-pozzetti (Becton Dickinson) contenenti slides sterili (Menzel-glaser Thermo Scientific). Al 90% di confluenza, cellule sono state indotte a differenziare ad adipociti nel medium DMEM/F12 contenente 10% FBS, 1% di soluzione di antibiotico e antimicotico, 0.2 mM IBMX, 10

μM rosiglitazone, $1\mu\text{M}$ dexamethasone, $10\mu\text{g/ml}$ di insulina per 3 giorni. Dopo 72 ore di post-induzione (PID 3), il medium è stato cambiato con un terreno di mantenimento per gli adipociti (AMM), costituito da DMEM/F12 arricchito con 10% FBS, soluzione 1% di antibiotico e antimicotico, $10\mu\text{g/ml}$ di insulina (Sigma), in cui le cellule sono state coltivate per 2 giorni. Cinque giorni l'induzione ad adipociti, le cellule sono state co-coltivate con le MiaPaCa2 usando un sistema di coltura transwell (diametro di porosità di $0,4\mu\text{m}$; Becton Dickinson) in AMM senza insulina. 15.000 cellule / cm^2 di cellule MiaPaCa2 sono state seminate nella camera superiore. Il medium di co-coltura è stato cambiato ogni 3 giorni per un volume pari al 50%, le cellule sono state co-coltivate con MiaPaCa2 per altri 3 giorni (PID8), 6 giorni (PID11) e 9 giorni (PID14); MiaPaCa2 e adipociti 3T3-L1 sono stati coltivati da soli come controllo e valutati agli stessi time points. La vitalità cellulare è stata determinata mediante colorazione con Trypan Blue e le cellule vitali sono state contate utilizzando contatore automatico Countess Automated Cell Counter (Invitrogen). Lo stesso esperimento è stato ripetuto usando il medium di coltura condizionato delle cellule MiaPaCa2 (CM-MPC), aggiungendolo alle 3T3-L1 cresciute da sole; cellule 3T3-L1 sono state coltivate a partire da PID5 con il 50% di CM-MPC e 50% di AMM senza insulina. Ogni 3 giorni il 50% di terreno di coltura 3T3-L1 è stato rifornito con terreno fresco CM-MPC e AMM. Nell'esperimento di inibizione del de-differenziamento degli adipociti, $1\mu\text{g}$ di anticorpo anti-Wnt5a (SC-23698, Santa Cruz Biotechnology) e $2\mu\text{g}$ di anticorpo non specifico della stessa sottoclasse sono stati aggiunti in ciascun pozzetto. Inoltre dosi crescenti ($0,5$ e $2\mu\text{M}$ / ml) di SFRP5 ricombinante umano (R & D Systems Numero di catalogo: 6266-SF), sono stati aggiunti al mezzo di co-coltura, a partire da PID 8 e poi ogni 2 giorni.

3.1.2 Colorazione Oil Red O e imaging

Dopo lavaggio con tampone fosfato (PBS) $0,1\text{M}$ pH 7.4, colture cellulari sono state fissate per 20 minuti con 10% formalina tamponata neutra. Le cellule sono state quindi lavate con acqua bidistillata sterile e successivamente con 60% isopropanolo per 2 minuti e colorate con una soluzione filtrata di Oil Red O 0,35% in 60% isopropanolo per 10 minuti a temperatura ambiente. Poi, le cellule sono state lavate con acqua sterile bidistillata e controcolorate con soluzione ready to use di Ematossilina di Mayer (Bio-Optica) per 1 minuto a temperatura ambiente e poi lavate di nuovo con acqua bidistillata sterile. Infine, i vetrini sono stati trattati con montante acquoso Dako Faramount

Mounting Medium e coperti con vetrino coprioggetto. Le cellule sono state dunque osservate al microscopio ottico Olympus BX51 dotato di una fotocamera CCD KY-F58 (JVC). Le immagini sono state analizzate utilizzando il software ImageJ versione 1.47e. La conta delle cellule è avvenuta analizzando 10 campi rappresentativi (ingrandimento 100X, numero di cellule espresso su mm²); il calcolo dell'area è stato effettuato prendendo 10 cellule scelte random ad un Ingrandimento 400x, superficie espressa in µm².

3.1.3 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

Cellule 3T3-L1 differenziate ad adipociti per 11 giorni (PID11 controllo) e 3T3-L1 in co-coltura con cellule MiaPaCa2 per 6 giorni (PID 11 co-coltura) sono state coltivate su slides sterili, lavate con PBS pH 7.4 0.1M e poi disidratate con alcoli a concentrazione crescente (30 °, 50 °, 80 °, 95 ° e 100 °, 5 minuti per ciascun passaggio), essiccate, e fissate con argento colloidale su metalizzatore MED 010 (Balzers) e osservate con microscopio elettronico XL30 ESEM (FEI-Philips).

3.1.4 Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Cellule 3T3-L1 differenziate ad adipociti per 11 giorni (PID11 controllo) e 3T3-L1 in co-coltura con cellule MiaPaCa2 per 6 giorni (PID 11 co-coltura) sono state fissate in 2% glutaraldeide in tampone fosfato 0,1 M (pH 7,4) per 1 ora, post-fissate in una soluzione 1% di tetrossido di osmio e ferrocianuro di potassio 1%,, disidratate in etanolo ed infine incorporate in resina epossidica. Le sezioni semi fini (2 µm) sono state colorate con blu di toluidina. Sezioni sottili sono state ottenute con un ultratomo MT-X (RCM, Tucson, AZ), sono state montate su griglie di rame, colorate con piombo citrato ed esaminate al microscopio elettronico a trasmissione CM10 (Philips, Eindhoven, Paesi Bassi).

3.1.5 Estrazione dell'RNA, sintesi del cDNA e real time PCR (RT-PCR)

RNA è stato estratto da 600µl di lisato cellulare, seguendo il protocollo del kit RNeasy Mini (QIAGEN) per l'estrazione automatica con l'estrattore QIAcube. RNA estratto e purificato è stato controllato mediante Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) su di un nanochip per RNA con Agilent 2100 Bioanalyzer. La

trascrizione inversa dell'RNA a cDNA è stata eseguita con Kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad) utilizzando il seguente protocollo: 5 minuti a 25°C, 30 minuti a 42°C e 5 minuti a 85°C.

RT-PCR è stata eseguita con lo strumento Bio-Rad MyiQ RT-PCR, utilizzando il kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (QIAGEN), secondo il protocollo fornito dal produttore. Brevemente, la PCR è stata effettuata in un volume finale di 25µl, in cui erano presenti 100 ng di cDNA, 12.5µl di QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 7.5µl di acqua RNase free e 2.5µl di QuantiTect Primer Assay.

RNA è stato denaturato a 95°C per 15 minuti, mentre l'amplificazione è stata eseguita per 40 cicli con le seguenti condizioni: 15 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C e 30 secondi a 72°C, con QuantiTect Primer Assays (QIAGEN) per la leptina, adiponectina, GLUT4, HSL, collagene 1A1, MMP11, α-SMA, SFRP5, Klf4, c-Myc, Oct3 / 4, Sox2. Dati RT-PCR sono stati analizzati con Bio-Rad iQ Optical System Software. I livelli di espressione sono stati normalizzati utilizzando il controllo interno β-actina; i livelli di espressione relativi sono stati calcolati utilizzando la formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Ogni analisi è stata condotta almeno in triplice copia.

3.1.6 Western Blotting

Cellule MiaPaCa2 sono state lisate in tampone freddo contenente 20 mM HEPES, pH 7.4, 420 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Nonidet-P40 (NP-40), 20% glicerolo, inibitori della proteasi (GE Healthcare, Amersham Place, Regno Unito) e inibitori della fosfatasi. I lisati sono stati centrifugati a 25000 x g per 30 minuti. Cellule 3T3-L1 sono state lisate in buffer di lisi freddo, contenente 50mM Hepes (pH 7,4), 5 mM EDTA, 50mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM NaF, inibitri della proteasi e inibitori della fosfatasi; i lisati sono stati centrifugati a 12.000 x g per 15 minuti. Il surnatante dei lisati di entrambi i tipi di cellule è stato raccolto ed è stata determinata la concentrazione delle loro proteine. La stessa quantità di proteine (40 µg / ml) è stata caricata su gel 10% SDS poliacrilammide. L'elettroforesi è stata eseguita a 100 V con un tampone di corsa contenente 0,25M TrisHCl, pH 8,3, 1.92M glicina, e 1% SDS; quindi proteine sono state trasferite su membrana di PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford MA) mediante elettroblotting; le membrane sono state bloccate con 5% non-fat dried milk in TBS-T (TBS contenente 0.1% (v/v) Tween 20) e successivamente incubate over / night a 4°C con anticorpo primario WNT5a (Santa Cruz biotechnology), pSTAT3 (Y705) e STAT3 (Cell Signaling).

Dopo il lavaggio, la membrana è stata incubata con anticorpo secondario HRP-coniugato (anti-goat, anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology) per 90 minuti e, dopo il lavaggio, la membrana è stata sviluppata utilizzando il sistema di rilevazione chemiluminescente (Immun-Star™ WesternCTM Kit, Bio-Rad, Hercules, CA). Proteine sono state infine rilevate utilizzando i XRS ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA).

3.1.7 ELISA

Mouse Wnt-5a presente nel terreno di coltura è stata misurata nelle diverse condizioni sperimentali utilizzando il kit ELISA mouse protein Wnt-5a (CUSABIO, CSB-EL026138MO). saggi ELISA sono stati fatti in 2 diverse serie di esperimenti e ciascun punto sperimentale è stato analizzato in doppio. (Sensibilità: 0,78 pg / ml; eccellente specificità per il rilevamento di mouse Wnt5a, senza cross-reattività).

3.1.8 Saggio di ritardo della mobilità elettroforetica (EMSA)

Gli estratti nucleari sono stati effettuati sia dalle cellule MiaPaCa2 sia dalle cellule 3T3-L1 indotte ad adipociti. La reazione di legame del DNA è avvenuta con 4 mg di estratto nucleare incubato con 105 cpm di oligonucleotidi a doppio filamento contenenti il sito di legame consenso c-JUN DNA (5' GGGCTTGATGAGTCAGCCGGACC-3') o API DNA (5'-CGCTTGATGACTCAGCCGGAA-3') in un volume finale di 15µl di tampone (20 mM HEPES, pH 7,9, 50 mM KCl, 0,5 mM ditiotreitolo, 0,1 mM EDTA, 2 mg di poli (dl-dC), e 10% glicerolo). Prodotti sono stati frazionati su un gel al 5% di poliacrilammide non denaturante. Il gel è stato essiccato e sottoposto ad autoradiografia. Specificità delle bande ritardate è stata dimostrata dalla competitività di un eccesso di 100 volte degli specifici oligonucleotidi marcati.

3.1.9 Analisi statistica

I dati sono stati presentati come media \pm errore standard ($M \pm SE$) nelle diverse condizioni sperimentali. I dati sono stati analizzati per la loro significatività statistica dopo la valutazione della loro distribuzione. Le differenze dell'espressione dell'mRNA sono state analizzate utilizzando il test ANOVA least significant difference (LSD) post-hoc test per valutare le differenze statistiche tra le diverse condizioni sperimentali. Le differenze sono state considerate statisticamente significativa con $p < 0.05$.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS statistica (Statistical Package per Social Science, versione 21 per Windows).

3.2 De-differenziamento degli adipociti in cocoltura con cellule di melanoma

3.2.1 Coltura cellulare

Cellule di fibroblasti murini 3T3-L1 (ECACC Sigma-Aldrich) sono state coltivate a 37°C in 5% CO₂ nel medium DMEM / Glutamax (Gibco) contenente FBS al 10% e 1% soluzione di antibiotico antimicotico (SIGMA). All'85-90% di confluenza, le cellule 3T3-L1 sono state staccate mediante tripsina-EDTA (Gibco) e seminate in piastre da 6-pozzetti (Becton Dickinson) contenenti slides sterili (Menzel-glaser Thermo Scientific). Al 90% di confluenza, cellule sono state indotte a differenziare ad adipociti nel medium DMEM/F12 contenente 10% FBS, 1% di soluzione di antibiotico e antimicotico, 0.2 mM IBMX, 10 µM rosiglitazone, 1 µM dexamethasone, 10 µg/ml di insulina per 3 giorni. Dopo 72 ore di post-induzione (PID 3), il medium è stato cambiato con un terreno di mantenimento per gli adipociti (AMM), costituito da DMEM/F12 arricchito con 10% FBS, soluzione 1% di antibiotico e antimicotico, 10 µg/ml di insulina (Sigma), in cui le cellule sono state coltivate per 2 giorni. Cinque giorni l'induzione ad adipociti, le cellule sono state co-coltivate con le cellule di melanoma linea cellulare A375, alla concentrazione di 15.000 cellule/cm², usando un sistema di coltura transwell (diametro di porosità di 0,4 µm; Becton Dickinson), nel terreno di coltura GlutaMAX (Gibco), contenente FBS al 10% e 1% di soluzione di antibiotico antimicotico (SIGMA). Il medium di co-coltura è stato cambiato ogni 3 giorni per un volume pari al 50%; dopo tre (PID8) e sei giorni di co-coltura (PID11), le cellule 3T3-L1 e le cellule di melanoma sono state prelevate per le analisi previste nel protocollo di studio.

Cellule di melanoma A375 e adipociti 3T3-L1 sono stati coltivati da soli come controllo e valutati agli stessi time points. La vitalità cellulare è stata determinata mediante colorazione con Trypan Blue e le cellule vitali sono state contate utilizzando contatore automatico Countess Automated Cell Counter (Invitrogen).

3.2.2 Colorazione Oil Red O e imaging

Dopo lavaggio con tampone fosfato (PBS) 0,1 M pH 7.4, colture cellulari sono state fissate per 20 minuti

con 10% formalina tamponata neutra. Le cellule sono state quindi lavate con acqua bidistillata sterile e successivamente con 60% isopropanolo per 2 minuti e colorate con una soluzione filtrata di Oil Red O 0,35% in 60% isopropanolo per 10 minuti a temperatura ambiente. Poi, le cellule sono state lavate con acqua sterile bidistillata e controcolorate con soluzione ready to use di Ematossilina di Mayer (Bio-Optica) per 1 minuto a temperatura ambiente e poi lavate di nuovo con acqua bidistillata sterile. Infine, i vetrini sono stati trattati con montante acquoso Dako Faramount Mounting Medium e coperti con vetrino coprioggetto. Le cellule sono state dunque osservate al microscopio ottico Olympus BX51 dotato di una fotocamera CCD KY-F58 (JVC). Le immagini sono state analizzate utilizzando il software ImageJ versione 1.47e. La conta delle cellule è avvenuta analizzando 10 campi rappresentativi (ingrandimento 100X, numero di cellule espresso su mm²); il calcolo dell'area è stato effettuato prendendo 10 cellule scelte random ad un ingrandimento 400x, superficie espressa in μm².

3.2.3 Immunofluorescenza

Cellule sono state fissate per 15 minuti in formalina 10% in PBS tamponata neutra, lavate in PBS 1x 3 volte per 5 minuti ciascuna, permeabilizzate con 0,1% Triton X-100 in PBS 1x per 10 minuti a temperatura ambiente, successivamente lavate con PBS 1x 3 volte per 5 minuti, e bloccate con soluzione bloccante (10% siero normale di capra, 1% BSA, 0,1% Triton X-100 in PBS 1x) per 60 minuti a temperatura ambiente.

