

Università degli Studi di Firenze

Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali

Direttore: Prof. Massimo Olivotto

Scuola di Dottorato di Ricerca in Oncologia Sperimentale e Clinica

XXI Ciclo (MED/04)

Tesi di Dottorato di Ricerca

IL MICROAMBIENTE TUMORALE

NEI MECCANISMI DI PROGRESSIONE NEOPLASTICA

Candidato: Dott.ssa Chiara Marconi

Coordinatore del Corso di Dottorato:

Prof. Massimo Olivotto

Responsabile del progetto di ricerca:

Prof. Lido Calorini

18 Dicembre 2008

INDICE

Riassunto.....	pag. 1
Introduzione.....	pag. 5
Scopo della ricerca.....	pag. 18
Materiali e Metodi.....	pag. 20
Risultati.....	pag. 33
Discussione.....	pag. 56
Conclusioni.....	pag. 69
Bibliografia.....	pag. 70
Ringraziamenti.....	pag. 86

RIASSUNTO

L'effetto più devastante della crescita tumorale è rappresentato dalla diffusione metastatica negli organi secondari. La cellula neoplastica che si distacca dal tumore di origine incontra una serie di ostacoli che spesso la conducono a morte prima di arrivare a colonizzare organi distanti dal tumore primitivo. Le cellule che riescono a superare con successo tutte le tappe previste dalla cosiddetta "cascata metastatica" appartengono ad un gruppo limitato di cellule capaci di esprimere un'ampia serie di atteggiamenti fenotipici, come la capacità di attraversare le membrane basali, liberare fattori angiogenetici, sopravvivere nel circolo sanguigno e/o linfatico e proliferare in ambienti particolarmente sfavorevoli. Le cellule tumorali possono acquisire queste nuove e cruciali proprietà in modo spontaneo grazie all'instabilità genetica che le caratterizza. Tuttavia, studi più recenti, hanno contribuito a dimostrare che anche le interazioni che le cellule tumorali stabiliscono con gli elementi dell'ospite, presenti nel microambiente tumorale, partecipano a favorire nelle cellule tumorali la comparsa di proprietà biologiche caratteristiche del fenotipo metastatico. Questi studi ripropongono la teoria del *seme* e del *suolo*, formulata da Paget (1889), secondo la quale le cellule neoplastiche (il *seme*) rilasciate dal tumore primitivo trovano condizioni favorevoli per la loro crescita solo in determinati organi (il *suolo*). Tra le cellule dell'ospite, che hanno assunto particolare rilevanza nelle interazioni ospite/tumore è possibile ricordare i macrofagi, definiti TAMs (Tumor-Associated Macrophages). Il ruolo biologico dei TAMs è stato oggetto di numerosi studi e, a tutt'oggi, si ritiene che in determinate condizioni di attivazione possono promuovere la crescita tumorale e la diffusione metastatica. Nel laboratorio presso il quale ho svolto la mia attività di ricerca è stato osservato che macrofagi attivati *in vivo* con *Corynebacterium parvum*, BCG o *Lysteria monocitogenes* secernono un'attività capace di stimolare il potenziale metastatico in cellule di melanoma murino, e tale attività è ascrivibile all'azione combinata di due citochine infiammatorie□. Questa osservazione ha contribuito a sostenere l'ipotesi che le cellule dell'ospite ed i loro prodotti di secrezione possono favorire la progressione tumorale. Una ulteriore caratteristica costante del microambiente tumorale è l'ipossia. E', infatti, molto probabile che durante l'espansione della massa tumorale la diffusione dell'ossigeno e dei nutrienti, sia dai vasi pre-esistenti sia dai vasi neoformati, risulti

insufficiente e possa dar luogo ad aree ipossiche. Il fattore di trascrizione HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1) espresso dalle cellule tumorali ipossiche è responsabile dell'induzione di una serie di geni coinvolti in attività utili alla cellula neoplastica, come la neoangiogenesi ed il metabolismo anaerobio.