Le cellule sono state quindi incubate over / night a 4°C con anticorpo anti-LEF1 (1: 150, Thermo Scientific) o anticorpo anti-β-catenina (1:100, Bethyl), successivamente, sono state lavate con 0.1% Triton X-100 in PBS 1x 3 volte per 10 minuti per ciascun lavaggio, e infine incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con anticorpo anti-Rabbit IgG DyLight 448 coniugato (1: 100, Bethyl). I nuclei sono stati colorati in blu mediante trattamento per 5 minuti a temperatura ambiente con 4', 6-diamidino-2-fenilindole dihydrochloride (DAPI) (ready to use, BosterBio). Infine, le cellule sono state osservate con microscopio a fluorescenza Olympus BX51 dotato di fotocamera KY-F58 CCD (JVC). L'intensità media di fluorescenza (densità integrata, ID) è stata calcolata su 50 nuclei LEF1(+) o β-catenina(+) su 5 campi presi random ad un ingrandimento 200x mediante software ImageJ versione 1.50i. La fluorescenza di fondo è stata calcolata misurando l'intensità della fluorescenza delle aree fuori dalle cellule. La fluorescenza corretta totale cellulare (CTCF) è stata

quindi calcolata sottraendo la fluorescenza di fondo dalla densità integrata (CTCF = ID – background) (67).

3.2.4 Estrazione dell'RNA, sintesi del cDNA e real time PCR (RT-PCR)

RNA è stato estratto da 600µl di lisato cellulare, seguendo il protocollo del kit RNeasy Mini (QIAGEN) per l'estrazione automatica con l'estrattore QIAcube. RNA estratto e purificato è stato controllato mediante Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies) su di un nanochip per RNA con Agilent 2100 Bioanalyzer. La trascrizione inversa dell'RNA a cDNA è stata eseguita con Kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad) utilizzando il seguente protocollo: 5 minuti a 25°C, 30 minuti a 42°C e 5 minuti a 85°C.

RT-PCR è stata eseguita con lo strumento Bio-Rad MyiQ RT-PCR, utilizzando il kit QuantiTect SYBR Green RT-PCR (QIAGEN), secondo il protocollo fornito dal produttore. Brevemente, la PCR è stata effettuata in un volume finale di 25µl, in cui erano presenti 100 ng di cDNA, 12.5µl di QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 7.5µl di acqua RNase free e 2.5µl di QuantiTect Primer Assay.

RNA è stato denaturato a 95°C per 15 minuti, mentre l'amplificazione è stata eseguita per 40 cicli con le seguenti condizioni: 15 secondi a 94°C, 30 secondi a 55°C e 30 secondi a 72°C, con QuantiTect Primer Assays (QIAGEN) per l'adiponectina, GLUT4, MMP2, α -SMA, SFRP5, Kruppel like factor 4 (Klf4) e c-Myc. Dati RT-PCR sono stati analizzati con Bio-Rad iQ Optical System Software. I livelli di espressione sono stati normalizzati utilizzando il controllo interno β -actina; i livelli di espressione relativi sono stati calcolati utilizzando la formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Ogni analisi è stata condotta almeno in triplice copia.

3.2.5 Test di invasività in matrigel

Cellule di melanoma A375 sono state coltivate da sole (controllo) o in co-coltura con adipociti maturi 3T3-L1 da PID5. Dopo 3 giorni, sia le cellule di melanoma di controllo sia quelle co-coltivate sono state private del siero per 16 ore. Successivamente, entrambi i tipi di cellule di melanoma sono state trattate con tripsina e seminate alla concentrazione di 40000 cellule/well in inserti di matrigel precedentemente trattati con 8µg di FBS (chemioattrattante). Le cellule di melanoma migrano in matrigel in risposta a FBS usato come sostanza chemioattrattante. Tale esperimento è stato ripetuto con

aggiunta di SFRP5 (2 μ g/ml), inibitore di Wnt5a, nel medium di coltura per un tempo di 24 ore. La percentuale di cellule migrate sul totale di cellule seminate è stata determinata dopo trattamento con sostanza fluorescente Calcein AM; il controllo è stato ottenuto senza aggiunta di siero. La intensità della fluorescenza è proporzionale al livello di invasione cellulare.

3.2.6 Scratch test

Le cellule di melanoma A375 sono state coltivate da sole (controllo) o in co-coltura con adipociti maturi 3T3-L1 a 5 giorni dall'induzione (PID5). Dopo 3 giorni dall'inizio della co-coltura (PID8) le cellule sono state trattate con tripsina, contate e seminate in 12 well. Successivamente, le cellule sono state coltivate fino al raggiungimento della confluenza; cellule A375 sono state anche coltivate in medium che deriva dalla coltura degli adipociti maturi (MC 3T3-L1), in medium che deriva dalla cocoltura (MC coco) e in medium che deriva dalla cocoltura a cui è stato aggiunto inibitore per Sfrp5 (2 μ g/ml) (MC coco SFRP5), nelle stesse condizioni precedentemente descritte. In seguito è stato creato un solco all'interno del monostrato di cellule di melanoma utilizzando un puntale da 200 μ l sterile. Le piastre sono quindi state lavate due volte con medium completo. Successivamente, le cellule sono state incubate per un periodo di 72 ore. Il solco è stato quindi monitorato e fotografato al tempo 0 e ogni 20 minuti utilizzando un microscopio a contrasto di fase con ingrandimento 10x. Con queste immagini è stato poi creato un filmato time-lapse per la valutazione della migrazione cellulare.

3.2.7 Western Blotting

Le cellule di melanoma A375 sono state lisate in ghiaccio in un tempone contenente 20 mM di Hepes pH 7.4, 420 mM di NaCl, 1 mM di EDTA, 1 mM di EGTA, 1% di Nonidet-P40 (NP-40), 20% di glicerolo, una miscela di inibitori delle proteasi (GE Healthcare, Amersham Place, UK) e una miscela di inibitori di fosfatasi. Le cellule di melanoma lisate sono state poi centrifugate a 25000 xg per 30 minuti. Il surnatante dei lisati cellulari è stato raccolto ed è stata determinata la concentrazione delle proteine. La stessa quantità di proteine (40 μ g / ml) è stata caricata su gel 10% SDS poliacrilammide. L'elettroforesi è stata eseguita a 100 V con un tampone di corsa contenente 0,25 M TrisHCl, pH 8,3, 1.92 M glicina, e 1% SDS; quindi proteine sono state trasferite su membrana di Polivinildenfluoruro (PVDF) (Immobilon P, Millipore, Bedford MA) mediante elettroblotting; le membrane sono

state bloccate con 5% non-fat dried milk in TBS-T (TBS contenente 0.1% (v/v) Tween 20) e successivamente incubate over / night a 4°C con i seguenti anticorpi primari: anti pAkt, anti-LEF-1 (Thermo scientific) e anti-β-catenina (Bethyl). Dopo il lavaggio, la membrana è stata incubata con anticorpo secondario HRP-coniugato (anti-goat, anti-rabbit, Santa Cruz Biotechnology) per 1,5 h e, dopo il lavaggio, la membrana è stata sviluppata utilizzando il sistema di rilevazione chemiluminescente (Immun-Star™ WesternCTM Kit, Bio-Rad, Hercules, CA). Proteine sono state infine rilevate utilizzando i XRS ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA).

3.2.8 Analisi statistica

La determinazione della distribuzione dei dati è stata effettuata mediante Shapiro Test: in caso di un valore di $p > 0.05$ la distribuzione dei dati è stata considerata normale, mentre in caso di $p < 0.05$ di tipo non normale. Per valutare la presenza di differenze statisticamente significative tra i diversi punti sperimentali, è stato utilizzato il test t di Student per le variabili con distribuzione normale e il Mann Whitney U-test per le variabili con distribuzione non normale. L'analisi statistica è stata effettuata mediante SPSS Statistical Software (Statistical Package for the Social Science, version 21 for Windows).

4 Risultati

4.1 De-differenziamento degli adipociti in cocoltura con cellule di cancro al pancreas

4.1.1 Adipociti dedifferenziano a cellule fibroblasto-simili dopo co-coltura con cellule MiaPaCa

Al fine di studiare il crosstalk tra adipociti e cellule di cancro del pancreas, è stato utilizzato un modello di co-coltura in cui le cellule MiaPaCa2 sono state seminate nella camera superiore e le 3T3-L1 sul fondo, in un sistema di coltura transwell, a partire da 5 giorni dopo l'induzione ad adipociti (PID5) e mantenimento in co-coltura per 3 giorni (PID8), 6 giorni (PID11) e 9 giorni (PID14). Adipociti 3T3-L1, definiti controllo, sono stati coltivati da soli e sono stati studiati agli stessi punti temporali delle co-culture. La vitalità delle cellule nelle diverse condizioni sperimentali è stata determinata mediante colorazione con Trypan Blue e non è cambiata in

modo significativo ai diversi punti sperimentali sia in co-coltura sia nel controllo.

Dopo 6 e 9 giorni di cocoltura tra 3T3-L1 adipociti e MiaPaCa2, è stata osservata la presenza abbondante di cellule fibroblasto-simili assenti nel controllo; inoltre, durante la co-coltura, adipociti maturi hanno progressivamente perso una notevole quantità di goccioline lipidiche, i nuclei sono diventati più centralizzati e le cellule sono diventate di forma allungata, simile alla morfologia dei fibroblasti (figura 9).

In particolare, il numero di cellule fibroblasto-simile è significativamente aumentato a PID11, dopo 6 giorni di co-coltura, rispetto al controllo. L'aumento del numero di fibroblasti è stato osservato corrispondere simultaneamente ad un decremento nel numero degli adipociti maturi, i quali, inoltre, presentano anche un'area più piccola, dopo 6 e 9 giorni di co-coltura con cellule MiaPaCa2, rispetto al controllo 3T3-L1 adipociti maturi non in cocoltura.

Per comprendere meglio il ruolo svolto dalle cellule tumorali nel processo di de-differenziamento, è stato effettuato un esperimento utilizzando medium condizionato da cellule MiaPaCa2 (CM-MPC) e mettendolo nella coltura degli adipociti 3T3-L1, a partire da PID 5.

E' stato osservato che anche le cellule 3T3-L1 esposte a CM-MPC dedifferenziavano a cellule fibroblasto-simili a PID 11, presentando un fenotipo simile a quello precedentemente osservato nel sistema di co-coltura; anche se a PID11 adipociti in co-coltura con cellule MiaPaCa erano significativamente più piccoli rispetto agli adipociti esposti a CM-MPC (figura 10).

La microscopia elettronica degli adipociti dedifferenziati e del controllo vengono mostrati in figura 11.

La microscopia elettronica a scansione (SEM) documenta chiaramente i cambiamenti dell'architettura cellulare dopo la co-coltura, con la comparsa di piccole cellule allungate e sottili estensioni citoplasmatiche, completamente differenti dalla tipica forma sferica degli adipociti maturi. Figura 9 (B1, B2) mostra le immagini della microscopia elettronica a trasmissione (TEM) delle cellule rappresentative in co-coltura ed in condizioni di controllo. La morfologia delle cellule in co-coltura è completamente diversa dal tipico aspetto degli adipociti maturi 3T3-L1, caratterizzati da grandi gocce lipidiche che occupano gran parte del citoplasma e tipici mitocondri allungati con le creste ad orientamento casuale.

Le cellule 3T3-L1 in co-coltura presentano caratteristiche tipiche delle prime fasi di origine dei preadipociti dalle cellule stromali-vascolari come ad esempio la presenza di piccole gocce lipidiche a livello del citoplasma e particelle

di glicogeno, ma hanno anche caratteristiche di attivi fibroblasti in quanto presentano un reticolo endoplasmatico rugoso ben rappresentato e dilatato.

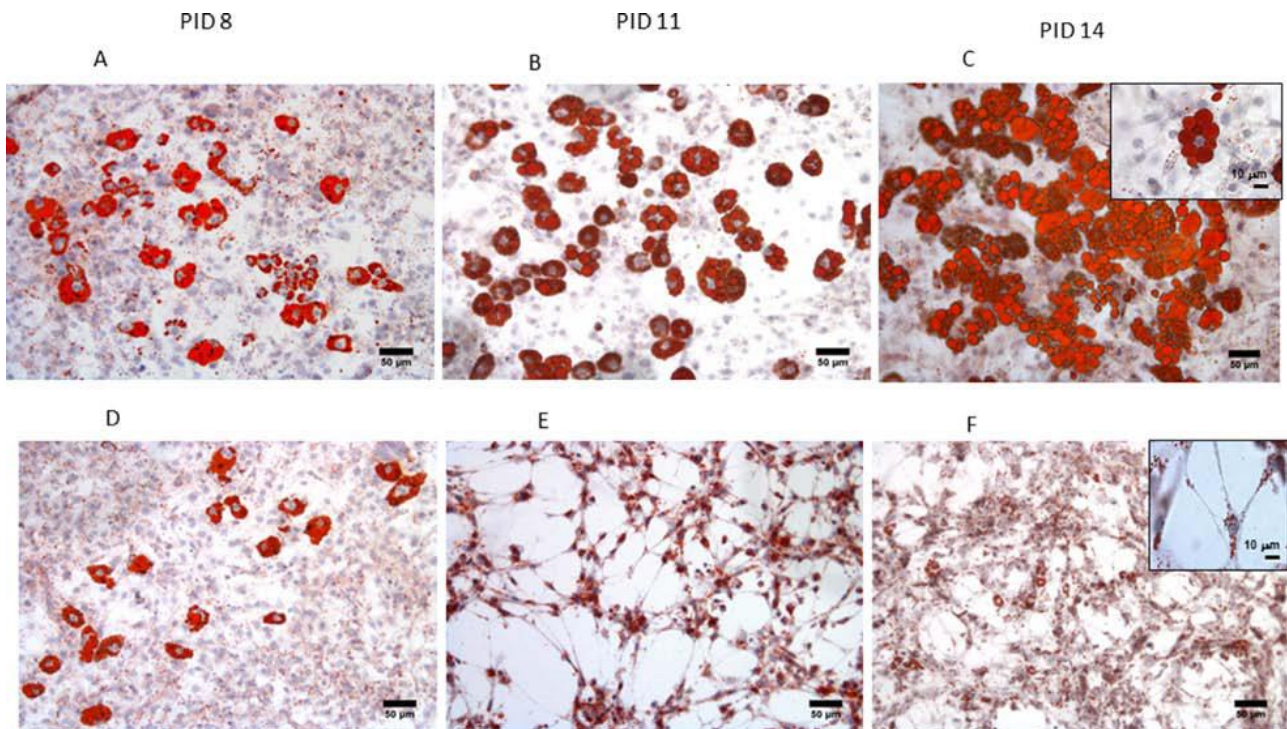


Figura 9: Cambiamenti morfologici degli adipociti 3T3-L1 durante la co-coltura con cellule MiaPaCa2. Mediante colorazione Oil Red O (lipidi in rosso): è possibile osservare un progressivo cambiamento nella morfologia delle cellule 3T3-L1 in co-coltura con cellule MiaPaCa2 (D-F) rispetto agli adipociti di controllo (A-C) da PID8 a PID14 (ingrandimento 100x, scale bar= 50 µm). Nei riquadri più piccoli in C ed F, adipocita maturo e cellula fibroblasto simile, rispettivamente (ingrandimento 400x, scale bar= 10 µm).