Il programma di ricerca oggetto di questa tesi di Dottorato, si è proposto di verificare il ruolo di alcuni fattori umorali e cellulari dell'ospite e dell'ipossia nei meccanismi di progressione neoplastica e di disseminazione metastatica.

In particolare, la ricerca si è proposta i seguenti obiettivi:

- 1) valutare nei TAMs l'espressione di iNOS/Arginasi, COX-2 e di alcune attività proteasiche;
- 2) indagare il ruolo di alcune citochine infiammatorie e dei loro recettori nello sviluppo di un fenotipo metastatico;
- 3) esaminare l'effetto dell'ipossia sulla espressione dei fattori di crescita VEGF-A e VEGF-C e sulla espressione di proteasi nei TAMs e nelle cellule tumorali.

Le interazioni tra macrofagi e cellule tumorali sono state indagate utilizzando un modello sperimentale *in vitro* che permetteva di riprodurre in condizioni ben controllate le relazioni che le cellule neoplastiche stabiliscono con i macrofagi in una massa tumorale. A questo proposito, macrofagi peritoneali murini attivati *in vivo* con tioglicollato, un agente capace di indurre uno stato di attivazione definito "infiammatorio", sono stati co-coltivati con cellule F10-M3 derivate da un melanoma spontaneo del topo. Le cellule di melanoma F10-M3 rappresentano un modello di cellule tumorali particolarmente adatto alle indagini previste dall'argomento di ricerca, in quanto capaci di attraversare membrane di Matrigel e indurre metastasi polmonari in animali singenici.

Questo modello sperimentale ha consentito di accertare che macrofagi infiammatori esposti al contatto con cellule F10-M3 esprimevano maggiori livelli sia di iNOS sia di COX-2 rispetto a popolazioni macrofagiche cresciute in assenza di cellule tumorali. Studi paralleli condotti, con la tecnica della immunisto chimica, su sezioni istologiche di melanomi dell'uomo a diverso grado di malignità hanno mostrato che macrofagi presenti sul fronte invasivo di melanomi a crescita radiale esprimevano livelli particolarmente elevati di iNOS e COX-2. Queste osservazioni indicano che la cellula tumorale è in grado di modificare alcune attività macrofagiche, in particolare, quando

può contrarre rapporti stretti con i macrofagi stessi. Sia l'attività iNOS sia l'attività COX-2, rappresentano una fonte di mediatori, NO e prostaglandine, che grande rilevanza possono assumere nel destino di una cellula tumorale. E' stato, inoltre, osservato che le cellule tumorali possono indurre nei macrofagi con cui vengono messe in contatto attività metalloproteasiche utilizzabili nei processi di invasione attraverso membrane basali ricostituite con Matrigel.

L'interesse per il ruolo delle citochine infiammatorie ed i loro recettori espressi sulle cellule tumorali ha consentito di accertare che: a) il trattamento con IFN γ e IL-1 β , IL-6 o TNF- α stimola il potenziale metastatico delle cellule di melanoma F10-M3; b) il trattamento con solo IFN- γ , anche se in dosi elevate, è altrettanto capace di promuovere il potenziale metastatico delle cellule F10-M3, che si associa ad un aumento dell'espressione dei recettori per le citochine infiammatorie IL-1 β , IL-6, TNF- α ; c) la riduzione dell'espressione di recettori per citochine infiammatorie nelle cellule F10-M3, si associa ad una riduzione della capacità di indurre metastasi epatiche. Si può, quindi, ritenere che la disponibilità di citochine infiammatorie nel microambiente tumorale, sia secrete dalle cellule dell'ospite sia secrete dalle stesse cellule tumorali, e l'espressione dei loro recettori sulle cellule tumorali partecipino ai meccanismi coinvolti nella diffusione metastatica.

L'attenzione, infine, che è stata rivolta al ruolo dell'ipossia nei meccanismi di progressione tumorale, ha condotto alle seguenti osservazioni: a) mentre, come è noto, l'espressione del VEGF-A, sia nei macrofagi sia nelle cellule tumorali, è sotto il controllo del fattore di trascrizione HIF-1 α , l'espressione del VEGF-C in entrambi i tipi cellulari è HIF-1 α -indipendente; b) l'ipossia promuove una maggiore invasività attraverso Matrigel in cellule isolate da una lesione metastatica di un melanoma spontaneo dell'uomo, ma non in cellule derivate da una lesione primitiva. L'espressione di attività metalloproteasiche, che è stato trovato essere alla base della maggiore invasività delle cellule di melanoma coltivate in ipossia, è verosimilmente da attribuire ad un meccanismo autocrino che vede coinvolte alcune citochine ed i loro recettori. c) Le cellule di melanoma del topo F10-M3 promuovono nei macrofagi, con cui venivano coltivate, l'espressione del VEGF-A e C in normossia, e del solo VEGF-C in ipossia.

In conclusione, nella storia naturale dei tumori, le risposte dei tessuti dell'ospite possono rappresentare momenti decisivi per il destino delle cellule tumorali, e la ripresa di malattia di una metastasi silente può costituirne una prova.

INTRODUZIONE

Le metastasi rappresentano la riproduzione di un tumore in organi senza rapporto di continuità con la sede del tumore primitivo e costituiscono il più devastante aspetto della crescita tumorale. Il processo che porta alla formazione delle metastasi si sviluppa in maniera dinamica ed è costituito da una sequenza di tappe correlate tra loro, nota da tempo come “cascata metastatica” (Poste e Fidler, 1980; Fidler e Kripke, 1977). Le cellule neoplastiche perdono connessione con il tumore primitivo e grazie alle loro capacità invasive penetrano nel torrente circolatorio, linfatico ed ematico. Attraverso la circolazione, le cellule tumorali raggiungono sedi distanti da quella di origine e, una volta fuoriuscite dai vasi, si stabiliscono nel tessuto degli organi secondari dove possono dare origine alla formazione di noduli metastatici o rimanere quiescenti per periodi indeterminati (metastasi silenti) (Liotta e Khon, 2001).

Un contributo fondamentale alla comprensione della biologia del processo metastatico è stato offerto negli anni '70 dalle ricerche di Fidler. I risultati di queste ricerche indicavano che nel contesto del tumore primitivo erano presenti sottopopolazioni cellulari diverse, ognuna con proprietà fenotipiche peculiari, compresa la capacità di riprodurre metastasi in organi secondari (Fidler e Kripke, 1977). Lo studio di varianti di cellule metastatiche isolate mediante procedimenti di selezione *in vivo* e *in vitro* ha permesso di individuare alcune delle proprietà biologiche e molecolari che conferiscono alle cellule tumorali un fenotipo metastatico (Fidler, 1978).

Le principali caratteristiche fenotipiche che le cellule tumorali devono acquisire per portare a termine tutte le fasi della cascata metastatica sono la capacità invasiva, legata alla produzione e secrezione di enzimi proteasici (Mignatti e Rifkin, 1993), la secrezione di fattori angiogenetici (Folkman, 1990), la capacità di sopravvivere nel circolo sanguigno e/o linfatico e la capacità di proliferare negli organi secondari (Fidler e Tamadge, 1986; Talmadge e Fidler, 1982; Fidler e Kripke, 1977; Fidler, 1973).

Nel corso della progressione neoplastica, la continua diversificazione della popolazione tumorale, responsabile dell'insorgenza di sottopopolazioni metastatiche, è stata attribuita all'instabilità genetica che caratterizza le cellule tumorali (Nowell, 1986). Più recentemente è stato dimostrato che, nonostante l'importanza che le modificazioni genetiche rivestono nell'espressione del fenotipo metastatico, vari fattori umorali e

cellulari dell'ospite, sono in grado di promuovere caratteristiche biologiche indispensabili per il processo di diffusione metastatica. A questo proposito, già nel 1889 Stephen Paget formulò la teoria del “seme” e del “suolo”, secondo la quale le cellule neoplastiche (il *seme*) rilasciate dal tumore primitivo trovavano condizioni favorevoli per la loro crescita solo in determinati organi (il *suolo*) (Paget, 1889).