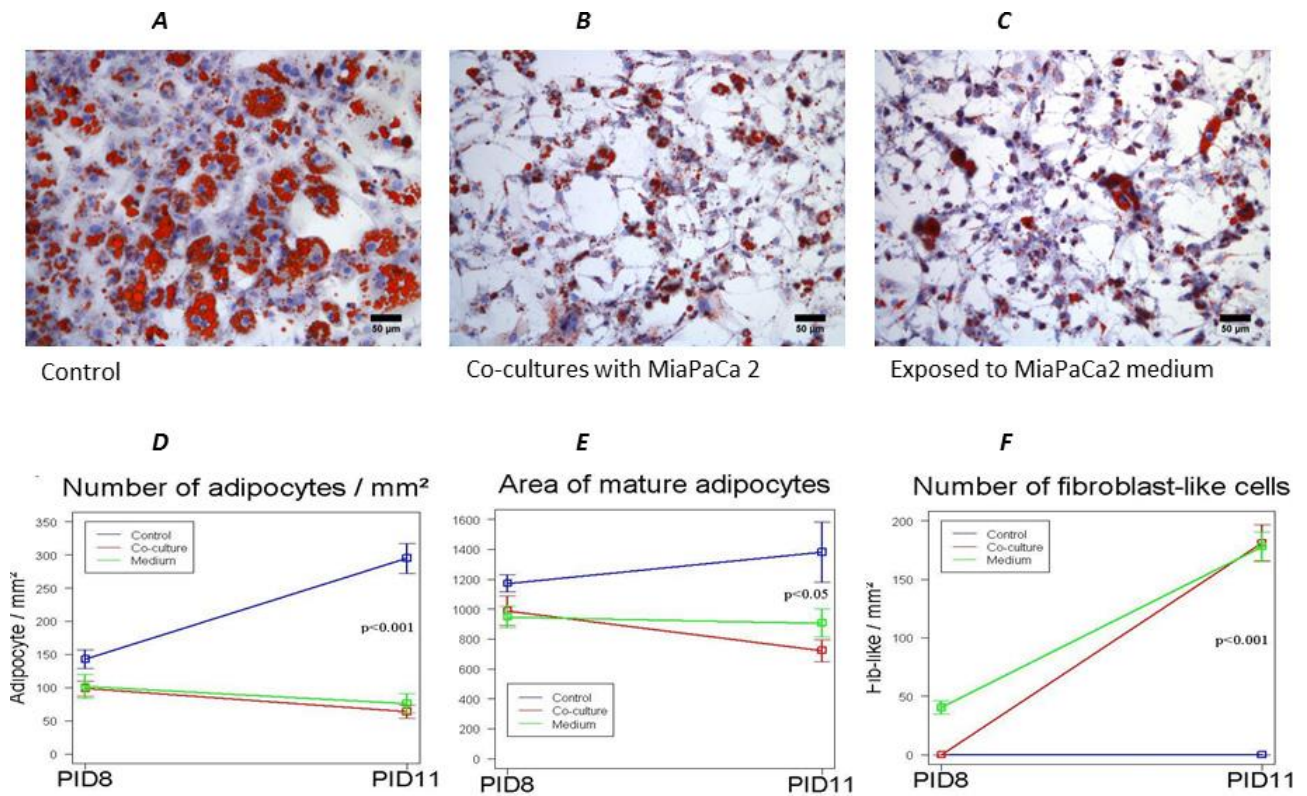


Figura 10: Effetti dell'esposizione al mezzo condizionato con MiaPaCa2 sulle cellule 3T3-L1 adipociti maturi (C): adipociti 3T3-L1 esposti al medium della coltura MiaPaCa2 presentano ancora un fenotipo fibroblasto-simile. Adipociti in co-coltura e adipociti esposti al medium MiaPaCa2, presentano una progressiva riduzione del numero (D) e dell'area (E) degli adipociti rispetto al controllo ed un progressivo aumento delle cellule fibroblasto-simili (F) rispetto al controllo in cui non sono state osservate. Dati sono presentati come media \pm errore standard ($M \pm SE$).

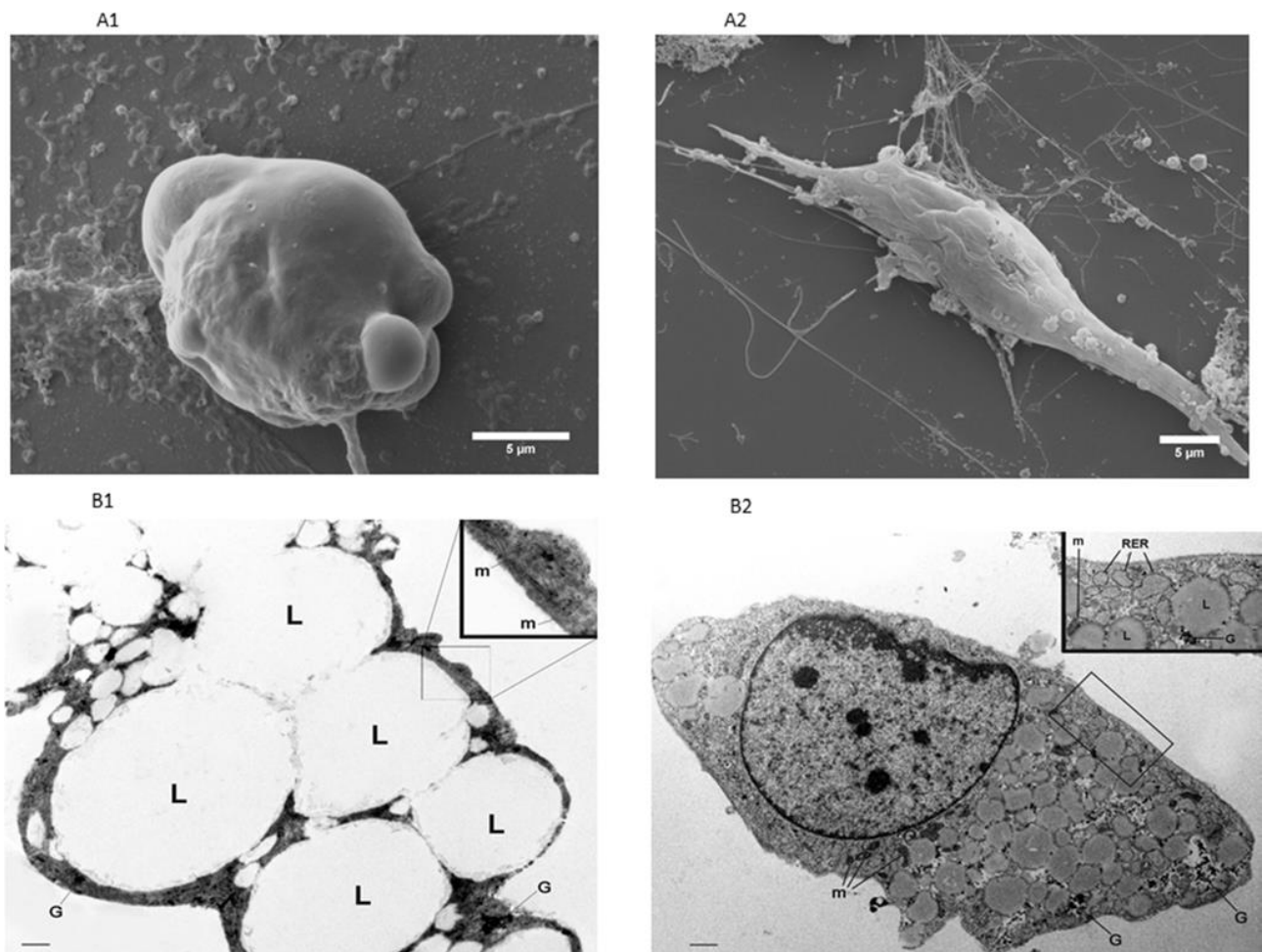


Figura 11: Immagini rappresentative di microscopia elettronica di adipociti 3T3-L1 da soli o in co-coltura con cellule MiaPaCa2. Immagini SEM di adipociti 3T3-L1, dopo 6 giorni di co-coltura con cellule MiaPaCa2 (PID11) mostrano una morfologia fibroblast-like (A2), mentre gli adipociti maturi, in condizioni di controllo, presentano un aspetto tipicamente sferico (A1). Analisi TEM mostra grandi vacuoli lipidici che occupano la maggior parte del citoplasma degli adipociti maturi 3T3-L1 a PID11 (B1); il riquadro mostra tipici mitocondri allungati, con creste orientate in modo casuale (scale bar= 0,9 μ m; immagine nel riquadro: scale bar=0.3 μ m). In (B2) TEM di adipocita 3T3-L1 in co-coltura per 6 giorni con cellule MiaPaCa2 (PID11): questa cellula presenta un reticolo endoplasmatico rugoso (RER) abbondante e dilatato tra i piccoli vacuoli lipidici e glicogeno (scale bar= 1.2 μ m; nel riquadro scale bar= 0.6 μ m). Abbreviazioni: PID- giorno post-induzione, SEM – microscopia elettronica a scansione e TEM - a trasmissione, L - vacuoli lipidici, G - glicogeno, RER - reticolo endoplasmatico rugoso, m: mitocondri.

4.1.2 Adipociti dedifferenziati acquisiscono un profilo di riprogrammazione cellulare

Per studiare le variazioni del profilo genico di espressione degli adipociti dedifferenziati, è stata analizzata, mediante RT-PCR, l'espressione di alcuni geni specifici marcatori degli adipociti, come la leptina, adiponectina, GLUT4, HSL e PPAR γ ; inoltre, è stata testata l'espressione di alcuni geni specifici dei fibroblasti, come MMP11, collagene I e α -SMA. Dopo 6 giorni di co-coltura, è stata osservata una diminuzione significativa dell'espressione genica di marcatori adipocitari rispetto al controllo; dopo 9 giorni di co-coltura con MiaPaCa2, adipociti hanno perso leptina, adiponectina, GLUT4, HSL e l'espressione di PPAR γ ; Inoltre, le espressioni geniche di MMP11, collagene I e α -SMA sono aumentate significativamente, sostenendo altresì un processo di riprogrammazione / dedifferenziamento degli adipociti verso cellule fibroblast-like (figura 12). Per caratterizzare ulteriormente i cambiamenti funzionali osservati negli adipociti 3T3-L1 in co-coltura, è stato misurato il glicerolo rilasciato nel mezzo di coltura dopo 6 e 9 giorni: il glicerolo di rilascio è diminuito significativamente in co-coltura rispetto agli adipociti controllo a PID11 e a PID14 (figura 12, B). Infine, mediante saggio RT-PCR, è stata analizzata l'espressione di geni necessari per la riprogrammazione del processo cellulare come Oct3 / 4, Klf4, c-Myc e Sox2. Dati mostrano un aumento significativo nell'espressione di tutti i geni considerati importanti per la riprogrammazione del genoma delle cellule mature, già a 3 e poi a 6 giorni di co-coltura con MiaPaCa2. Inoltre, dopo 9 giorni di co-coltura, l'espressione di Oct3 / 4, Klf4, c-Myc e Sox2 è aumentata drasticamente in co-coltura, rispetto al controllo adipociti maturi (figura 12, D).

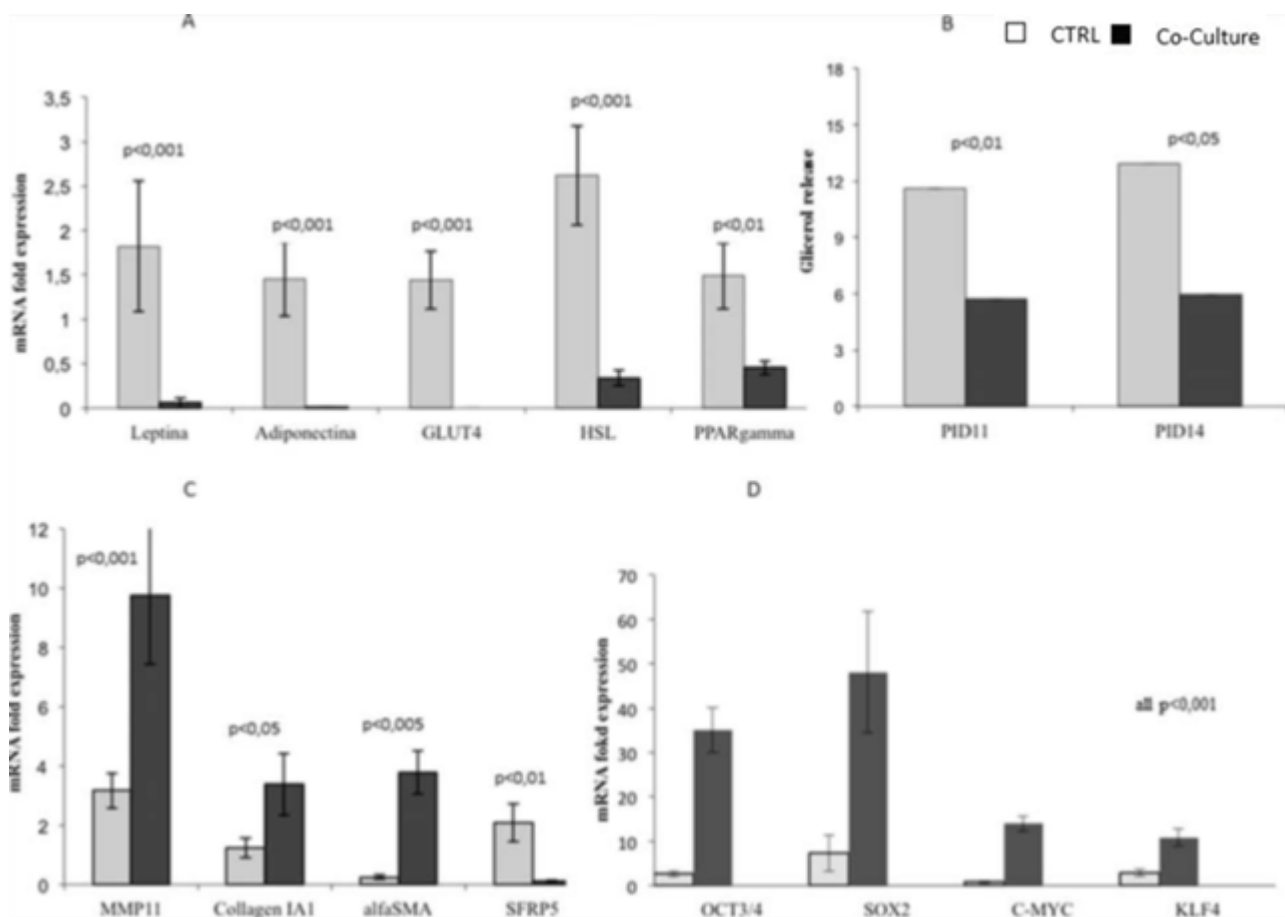


Figura12: cambiamenti funzionali degli adipociti 3T3-L1 in co-coltura rispetto alle cellule controllo. Analisi RT-PCR ha mostrato che 3T3-L1 adipociti in co-coltura con cellule MiaPaCa2 presentano una espressione significativamente inferiore di geni specifici degli adipociti maturi dopo 9 giorni di co-coltura (PID14), rispetto al controllo (A), una espressione genica elevata di marcatori specifici dei fibroblasti (C) ed una più elevata espressione dei geni di riprogrammazione (D); dati RT-PCR sono stati espressi prendendo in considerazione come controllo l'espressione genica in 3T3-L1 a PID8. Infine, a PID11 e PID14, adipociti in co-coltura con cellule MiaPaCa2 presentano un rilascio di glicerolo nel terreno di coltura inferiore rispetto al controllo (B). Dati espressi come media \pm errore standard ($M \pm SE$).

4.1.3 Cellule MiaPaCa esprimono Wnt5a

Mediante analisi western blotting (WB), è stato possibile determinare che la proteina Wnt5a è maggiormente espressa nelle cellule MiaPaCa2 in condizioni di co-coltura con cellule 3T3-L1 rispetto alle cellule MiaPaCa2 coltivate da sole.

Up-regolazione di Wnt5a può essere dovuta a STAT3 che riconosce una specifica regione del promotore Wnt5a, pertanto è stata analizzata anche la fosforilazione di STAT3 mediante WB. I dati confermano che le cellule

MiaPaCa2 co-coltivate con cellule 3T3-L1 presentano una maggior attivazione di STAT3 rispetto alle condizioni del controllo, a partire da PID8 (figura 13).

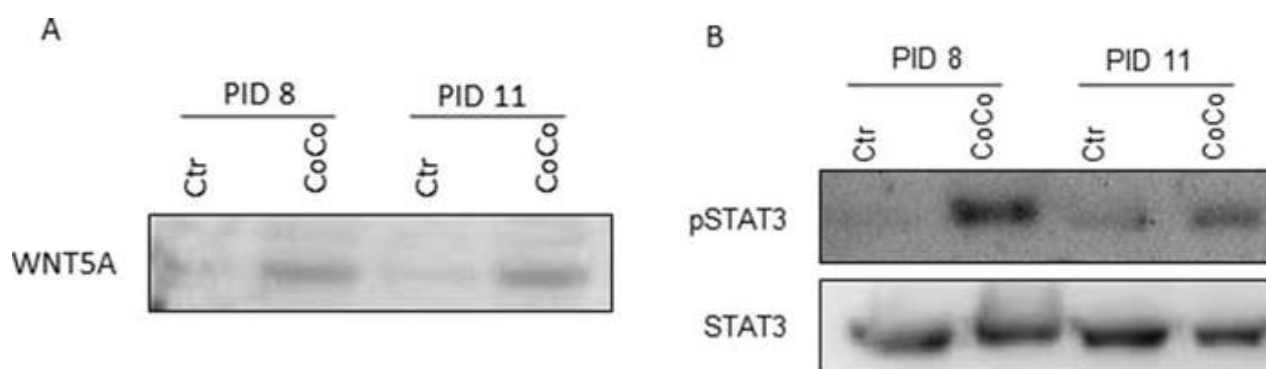


Figura 13: attivazione del pathway Wnt5a nelle cellule MiaPaCa 2 in co-coltura. Analisi WB mostra che la espressione della proteina Wnt5a (A) e STAT3 fosforilato (pSTAT3) (B) nell'estratto cellulare totale di MiaPaCa2 è aumentata dopo 3 (PID8) e 6 giorni (PID11) di co-coltura (CoCo), rispetto alle condizioni di controllo (MiaPaCa2 cresciute da sole) (Ctr). Abbreviazioni: WB- Western Blot, PID- post-induction day, CoCo: co-coltura, Ctr: controllo.

4.1.4 Il de-differenziamento degli adipociti è associato all'attivazione di pathway Wnt5a dipendente

Mediante esperimenti EMSA, utilizzando estratti proteici nucleari delle cellule 3T3-L1 coltivate non in co-coltura (controllo) ed in co-coltura a tempi diversi, è stato trovato che cellule 3T3-L1 in co-coltura a PID11 e PID14 presentano una maggior capacità di legare sia c-Jun che AP-1, due proteine attivate dal pathway Wnt5a. Inoltre, EMSA di estratto nucleare delle cellule MiaPaCa2 mostra un aumento del legame di c-Jun e AP1 dopo co-coltura con cellule adipociti 3T3-L1. Pertanto si ipotizza che Wnt5a può anche avere una funzione autocrina e paracrina sulle cellule MiaPaCa2, probabilmente mediata attraverso l'attivazione di STAT3. Per sostenere ulteriormente il ruolo di Wnt5a nel fenomeno di de-differenziamento degli adipociti, il pathway di Wnt5a è stato bloccato aggiungendo un anticorpo anti-Wnt5a nel terreno di coltura. In presenza di anticorpo neutralizzante, adipociti 3T3-L1 in co-coltura con MiaPaCa2 presentano una diminuzione dell'attivazione di entrambi i fattori trascrizionali c-Jun e AP1 rispetto alle condizioni di co-coltura in assenza di anticorpo (figura 14).

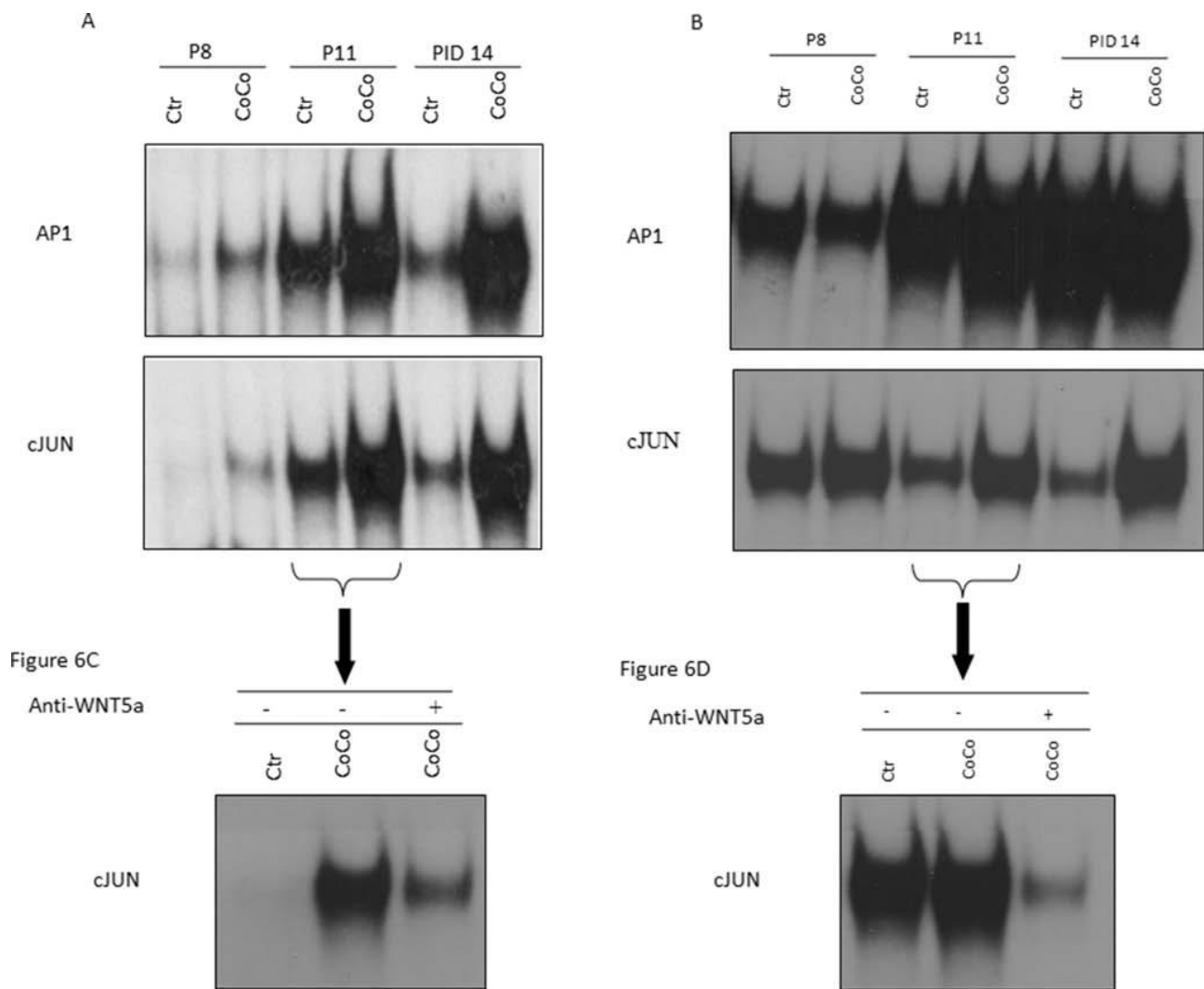


Figura 14: inibizione della via Wnt5a può controllare lo spostamento fenotipico degli adipociti. Per studiare il pathway che potrebbe essere attivato dall'up-regolazione di Wnt5a nelle diverse condizioni sperimentali, è stata studiata l'espressione di c-Jun e AP1 negli adipociti 3T3-L1 (A) e nelle cellule MiaPaCa2 (B) a PID8, PID11 e PID14. Essendo che la espressione di c-Jun appare aumentata in co-coltura già a PID11, è stato fatto un trattamento per 24 ore con un anticorpo neutralizzante Wnt5a. Risultati, mediante EMSA, hanno dimostrato che l'attivazione di c-Jun viene inibita da questo trattamento negli adipociti 3T3-L1 (C) e nelle cellule MiaPaCa2 (D). Abbreviazioni: PID- giorno post-induzione, EMSA- Electrophoretic Mobility Shift Assay, AP-1: activator protein-1.

4.1.5 Inibizione di Wnt5a blocca in parte il differenziamento

Secreted frizzled-related protein 5 (SFRP5) è una proteina secreta che inibisce, blocca Wnt-5a signaling, andando a competere per il legame con il suo recettore. Pertanto, a partire da PID8 e poi ogni due giorni, sono state aggiunte al mezzo di co-coltura, dosi crescenti di SFRP5

ricombinante (0.5 e 2mM/ml). La dose più alta di SFRP5 è stata in grado di bloccare in modo significativo il de-differenziamento degli adipociti in co-cultura; infatti, il numero di cellule fibroblasto-simili in co-cultura con SFRP5 è risultato essere significativamente più basso rispetto alla co-cultura senza SFRP5, inoltre, il numero degli adipociti è risultato essere significativamente più alto nel trattato con SFRP5 (figura 15).

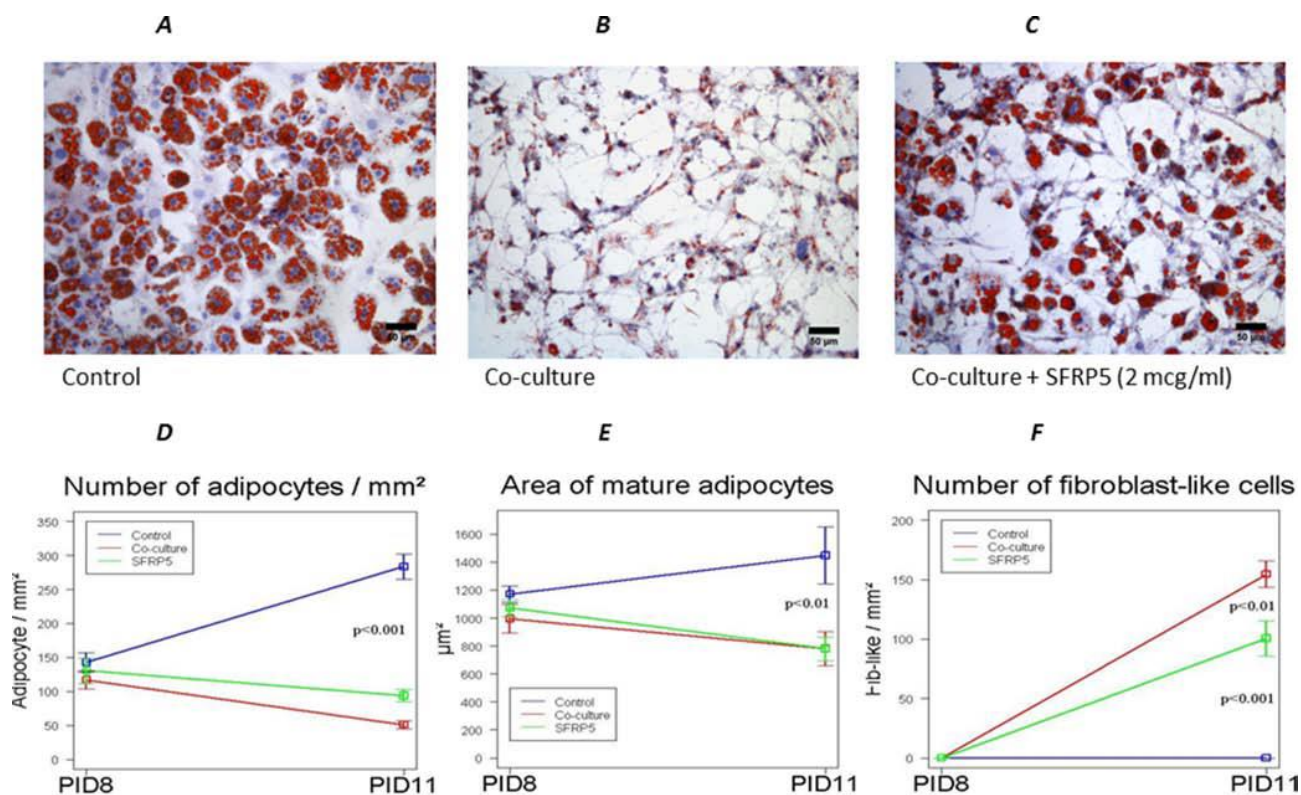


Figura 15: L'inibizione del signaling di Wnt5a diminuisce il de-differenziamento delle cellule 3T3-L1 in co-cultura con cellule MiaPaCa2. Effetto dell'aggiunta di SFRP5 al medium sul de-differenziamento degli adipociti in co-cultura (C). Numero ed area degli adipociti (D, E) e numero di cellule fibroblasto-simili in co-cultura con SFRP5 (F) rispetto alla co-cultura senza trattamento. I dati sono presentati come media \pm errore standard ($M \pm SE$). Abbreviazioni: PID- giorno post-induzione, SFRP5- secreted frizzled related-protein 5.

4.2 De-differenziamento degli adipociti in cocoltura con cellule di melanoma

4.2.1 Adipociti maturi dedifferenziano a cellule fibroblasto-simili dopo co-coltura con cellule di melanoma A375

Al fine di studiare il cross-talk tra adipociti e cellule di melanoma, è stato utilizzato un modello di co-coltura in cui le cellule di melanoma A375 sono state seminate nella camera superiore e le 3T3-L1 sul fondo, in un sistema di coltura transwell, a partire da 5 giorni dopo l'induzione ad adipociti (PID5) e mantenuti in co-coltura per 3 giorni (PID8) e 6 giorni (PID11). Adipociti 3T3-L1 sono stati coltivati da soli e sono stati studiati agli stessi punti temporali delle co-culture e definiti come controllo. La vitalità delle cellule, nelle diverse condizioni sperimentali, è stata determinata mediante colorazione con Trypan Blue e non è cambiata in modo significativo ai diversi punti sperimentali sia in co-coltura sia negli adipociti di controllo.

Dalla figura 16 A, B si può osservare che il numero e l'area degli adipociti maturi aumenta da PID8 a PID11 nel controllo; inoltre, dopo 3 giorni (PID8) e 6 giorni (PID11) di cocoltura tra 3T3-L1 adipociti e cellule di melanoma A375, è stata osservata la presenza di cellule fibroblasto-simili assenti nel controllo.

Durante la co-coltura, adipociti maturi hanno progressivamente perso una notevole quantità di goccioline lipidiche, i nuclei sono diventati più centralizzati e le cellule sono diventate di forma allungata, simile alla morfologia dei fibroblasti (figura 16 C, D). In particolare, il numero di cellule fibroblasto-simili sono significativamente aumentate a PID11, dopo 6 giorni di co-coltura, rispetto al controllo. L'aumento del numero di fibroblasti è stato osservato corrispondere simultaneamente ad un decremento nel numero degli adipociti maturi, i quali, inoltre, presentano anche un'area più piccola, dopo 3 e 6 giorni di co-coltura con cellule A375, rispetto al controllo 3T3-L1 adipociti maturi non in co-coltura (figura 17).

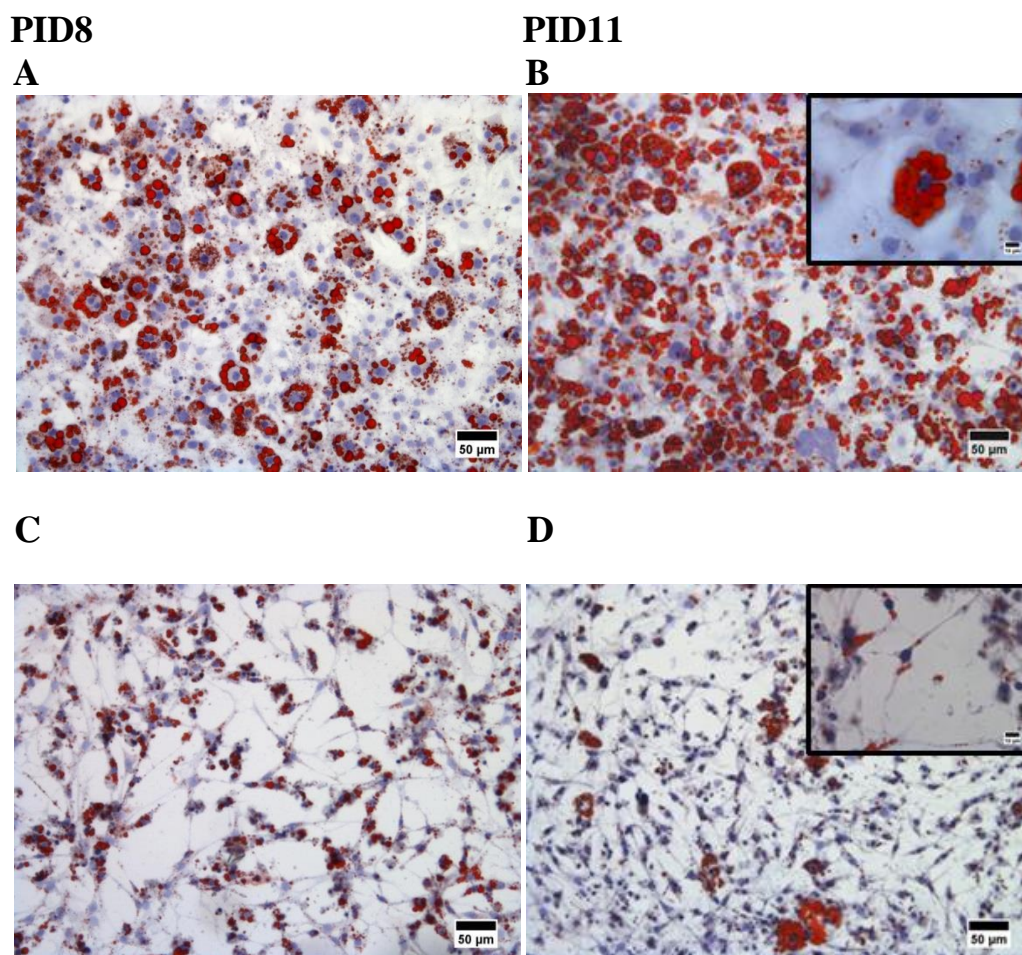


Figura 16: colorazione Oil Red O e controcolorazione con ematossilina di Mayer di A): 3T3-L1 adipociti maturi a PID8 controllo e B) a PID11 controllo, C) 3T3-L1 cellule fibroblasto-simili a PID8 cocoltura e D) a PID11 cocoltura (ingrandimento 100x, bar=50µm).

La immagine più piccola in B): particolare di un adipocita maturo controllo PID11 (400x di ingrandimento, bar=10µm); la immagine più piccola in D): particolare di una cellula 3T3-L1 fibroblasto-simile in cocoltura con cellule di melanoma a PID11 (400x di ingrandimento, bar=10µm).

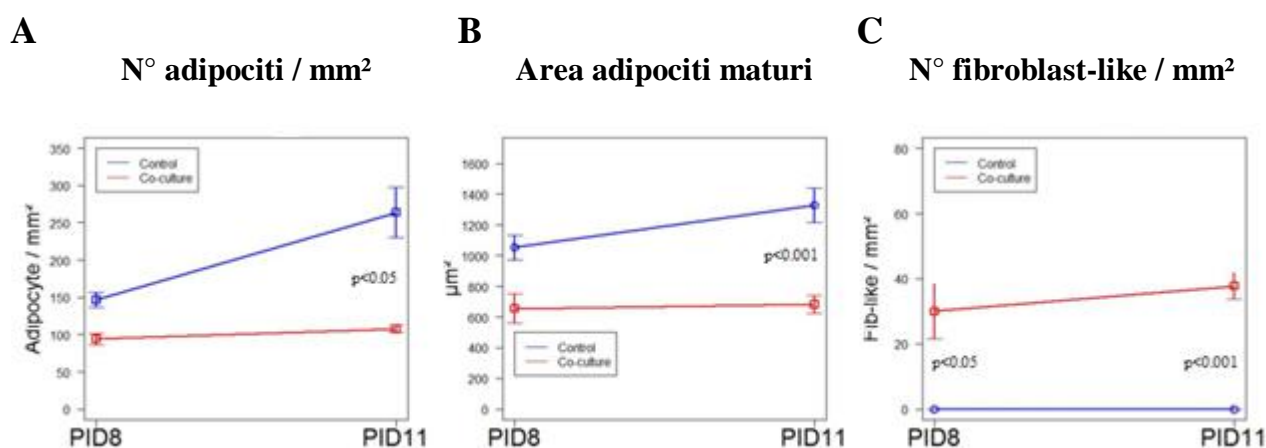


Figura 17: Effetti dell'esposizione alle cellule di melanoma A375 sulle cellule 3T3-L1 adipociti maturi: Adipociti in co-coltura, presentano una progressiva riduzione del numero (A) e dell'area (B) degli adipociti rispetto al controllo ed un progressivo aumento delle cellule fibroblasto-simili (C) rispetto al controllo in cui non sono state osservate. Dati sono presentati come media \pm errore standard ($M \pm SE$).

4.2.2 Adipociti dedifferenziati acquisiscono un profilo di riprogrammazione cellulare

Per studiare i cambiamenti nel profilo genico degli adipociti dedifferenziati, è stata analizzata, mediante RT-PCR, l'espressione di alcuni geni specifici degli adipociti maturi, in particolare GLUT-4, adiponectina e SFRP5. Inoltre sono stati analizzati i livelli di espressione di geni specifici per fibroblasti: α -SMA e metalloproteinase-2 (MMP2), normalmente poco espressi negli adipociti maturi. Le analisi sono state eseguite su cellule adipociti 3T3-L1 in co-coltura con cellule di melanoma e su cellule non in co-coltura (controllo).

Dopo 6 giorni di co-coltura (PID11) si è evidenziata una riduzione significativa dell'espressione di GLUT-4, adiponectina e SFRP-5 rispetto al controllo.

Contemporaneamente, l'espressione di MMP2 e α -SMA, a PID11, è risultata significativamente maggiore nelle cellule 3T3-L1 in co-coltura rispetto agli adipociti di controllo; inoltre, si è osservato un aumento dell'espressione dei geni della riprogrammazione cellulare come c-Myc e Klf-4 nelle cellule 3T3-L1 in co-coltura (figura 18).

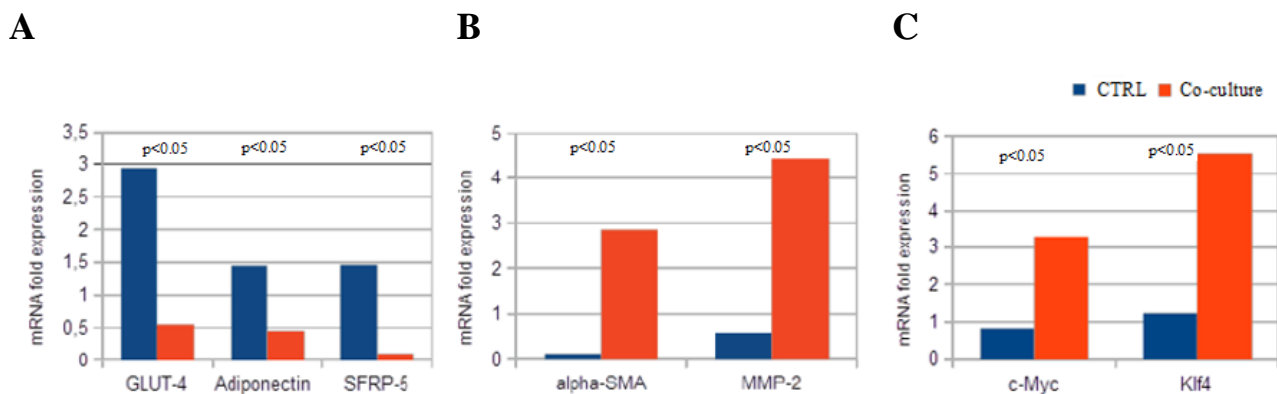


Figura 18: cambiamenti funzionali degli adipociti 3T3-L1 in co-cultura rispetto alle cellule controllo. Analisi RT-PCR ha mostrato che 3T3-L1 adipociti in co-cultura con cellule di melanoma A375 presentano una espressione significativamente inferiore di geni specifici degli adipociti maturi dopo 6 giorni di co-cultura con cellule di melanoma (PID11), rispetto al controllo (A), una espressione genica elevata di marcatori specifici dei fibroblasti (B) ed una più elevata espressione dei geni di riprogrammazione (C); dati RT-PCR sono espressi prendendo in considerazione come controllo l'espressione genica delle cellule 3T3-L1 a PID8 controllo.

4.2.3 Scratch test e test di invasione

Scratch Test è stato utilizzato per determinare la capacità di migrazione delle cellule di melanoma A375 sia in condizioni di co-cultura con cellule 3T3-L1 indotte ad adipociti, sia in condizioni non in co-cultura (controllo). Dalla visione del filmato in time-lapse è evidente come il movimento delle cellule di melanoma in co-cultura sia significativamente maggiore rispetto a quello delle cellule di controllo: infatti, le cellule cresciute in co-cultura durante le 72 ore della durata del test, migrano e si distribuiscono in modo da riempire quasi completamente il solco creato all'inizio dell'esperimento; mentre al contrario, nelle condizioni di controllo, al termine del test il solco è ancora ben visibile.

Poiché è noto in letteratura che le cellule di melanoma secernono Wnt5a e che questo è direttamente proporzionale all'aggressività del tumore stesso, si è ipotizzato un coinvolgimento di tale pathway nell'incremento della migrazione cellulare osservata sperimentalmente (68, 69). Nell'ipotesi che l'incremento della motilità osservato nelle cellule in co-cultura fosse indotto dall'attivazione del pathway di Wnt5a, è stato fatto anche un esperimento in cui è stata aggiunta nel medium la proteina SFRP5.

Nel secondo esperimento Scratch Test sono state quindi esaminate cellule di melanoma di controllo cresciute in

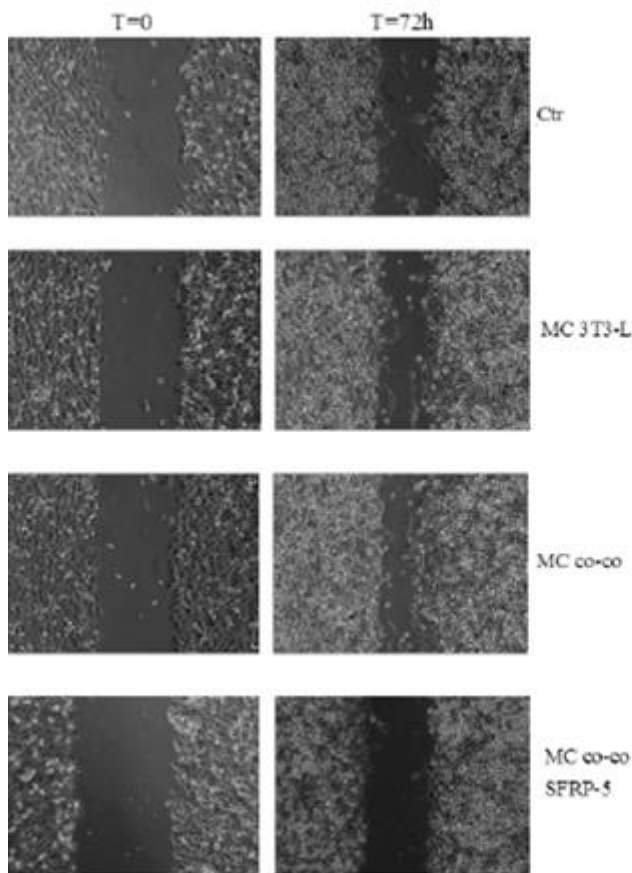
terreno normale (Ctr), cellule di melanoma cresciute in medium condizionato da adipociti (MC 3T3-L1), cellule di melanoma cresciute in medium derivato dalla co-coltura (MC co-co) e cellule di melanoma cresciute in medium da co-coltura e trattate con SFRP5 (Wnt-5a inibitore) (MC co-co SFRP5).

La migrazione delle cellule di melanoma A375 risulta aumentata in MC 3T3-L1 e, in maniera ancora più evidente, in MC co-co rispetto al controllo; la migrazione delle cellule risulta invece ridotta in MC co-co SFRP5 (figura 19).

Per studiare ulteriormente l'influenza degli adipociti sulle capacità di migrazione delle cellule di melanoma, è stato poi eseguito il test di invasione. Nel test sono state esaminate cellule di melanoma A375 non in co-coltura e cellule di melanoma in co-coltura con 3T3-L1 indotte ad adipociti. Il test è stato eseguito in presenza o meno di FBS (chemioattraente).

Le cellule di melanoma cresciute in co-coltura presentano una percentuale di migrazione in matrigel significativamente maggiore rispetto a cellule di controllo. Anche in questo caso l'esperimento è stato ripetuto dopo aggiunta nel medium di co-coltura della proteina SFRP5. La percentuale di migrazione delle cellule di melanoma cresciute in co-coltura e trattate con SFRP5 è risultata essere ridotta rispetto alle cellule cresciute in co-coltura, e risulta paragonabile alle cellule di melanoma controllo.

1



2

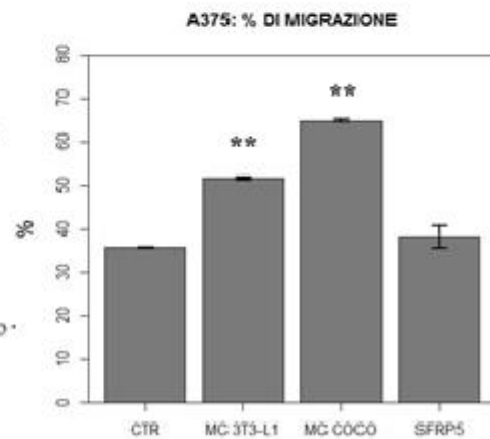


Figura 19: 1) Immagini che mostrano le cellule di melanoma all'inizio (T=0) e al termine (T=72h) dell'esecuzione dello Scratch Test. Cellule di melanoma cresciute in terreno normale (Ctr), cresciute in medium condizionato da adipociti (MC 3T3-L1), cresciute in medium derivante dalla co-coltura (MC co-co) e cresciute in medium derivante dalla co-coltura trattate con SFRP5 2) percentuale di migrazione delle cellule A375 nelle diverse condizioni sperimentali (** t-test p-value <0.01 rispetto al controllo).

4.2.4 Analisi di immunofluorescenza (IF)

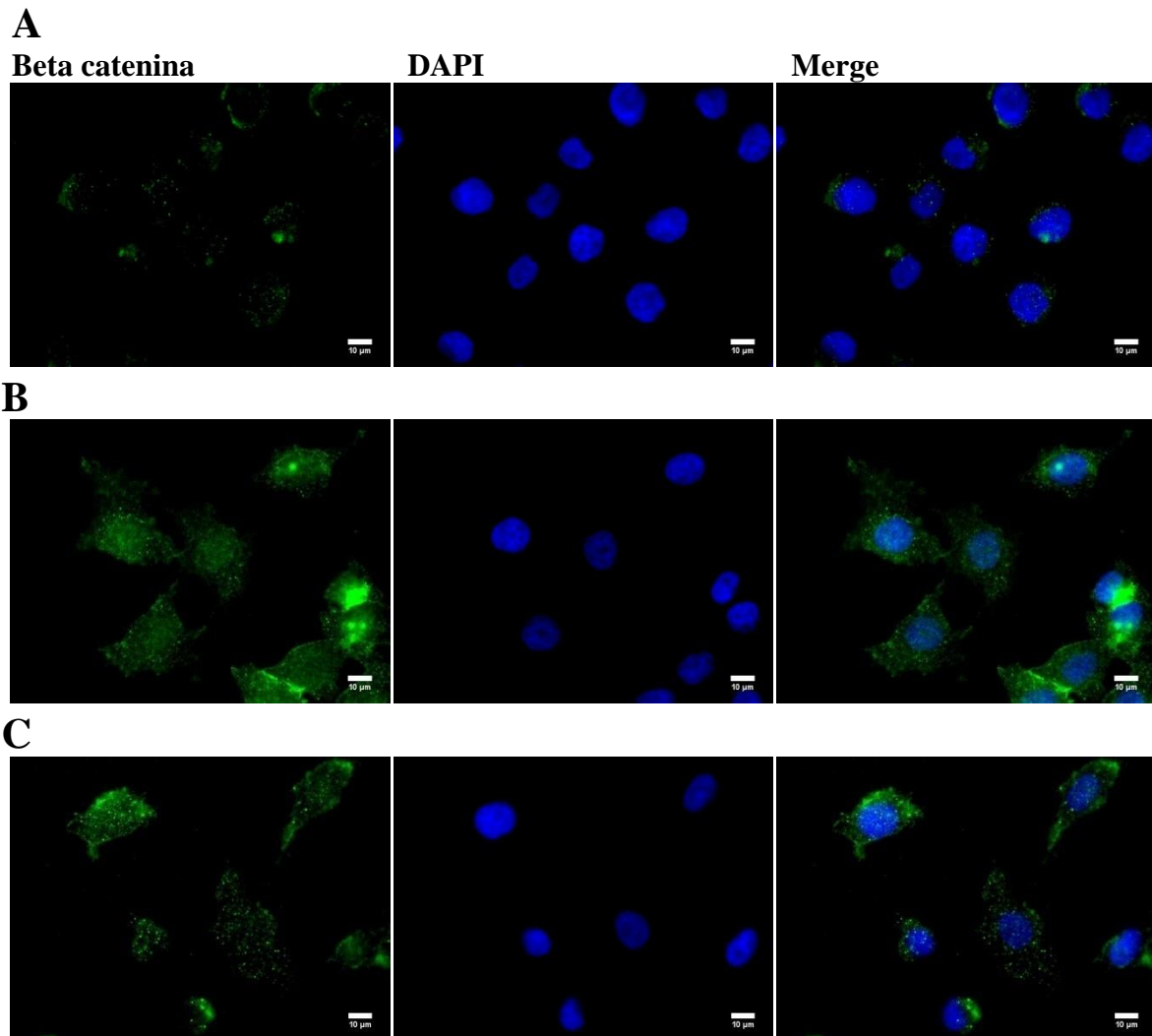
Mediante IF, è stata analizzata l'espressione della β -catenina e di LEF-1 in cellule di melanoma A375, coltivate con terreno da cocoltura (MEL M COCO), coltivate con terreno da adipociti (MEL M ADIP) e con terreno normale (MEL CTR).

Dall'osservazione al microscopio, si nota che la β -catenina è espressa a livello della membrana plasmatica cellulare, del citoplasma e del nucleo delle cellule. Si nota come l'espressione nucleare della β -catenina, nelle cellule di melanoma cresciute nel terreno normale, sia scarsa; al contrario si osserva un incremento nelle cellule cresciute nel medium che deriva dalla coltura degli adipociti e, in modo ancor più significativo, nelle cellule A375 cresciute nel medium della co-coltura (CTCF= 2754.63, 3571.42, 4899.44 rispettivamente) (CTCF: corrected total cell

fluorescence), t-test tra MEL CTR e MEL M ADIP: $p < 0.01$ e tra MEL CTR e MEL M COCO: $p < 0.001$ (figura 20).

Analogamente nel medesimo esperimento la figura 19 mostra invece l'espressione di LEF1: dalle immagini, si può notare che la sua espressione è localizzata solo a livello nucleare.

Dall'analisi di espressione, le cellule di melanoma coltivate con medium da adipociti A375 MEL M ADIP e con medium da co-cultura A375 MEL M COCO, risultano esprimere, in modo significativo, maggior LEF1 rispetto a cellule di melanoma di controllo A375 MEL CTR) (CTCF= 4435.02 in MEL CTR, CTCF=5017.21 in MEL M ADIP e CTCF= 5679.09 in MEL M COCO) (figura 21).



D

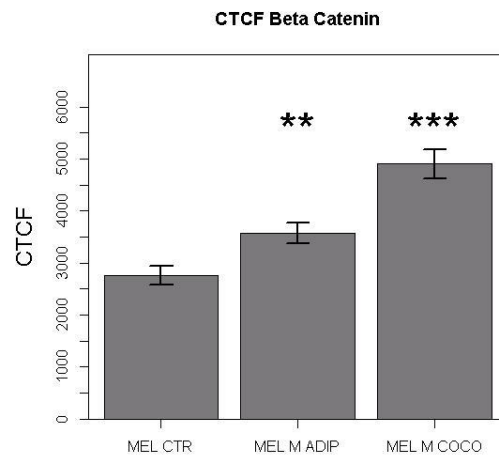


Figura 20: immagini significative della espressione della beta catenina nelle cellule di melanoma cresciute in medium normale (MEL CTR) (A), nel terreno da cocoltura (MEL M COCO) (B) e nel terreno adipocitario (MEL M ADIP) (C) (ingrandimento 400x, bar=10 μ m); CTCF (corrected total cell fluorescence) delle cellule di melanoma A375 coltivate in terreno normale (MEL CTR), in terreno da adipociti (MEL M ADIP) e cresciute nel medium della cocoltura (MEL M COCO) (D). (Bar= errore standard, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$).

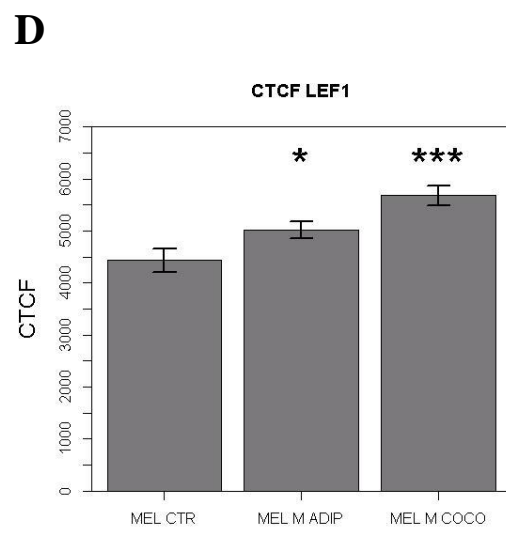
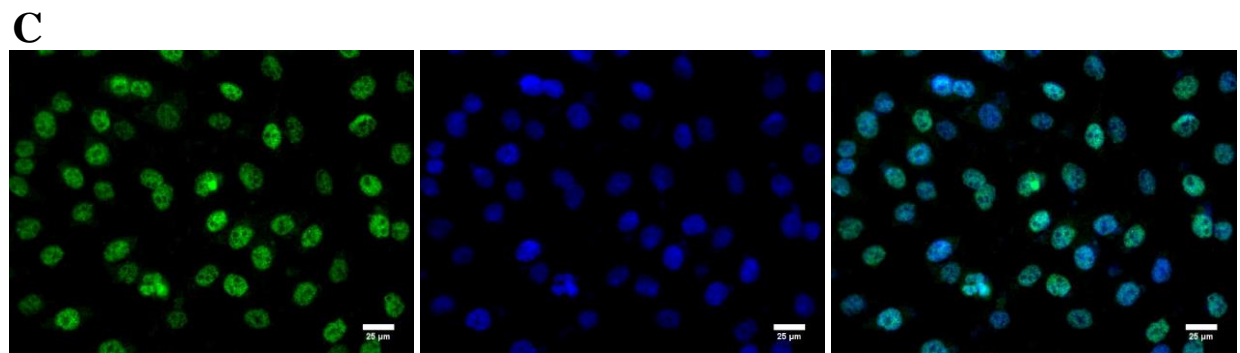
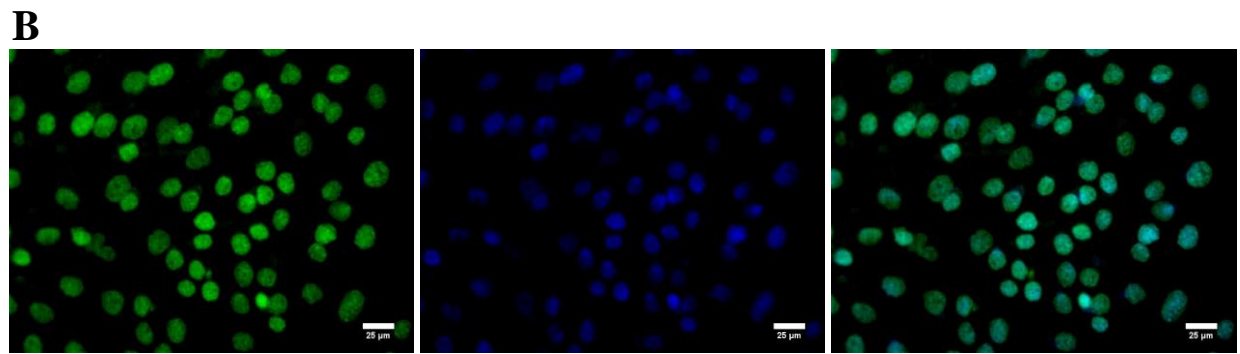
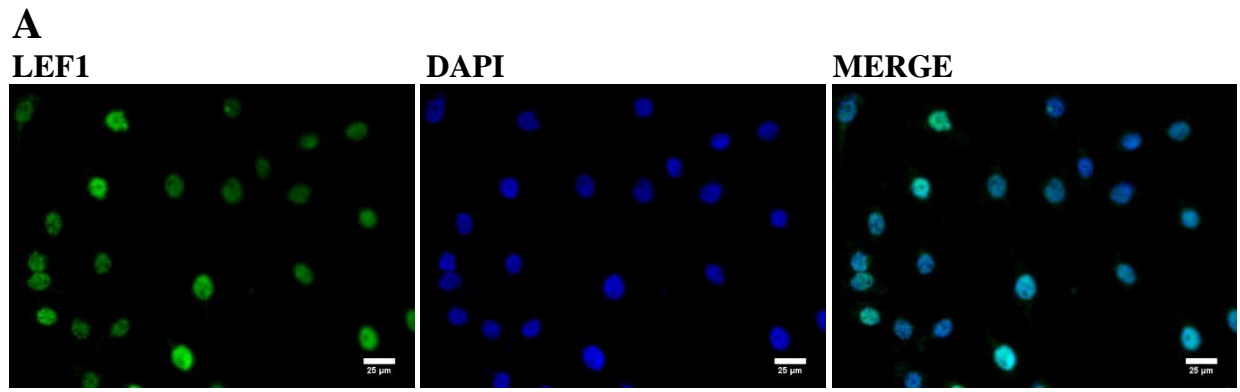


Figura 21: immagini significative della espressione di LEF1 nelle cellule di melanoma cresciute nel terreno normale (MEL CTR) (A), nel terreno da cocoltura (MEL M COCO) (B) e nel medium adipocitario (MEL M ADIP) (C) (ingrandimento 400x, bar=10µm); CTF (corrected total cell fluorescence) delle cellule di melanoma A375 coltivate in terreno normale (MEL CTR), in terreno da adipociti (MEL M ADIP) e cresciute nel medium della cocoltura (MEL M COCO) (D). (Bar= errore standard, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$).

4.2.5 Analisi mediante Western Blotting

La figura 22, A mostra l'espressione, mediante Western Blotting, della proteina β -catenina su estratti nucleari di cellule di melanoma A375 poste nelle medesime condizioni sperimentali di coltura delle A375 per l'analisi IF; pertanto, cellule di melanoma A375 sono cresciute in terreno normale (ctr), nel medium di crescita degli adipociti (MC 3T3-L1 ctr) e nel medium della co-coltura (MC 3T3-L1 coco).

Come si può osservare, il livello di espressione della β -catenina è basso in ctr, mentre risulta aumentato sia per A375 in MC 3T3-L1 ctr, sia per A375 in MC 3T3-L1 coco.

Utilizzando il medesimo schema sperimentale, è stata studiata l'espressione della proteina LEF-1 mediante Western Blotting (figura 22, B). Analogamente a quanto osservato per la β -catenina, si osserva un incremento dei livelli di espressione di LEF-1 nelle cellule cresciute nel medium che deriva dalla coltura degli adipociti e, in misura maggiore, nelle cellule cresciute con medium della cocoltura, rispetto al controllo.

Infine, è stata determinata anche la fosforilazione di Akt in treonina (T308) e determinata la sua espressione mediante Western Blotting. Akt è una proteina citoplasmatica, coinvolta nella regolazione di molti pathway molecolari favorevoli allo sviluppo tumorale, tra cui pathway della β -catenina e di LEF-1. Quando Akt viene fosforilata in treonina (T308), diventa attiva e inibisce la fosforilazione della β -catenina, e di conseguenza la sua degradazione proteasomica. In tal modo, pAkt determina una maggiore attività della β -catenina a livello nucleare e quindi dei geni da essa trascritti. Confrontando i risultati, si osserva che, la forma fosforilata di Akt è aumentata nelle cellule in cocoltura rispetto alle cellule di controllo (figura 22, C).

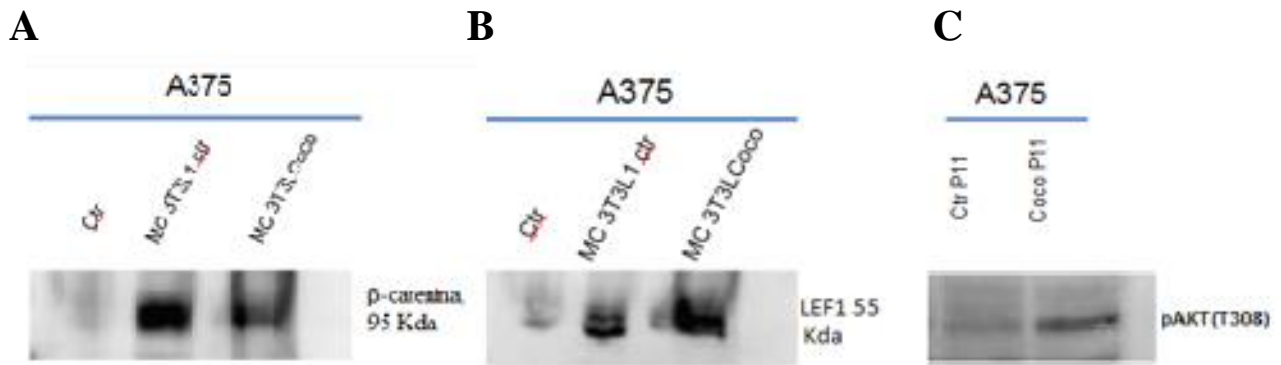


Figura 22: Analisi Western Blotting dell'espressione della proteina beta catenina (A) e LEF1 (B) delle cellule di melanoma A375 cresciute nel terreno normale (Ctr), nel terreno da adipociti (MC 3T3-L1 ctr) e nel terreno da cocoltura (MC 3T3-L1 Coco) e con terreno adipocitario (MEL M ADIP); in (C) analisi Western Blotting di AKT fosforilato in treonina 308 (pAKT T308) delle cellule di melanoma A375 cresciute da sole (Ctr P11) e A375 in co-coltura (Coco P11).

5 Discussione

5.1 De-differenziamento degli adipociti in cocoltura con cellule di cancro al pancreas

I dati presentati in questa tesi supportano un fenomeno di riprogrammazione e de-differenziamento degli adipociti in cellule simil fibroblastiche in un modello sperimentale in vitro di co-coltura volto ad indagare i meccanismi e gli effetti di un cross-talk tra adipociti e cellule tumorali che in vivo potrebbero rappresentare fenomeni rilevanti nel microambiente tumorale al fine dello sviluppo e progressione della neoplasia stessa.

Adipociti 3T3-L1 in co-coltura esprimono geni di riprogrammazione e modificano il loro fenotipo verso quello di cellule fibroblasto-simili, come dimostrato dall'analisi morfologica mediante microscopia elettronica (70). Sia in modelli in vitro sia in modelli in vivo di carcinoma mammario, è stato recentemente dimostrato che gli adipociti peritumorali possono subire fenomeni di de-differenziamento dapprima in adipociti associati al cancro (CAA) e poi in fibroblasti associati al cancro (CAF), contribuendo alla reazione desmoplastica attorno al tumore. Questa evidenza ha portato alcuni autori a ipotizzare un ruolo rilevante per il tessuto adiposo, non solo per soddisfare la crescente richiesta metabolica delle cellule tumorali proliferanti, ma anche nel rimodellamento della matrice extracellulare e nella progressione del cancro. Questo potrebbe essere possibile in quanto è stato dimostrato che adipociti dedifferenziano in cellule

immature con caratteristiche simili alle cellule mesenchimali in differenti condizioni sperimentali (71, 72). In linea con questa ipotesi, i dati di questo lavoro supportano l'esistenza di un processo caratterizzato dal de-differenziamento / riprogrammazione degli adipociti verso cellule fibroblasto-simili dopo co-coltura con cellule tumorali pancreatiche. L'aumento della espressione di MMP-11 e Collagene 1, che è stata osservata dopo co-coltura, può avere un impatto nel microambiente tumorale, e spiegare l'effetto promuovente che le cellule dedifferenziate hanno sulle cellule tumorali, osservato in altri contesti sperimentali (73). Tuttavia, i meccanismi che contribuiscono a questo processo di de-differenziamento, non sono del tutto chiari. È stato riportato che la concentrazione di Wnt5a circolante è maggiore in condizioni di obesità (74) e che il signaling di Wnt non canonico è attivato, contribuendo probabilmente allo stato pro-infiammatorio nel tessuto adiposo viscerale e allo sviluppo di diverse comorbidità associate all'obesità. Wnt5a è stato anche segnalato venire up-regolato in diversi tipi di cancro, in particolare nell'adenocarcinoma pancreatico duttale umano (PDAC) e rappresenta una molecola chiave nel rimodellamento della matrice extracellulare (75). In linea con la letteratura, in questo studio si dimostra che la co-coltura con adipociti aumenta i livelli della proteina Wnt5a da parte delle cellule MiaPaca2.

Adipociti in condizioni pro-infiammatorie producono elevati livelli di IL-6 che potrebbe essere un potenziale regolatore di espressione di Wnt5a attraverso la via di signaling STAT3. Nel sistema proposto da questo studio, il crosstalk tra adipociti e cellule di cancro al pancreas aumenta la fosforilazione di STAT3 nelle cellule di cancro e, come conseguenza dell'attivazione della via di signaling STAT3, è stato osservato un aumento dell'espressione di Wnt5a nelle cellule MiaPaCa2.

In seguito, è stata analizzata l'attivazione di c-Jun, fattore di trascrizione legante il DNA, tramite la via di signaling Wnt5a/Ror2. Tutti i risultati hanno confermato che Wnt5a è attivo dopo la co-coltura con cellule tumorali pancreatiche ed ha una funzione autocrina e paracrina, attivando il pathway c-JUN/AP1 anche nelle cellule 3T3-L1. Come conseguenza di questa attivazione negli adipociti, è stata anche osservata una maggior espressione di proteine coinvolte nella via Wnt5a, come le metalloproteinasi (MMPs), che, assieme ad altre proteine, sono responsabili del rimodellamento dello stroma.

In generale, i dati di questo studio sembrano indicare che l'attivazione di Wnt5a sia un fattore cruciale nel mediare il de-differenziamento degli adipociti. Infatti, il trattamento con l'anticorpo anti Wnt5a ripristina i cambiamenti del

signaling intracellulare negli adipociti 3T3-L1 in co-coltura. Inoltre, dosi crescenti di SFRP5 ricombinante hanno fortemente diminuito i fenomeni di de-differenziamento degli adipociti osservati nel presente modello in vitro.

Nel loro insieme, i risultati di questa tesi supportano l'esistenza di un cross talk tra adipociti e cellule tumorali pancreatiche con riprogrammazione degli adipociti a cellule fibroblasto-simili. Gli adipociti riprogrammati produrrebbero quindi citochine e fornirebbero lipidi e altri metaboliti alle cellule tumorali, promuovendo la crescita incontrollata del tumore. Le cellule tumorali possono indurre up-regolazione di diversi fattori di secrezione degli adipociti come TGF β , TNF α e MMP. Gli adipociti attivati dopo l'esposizione a questi fattori possono dedifferenziare in cellule fibroblasto-simili / preadipociti, che a loro volta sostengono la crescita e l'invasione delle cellule tumorali. Ulteriori studi sembrano essere necessari per confermare questi risultati, anche mediante modelli di co-culture con adipociti umani e modelli in vivo, in particolare per trovare nuovi bersagli molecolari che possano influenzare indirettamente il tumore attraverso i cambiamenti del suo microambiente, rappresentando un nuovo bersaglio per il trattamento del cancro. Questo crosstalk è stato studiato solo in alcuni modelli di cancro in cui il tessuto adiposo si trova anatomicamente a contatto con le cellule tumorali, come il cancro della mammella, ma non è stato ancora studiato nei tumori solidi, come il cancro al pancreas dove il tessuto adiposo viene considerato solo come un fattore di rischio generico. La plasticità del tessuto adiposo e l'esistenza di fenomeni di de-differenziamento potrebbero quindi portare nuova luce nel complesso rapporto tra obesità, tessuto adiposo disfunzionale e aumento nel rischio di cancro (76).

5.2 De-differenziamento degli adipociti in cocoltura con cellule di melanoma

Nel secondo modello sperimentale presentato in questa tesi sono state analizzate le interazioni tra gli adipociti murini 3T3-L1 e le cellule di melanoma umano A375 e le modificazioni che questo cross-talk comporta in entrambi i tipi cellulari.

Al microscopio ottico, dopo colorazione con Oil Red O, gli adipociti 3T3-L1 cocoltivati con cellule A375, sono risultati significativamente ridotti in numero e dimensioni, rispetto alle condizioni di controllo; inoltre, in condizioni di cocoltura, si confermava anche in questo esperimento la comparsa di cellule con morfologia allungata, prolungamenti citoplasmatici e forma fibroblasto-simile, assenti nel controllo. Inoltre, l'espressione genica dei

markers specifici per gli adipociti (GLUT-4, adiponectina e SFRP-5), analizzata mediante RT-PCR, è risultata significativamente inferiore negli adipociti in co-coltura, rispetto agli adipociti di controllo; l'espressione di markers caratteristici dei fibroblasti (α -SMA, MMP-2) e di alcuni geni di riprogrammazione cellulare (c-Myc, Klf4), è invece risultata significativamente maggiore negli adipociti in co-coltura, rispetto agli adipociti di controllo confermando quindi anche in questo caso la presenza di fenomeni di de-differenziazione cellulare degli adipociti. La capacità migratoria delle cellule di melanoma in co-coltura, valutata mediante Scratch Test e Test di Invasione è risultata significativamente maggiore rispetto alle condizioni di controllo; inoltre, la capacità migratoria delle cellule di melanoma in co-coltura con adipociti veniva modulata e ridotta in modo significativo dopo l'aggiunta nel medium di SFRP5, una proteina che inibisce il legame recettoriale di Wnt-5a. Dopo analisi IF e WB è stato osservato inoltre un aumento dell'espressione della β -catenina e di LEF-1 nel nucleo delle cellule di melanoma trattate con medium derivante dalla co-coltura, rispetto alle cellule di melanoma di controllo; infine, dopo analisi con WB, la fosforilazione di Akt nelle cellule di melanoma in co-coltura è risultata significativamente maggiore rispetto alle cellule di controllo.

I risultati ottenuti confermano ed espandono quelli di Dirat et al. (77) in cui adipociti murini cocoltivati con cellule di cancro al seno sia murine che umane esibivano un fenotipo alterato in termini di delipidizzazione e in termini di diminuzione dei markers adipocitari e overespressione delle proteasi; inoltre, in questo studio, è stato dimostrato che cellule murine e umane tumorali cocoltivate con adipociti maturi mostrano maggiori capacità invasive sia in vitro che in vivo, in un sistema di co-coltura bidimensionale.

Nel nostro studio, analizzando gli adipociti in co-coltura, sono state individuate cellule di forma allungata con scarso contenuto lipidico che potrebbero essere fibroblasti cancro associati (CAF).

Ishii et al. definisce le cellule CAFs come la principale fonte di produzione di collagene, direttamente comunicanti con le cellule tumorali e altri tipi di cellule stromali, come le cellule endoteliali e le cellule infiammatorie, importanti nel supportare la progressione tumorale, provenienti da fibroblasti residuali e cellule vascolari muscolari lisce e periciti (78); inoltre, nel lavoro di Tan et al., viene ipotizzato che i CAFs potrebbero originare dagli adipociti cancro associati (CAA) (79). La diversa origine dei CAFs può spiegare la loro variabilità morfologica, fenotipica e funzionale. Diversi marcatori sono stati utilizzati per rilevare i CAF. Questi sono α -

SMA, tenascin-C, “neuron glial antigen” (NG2), “platelet derived growth factor receptor-alpha/beta” (PDGFR-A o B), proteina di attivazione dei fibroblasti (FAP), Thy-1 (CD90), e “podoplanin”, marcatori mesenchimali quali vimentina, fibronectina, collagene di tipo I, “prolyl4-hydroxylase” e FSP-1 / S100A4. Tra questi, fibroblasti positivi per α -SMA sono chiamati miofibroblasti e possono essere considerati un sottotipo di CAF. Tuttavia, questi marcatori non sono specifici per CAF, sono infatti espressi da altri tipi di cellule. Ad esempio, α -SMA è anche espresso in cellule muscolari vascolari, NG2 e PDGFRB si trovano anche in periciti normali. Podoplanin è ben noto come un indicatore di cellule endoteliali linfatiche. Inoltre, molti tipi di cellule stromali normali esprimono anche vimentina, fibronectina, collagene di tipo I, prolyl4-idrossilasi, e FSP-1 / S100A4 pertanto, una combinazione dell’aspetto morfologico e di un marcatore è il metodo più affidabile per individuare i CAFs (78).

La migrazione delle cellule tumorali è necessaria nelle prime fasi della cascata metastatica, quando le cellule tumorali lasciano il tumore primario e accedono al torrente circolatorio e anche quando le cellule maligne infiltrano il parenchima del sito secondario.

Le cellule tumorali hanno una risposta motile a diversi agenti, quali fattori di crescita, componenti della matrice extracellulare e fattori secreti dal tumore stesso (80).

Wnt signaling pathway è coinvolto in vari eventi di differenziazione durante lo sviluppo embrionale e porta alla formazione del tumore quando è attivato in modo aberrante. I ligandi Wnt si legano ai loro recettori sulla superficie cellulare e trasducono segnali attraverso almeno tre percorsi distinti: pathway β -catenin canonico, pathway non canonico “planar cell polarity” (PCP) ed il pathway del calcio. Tra queste cascate intracellulari, il pathway della β -catenina è stato ampiamente studiato, e le anomalie di questo percorso portano alla formazione e alla progressione del tumore.

Nello stato inattivo, quando Wnt non agisce sulla cellula, GSK-3 β fosforila la β -catenina nel suo dominio N-terminale (81); β -catenina così fosforilata è soggetta a ubiquitinazione, con conseguente degradazione da un proteasoma; la β -catenina citoplasmatica è mantenuta ad un basso livello. Nello stato attivo, Wnt si lega al suo recettore sulla superficie cellulare “Frizzled and lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6)”, e la β -catenina non viene più fosforilata da GSK-3 β e quindi non viene più degradata nel complesso Axin e, di conseguenza, si accumula nel citoplasma e trasloca al nucleo dove si lega al fattore di trascrizione T-cell factor (Tcf)/lymphoid enhancer factor (Lef), portando ad una up-

regolazione dei geni target di Wnt/ β -catenin quali c-myc, cyclin D1, c-jun, metalloproteinasi-1 (MMP-1) e MMP-7. E' stato osservato che l'accumulo a livello citoplasmatico della β -catenina è frequente nei tessuti e nelle linee cellulari del carcinoma a cellule squamose orale (SCC); questo suggerisce che la deregolamentazione del pathway β -catenin e la conseguente iperattività può contribuire alla progressione di SCC orale; inoltre, è stato dimostrato che l'attivazione del pathway β -catenina è correlato con la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e alla migrazione e all'invasività delle cellule tumorali.

L'accumulo citoplasmatico di β -catenina può indurre attività trascrizionale mediata da Tcf / Lef, up-regolazione della MMP-7, e induzione del riarrangiamento dell'actina del citoscheletro e redistribuzione dell'E-caderina mediata da membri della famiglia Rho, tutto ciò comporterebbe EMT delle cellule SCC orali che aumenterebbe i livelli di invasione e di migrazione.

Wnt / beta-catenina signaling sembra essere pertanto un potenziale bersaglio molecolare per lo sviluppo di terapie efficaci per molti tipi di cancro (82).

EMT è un programma di sviluppo altamente conservato implicato nella promozione e nella diffusione di cellule maligne di tumori epiteliali primari; durante EMT, le cellule perdono le loro caratteristiche epiteliali, tra cui l'adesione cellulare e la polarità, riorganizzano il loro citoscheletro e acquisiscono una morfologia mesenchimale e la capacità di migrare; uno dei tratti distintivi di EMT è la perdita funzionale della giunzione cellula-cellula mediata da E-caderina. E-caderina è considerata un soppressore dell'invasione tumorale, la sua parziale o totale perdita è stata associata con diffusione metastatica e prognosi infausta per molti tumori solidi.

Durante la progressione del melanoma, melanociti maligni possono essere riprogrammati in cellule mesenchimali, attraverso un processo simile ad EMT, con acquisizione di un fenotipo migratorio.

Esistono diverse evidenze per sostenere un ruolo importante per la proteina chinasi B / AKT nella genesi del melanoma; AKT attivato viene trovato nel 70% dei melanomi umani. I meccanismi che contribuiscono a questo evento includono la delezione di PTEN, amplificazione di Akt3, aberrante signaling dei fattori di crescita e produzione autocrina di osteonectina (SPARC) dalle cellule di melanoma.

Oltre al coinvolgimento di AKT nella sopravvivenza, crescita e pathway metabolici, AKT è coinvolta nella motilità e invasione cellulare, processi prerequisites per la metastasi. E' stato dimostrato che AKT down-regola espressione di E-caderina e promuove la transizione EMT-like e invasività nelle cellule di carcinoma inducendo

SNAIL; AKT contribuisce anche alla regolazione di SLUG / SPARC inducendo cambiamenti EMT-like nel melanoma, enfatizzando il ruolo cruciale di AKT nel controllo dei fattori della famiglia SNAIL e processi EMT tumore associati (83).

E' stato infine dimostrato che β -catenina aumenta la sua attività trascrizionale attraverso il signaling in vari tipi di neoplasie umane. AKT, che viene attivato a valle dal signaling dei recettori del fattore di crescita epidermico, fosforila β -catenin in Ser552 sia in vivo che in vitro. Ciò determina la sua dissociazione dal contatto cellula-cellula e l'accumulo sia nel citosol sia nel nucleo, promuovendo l'invasione e lo sviluppo delle cellule tumorali (81).

6 Bibliografia

- 1) Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 ;115(5):911-9; quiz 920.
- 2) Díez JJ, et al. The role of the novel adipocyte-derived hormone adiponectin in human disease. *Eur J Endocrinol.* 2003 ;148(3):293-300.
- 3) Wronska A, Kmiec Z. Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta Physiol (Oxf).* 2012 ;205(2):194-208.
- 4) Trayhurn P, Wood IS. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr.* 2004 ;92(3):347-55.
- 5) Wozniak SE, Gee LL, Wachtel MS, Frezza EE. Adipose tissue: the new endocrine organ? A review article. *Dig Dis Sci.* 2009 Sep;54(9):1847-56.
- 6) Conde J, Scotece M, Gómez R, López V, Gómez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. Adipokines: biofactors from white adipose tissue. A complex hub among inflammation, metabolism, and immunity. *Biofactors.* 2011 ;37(6):413-20.
- 7) Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 ;89(6):2548-56.

- 8) Ouchi N, Higuchi A, Ohashi K, Oshima Y, Gokce N, Shibata R, Akasaki Y, Shimono A, Walsh K. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science*. 2010 ;329(5990):454-7.
- 9) Cinti S. *The Adipose Organ*. Milan, Italy: Kurtis SRL, 1999.
- 10) Klingenspor M, Fromme T. *Adipose Tissue Biology*. Springer 2011.
- 11) <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/> Obesity and overweight Fact sheet N°311". WHO. 2015.
- 12) Haslam DW, James WP. Obesity. *Lancet*. 2005 ;366(9492):1197-209.
- 13) Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA*. 2003 ;289(2):187-93.
- 14) Temelkova-Kurktschiev T, Stefanov T. Lifestyle and genetics in obesity and type 2 diabetes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2012 ;120(1):1-6.
- 15) Malik VS, Willett WC, Hu FB. Global obesity: trends, risk factors and policy implications. *Nat Rev Endocrinol*. 2013 ;9(1):13-27.
- 16) Hu FB. Sedentary lifestyle and risk of obesity and type 2 diabetes. *Lipids*. 2003 ;38(2):103-8.
- 17) Rey-López JP, Vicente-Rodríguez G, Biosca M, Moreno LA. Sedentary behaviour and obesity development in children and adolescents. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2008 ;18(3):242-51.
- 18) Loos RJ, Bouchard C. FTO: the first gene contributing to common forms of human obesity. *Obes Rev*. 2008 ;9(3):246-50.
- 19) Pigeyre M, Yazdi FT2, Kaur Y2, Meyre D3. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clin Sci (Lond)*. 2016 ;130(12):943-86.
- 20) Imes CC, Burke LE. The Obesity Epidemic: The United States as a Cautionary Tale for the Rest of the World. *Curr Epidemiol Rep*. 2014 ;1(2):82-88.

- 21) Vucenik I, Stains JP. Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 ;1271:37-43.
- 22) Gilbert CA, Slingerland JM. Cytokines, obesity, and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression. *Annu Rev Med.* 2013;64:45-57.
- 23) Hursting SD, Dunlap SM. Obesity, metabolic dysregulation, and cancer: a growing concern and an inflammatory (and microenvironmental) issue. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 ;1271:82-7.
- 24) Castells M, Thibault B, Delord JP, Couderc B. Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death. *Int J Mol Sci.* 2012 ;13(8):9545-71.
- 25) Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci.* 2012 ;125(Pt 23):5591-6.
- 26) Zoico E, Darra E, Rizzatti V, Budui S, Franceschetti G, Mazzali G, Rossi AP, Fantin F, Menegazzi M, Cinti S, Zamboni M. Adipocytes wnt-5a mediated dedifferentiation: a possible target in pancreatic cancer microenvironment. *Oncotarget.* 2016; Doi: 10.18632/oncotarget.7936.
- 27) Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *BiochimBiophysActa.* 2013 ;1831, 1533-41.
- 28) Katoh M, Katoh M WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res.* 2007 ;13(14):4042-5.
- 29) Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell.* 2012 ;149(6):1192-205.
- 30) Zhan T, Rindtorff N, Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene.* 2016. doi: 10.1038/onc.2016.304.
- 31) Willert K, Nusse R. Wnt proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2012 ;4(9):a007864.
- 32) Raimondi S, Lowenfels AB, Morselli-Labate AM, Maisonneuve P, Pezzilli R. Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010 ;24(3):349-58.

- 33) Harris, RE (2013). "Epidemiology of pancreatic cancer". *Epidemiology of Chronic Disease*. Jones & Bartlett. pp. 181–190. ISBN 978-0-7637-8047-0.
- 34) Öberg K, Knigge U, Kwekkeboom D, Perren A; ESMO Guidelines Working Group. Neuroendocrine gastro-entero-pancreatic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2012 ;23 Suppl 7:vii124-30.
- 35) Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2014 ;371(22):2140-1.
- 36) Tobias JS, Hochhauser D (2014). *Cancer and its Management* (7^o ed.). p.297. ISBN 978-1-118-46871-5.
- 37) Types of Pancreas Tumors". The Sol Goldman Pancreas Cancer Research Center. Johns Hopkins Medicine. 2012. Retrieved 18 November 2014.
- 38) Klimstra DS, Modlin IR, Coppola D, Lloyd RV, Suster S. The pathologic classification of neuroendocrine tumors: a review of nomenclature, grading, and staging systems. *Pancreas*. 2010 ;39(6):707-12.
- 39) Burns WR, Edil BH. Neuroendocrine pancreatic tumors: guidelines for management and update. *Curr Treat Options Oncol*. 2012 ;13(1):24-34.
- 40) Hidalgo M. Pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2010 ;362(17):1605-17.
- 41) Ryan DP, Hong TS, Bardeesy N. Pancreatic adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2014 ;371(11):1039-49. doi: 10.1056/NEJMra1404198. Review
- 42) https://en.wikipedia.org/wiki/TNM_staging_system
- 43) Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, Rosenzweig AB, Fleshman JM, Matrisian LM. Projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States. *Cancer Res*. 2014; 74, 2913-21.
- 44) Thomas JK, Kim MS, Balakrishnan L, Nanjappa V, Raju R, Marimuthu A, Radhakrishnan A, Muthusamy B, Khan AA, Sakamuri S, Tankala SG, Singal M, Nair B, Sirdeshmukh R, Chatterjee A, Prasad TS, Maitra A, Gowda H, Hruban RH, Pandey A. Pancreatic Cancer Database: An integrative resource for pancreatic cancer. *Cancer Biol Ther*. 2014; 15, 963-7.

- 45) Kolodecik T, Shugrue C, Ashat M, Thrower EC. Risk factors for pancreatic cancer: underlying mechanisms and potential targets. *Front Physiol.* 2014 ;4:415.
- 46) Bond-Smith G1, Banga N, Hammond TM, Imber CJ. Pancreatic adenocarcinoma. *BMJ.* 2012 ;344:e2476.
- 47) Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet.* 2011 ;378(9791):607-20.
- 48) Greenhalf W, Grocock C, Harcus M, Neoptolemos J. Screening of high-risk families for pancreatic cancer. *Pancreatol.* 2009 ;9(3):215-22.
- 49) Reznik R, Hendifar AE, Tuli R. Genetic determinants and potential therapeutic targets for pancreatic adenocarcinoma. *Front Physiol.* 2014 ;5:87.
- 50) National Cancer Institute. Melanoma Treatment—for health professionals (PDQ®). <http://www.cancer.gov/types/skin/hp/melanoma-treatment-pdq> (2015).
- 51) Broekaert SM, Roy R, Okamoto I, van den Oord J, Bauer J, Garbe C, Barnhill RL, Busam KJ, Cochran AJ, Cook MG, Elder DE, McCarthy SW, Mihm MC, Schadendorf D, Scolyer RA, Spatz A, Bastian BC. Genetic and morphologic features for melanoma classification. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010 ;23(6):763-70.
- 52) Nikolaou V, Stratigos AJ. Emerging trends in the epidemiology of melanoma. *Br J Dermatol.* 2014 ;170(1):11-9.
- 53) Boniol M, Autier P, Boyle P, Gandini S. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2012 ;345:e4757.
- 54) World Cancer Report 2014. World Health Organization. 2014. pp. Chapter 5.14. ISBN 9283204298.
- 55) Aim at melanoma. <https://www.aimatmelanoma.org/about-melanoma/melanoma-stats-facts-and-figures>
- 56) Eggermont AM, Spatz A, Robert C. Cutaneous melanoma. *Lancet.* 2014 ;383(9919):816-27.
- 57) Bishop KD, Olszewski AJ. Epidemiology and survival outcomes of ocular and mucosal melanomas: a population-based analysis. *Int J Cancer.* 2014 ;134(12):2961-71.

- 58) <https://www.melanoma.org/understand-melanoma/diagnosing-melanoma/detection-screening/abc-des-melanoma>
- 59) Fox GN. ABCD-EFG for diagnosis of melanoma. *Clin Exp Dermatol*. 2005 ;30(6):707.
- 60) Regad T. Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression. *Cell Mol Life Sci*. 2013 ;70(21):4055-65.
- 61) Clark Jr WH, Elder DE, Guerry Dt, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum. Pathol*. 1984 ;15, 1147–1165.
- 62) Takata M, Murata H, Saida T. Molecular pathogenesis of malignant melanoma: a different perspective from the studies of melanocytic nevus and acral melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010 ;23(1):64-71.
- 63) Hegde UP, Chakraborty N, Kerr P, Grant-Kels JM. Melanoma in the elderly patient: relevance of the aging immune system. *Clin Dermatol*. 2009 ;27(6):537-44.
- 64) Macdonald JB, Dueck AC, Gray RJ, Wasif N, Swanson DL, Sekulic A, Pockaj BA. Malignant melanoma in the elderly: different regional disease and poorer prognosis. *J Cancer*. 2011 ;2:538-43.
- 65) Wellbrock C. Melanoma and the Microenvironment--Age Matters. *N Engl J Med*. 2016 ;375(7):696-8.
- 66) Kaur A, Webster MR, Marchbank K, Behera R, Ndoye A, Kugel CH 3rd, Dang VM, Appleton J, O'Connell MP, Cheng P, Valiga AA, Morissette R, McDonnell NB, Ferrucci L, Kossenkov AV, Meeth K, Tang HY, Yin X, Wood WH 3rd, Lehrmann E, Becker KG, Flaherty KT, Frederick DT, Wargo JA, Cooper ZA, Tetzlaff MT, Hudgens C, Aird KM, Zhang R, Xu X, Liu Q, Bartlett E, Karakousis G, Eroglu Z, Lo RS, Chan M, Menzies AM, Long GV, Johnson DB, Sosman J, Schilling B, Schadendorf D, Speicher DW, Bosenberg M, Ribas A, Weeraratna AT. sFRP2 in the aged microenvironment drives melanoma metastasis and therapy resistance. *Nature*. 2016 ;532(7598):250-4.
- 67) Stefančíková L1, Porcel E1, Eustache P1, Li S1, Salado D1, Marco S2, Guerquin-Kern JL2, Réfrégiers M3, Tillement O4, Lux F4, Lacombe S1. Cell localisation of gadolinium-based nanoparticles and related radiosensitising efficacy in glioblastoma cells. *Cancer Nanotechnol*. 2014;5(1):6.

- 68) Da Forno PD, Pringle Jh, Hutchinson P, Osborn J, Huang Q, Potter L, Hancox Ra, Fletcher A, Saldanha Gs. WNT5A Expression Increases during Melanoma Progression and Correlates with Outcome. *Clinical Cancer Research*, 2008 , Vol.14(18), pp.5825-5832.
- 69) Weeraratna AT, Jiang Y, Hostetter G, Rosenblatt K, Duray P, Bittner M, Trent JM. Wnt5a signaling directly affects cell motility and invasion of metastatic melanoma. *Cancer Cell*, 2002, Vol.1(3), pp.279-288.
- 70) Cinti S, Enzi G, Cigolini M, Bosello O. Ultrastructural features of cultured mature adipocyte precursors from adipose tissue in multiple symmetric lipomatosis. *Ultrastruct Pathol*. 1983; 5:145–52.
- 71) Erez N, Glanz S, Raz Y, Avivi C, Barshack I. Cancer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 437:397–402.
- 72) Bochet L, Lehuede C, Dauvillier S, Wang YY, Dirat B, Laurent V, Dray C, Guet R, Maridonneau-Parini I, Le Gonidec S, Couderc B, Escourrou G, Valet P. Adipocytederived fibroblasts promote tumor progression and contribute to the desmoplastic reaction in breast cancer. *Cancer Res*. 2013; 73:5657–68.
- 73) Guerrero J, Tobar N, Cáceres M, Espinoza L, Escobar P, Dotor J, Smith PC, Martínez J. Soluble factors derived from tumor mammary cell lines induce a stromal mammary adipose reversion in human and mice adipose cells. Possible role of TGF- β 1 and TNF- α . *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 119:497–508.
- 74) Catalán V, Gomez-Ambrosi J, Rodriguez A, Pérez-Hernández AI, Gurbindo J, Ramírez B, Méndez-Giménez L, Rotellar F, Valentí V, Moncada R, Martí P, Sola I, Silva C. Activation of Noncanonical Wnt Signaling Through WNT5a in Visceral Adipose Tissue of Obese Subjects Is Related to Inflammation. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99:E1407–17.
- 75) Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8:387–98.
- 76) Zoico E., Darra E., Rizzatti V., Budui S., Franceschetti G., Mazzali G., Rossi A.P., Fantin F., Menegazzi M., Cinti S., Zamboni M., 2016. Adipocytes wnt-5a mediated dedifferentiation: a possible target in pancreatic cancer microenvironment. *Oncotarget*. Doi: 10.18632/oncotarget.7936.
- 77) Dirat B, Bochet L, Dabek M, Daviaud D, Dauvillier S, Majed B, Wang YY, Meulle A, Salles B, Le Gonidec S, Garrido I, Escourrou G, Valet P, Muller C. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*. 2011 ;71(7):2455-65.

- 78) Ishii G, Ochiai A, Neri S. Phenotypic and functional heterogeneity of cancer-associated fibroblast within the tumor microenvironment. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016 ;99(Pt B):186-96.
- 79) Tan J., Buache E., Chenard M.P., Dali-Youcef N., Rio M.C., 2011. Adipocyte is a non-trivial, dynamic partner of breast cancer cells. *Int J Dev Biol.* 55, 851-9.
- 80) Barni MV, Carlini MJ, Cafferata EG, Puricelli L, Moreno S. Carnosic acid inhibits the proliferation and migration capacity of human colorectal cancer cells. *Oncol Rep.* 2012 (4):1041-8.
- 81) Fang D, Hawke D, Zheng Y, Xia Y, Meisenhelder J, Nika H, Mills GB, Kobayashi R, Hunter T, Lu Z. Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2007 ;282(15):11221-9.
- 82) Iwai S, Yonekawa A, Harada C, Hamada M, Katagiri W, Nakazawa M, Yura Y. Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *Int J Oncol.* 2010 ;37(5):1095-103.
- 83) Fenouille N, Tichet M, Dufies M, Pottier A, Mogha A, Soo JK, Rocchi S, Mallavialle A, Galibert MD, Khammari A, Lacour JP, Ballotti R, Deckert M, Tartare-Deckert S. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS One.* 2012;7(7): e40378.