In questo scenario, risulta decisivo il ruolo dell'ospite nel selezionare e promuovere la crescita di cellule tumorali dotate di caratteristiche indispensabili per il superamento delle varie fasi della cascata metastatica (Nicolson, 1987). La capacità delle cellule tumorali di rispondere all'influenza dei vari fattori dell'ospite è stata, recentemente, definita con il termine “plasticità tumorale” (Hsu *et al.*, 2002).

I fattori dell'ospite implicati nello sviluppo del fenotipo metastatico sono molteplici e possono essere classificati in fattori sistemici e fattori locali (Tavola I).

Tra i fattori *sistemici* è possibile annoverare le condizioni nutrizionali dell'ospite. In particolare, è stato riscontrato che una dieta ricca di acido linoleico promuove la formazione di metastasi spontanee in animali portatori di carcinomi mammari di origine murina (Katz e Boylan, 1989; Hubbard e Erikson, 1987) e umana (Rose e Connolly, 1989). Inoltre, l'osservazione che in animali alimentati con una dieta povera in acidi grassi essenziali è presente una maggiore resistenza a sviluppare metastasi spontanee (Calorini e Ruggieri, 1992), suggerisce che livelli fisiologici di acidi grassi essenziali nei tessuti dell'ospite sono indispensabili per la crescita metastatica. Più recentemente, è stato dimostrato che un regime alimentare ricco di acidi grassi polinsaturi della serie n-3, riduce la progressione di carcinomi mammari e prostatici (Larsson *et al.*, 2004) ed il potenziale metastatico di cellule di melanoma inoculate in animali singenici (Mannini *et al.*, 2008).

Lo stato neuro-endocrino dell'ospite è un altro importante fattore di natura sistemica che influenza la disseminazione metastatica. Stati di “stress” temporanei, indotti da shock elettrico o dal disorientamento spaziale, promuovono la diffusione metastatica in animali portatori di carcinoma polmonare di Lewis e il trattamento con farmaci inibitori sul sistema vegetativo ed endocrino riducono questo effetto (Giraldi *et al.*, 1992). Inoltre, lo stress chirurgico, che spesso si associa ad una riduzione della competenza immunitaria specifica (Cochran *et al.*, 1972) e dell'immunità naturale (Zoller *et al.*, 1989), favorisce la diffusione metastatica.

La sorveglianza immunitaria costituisce un efficace strumento di controllo della crescita e della diffusione tumorale; tuttavia certe condizioni dello stato immunitario sembrano favorire il processo metastatico (Fidler, 1974).

Tra i fattori *locali* in grado di favorire la disseminazione metastatica di cellule tumorali occorre ricordare innanzitutto il danno tissutale ed i processi flogistico-riparativi (Fisher *et al.*, 1967). Già nel 1959, era stato dimostrato che l'inoculo di un numero limitato di cellule tumorali nel circolo venoso dava luogo a metastasi epatiche solo in animali sottoposti a lesioni epatiche (Fisher e Fisher, 1959). Ulteriori studi hanno dimostrato che qualunque area corporea danneggiata da agenti chimici o meccanici favoriva la crescita di metastasi neoplastiche (Murthy *et al.*, 1995; Ammirati *et al.*, 1989; Fisher *et al.*, 1967). Nella zona di danno si instaurano fenomeni flogistico-riparativi che comportano la liberazione di vari mediatori, citochine infiammatorie e chemochine, che favoriscono il richiamo delle cellule neoplastiche dalla microcircolazione, il loro attecchimento nell'organo secondario, la neoangiogenesi e inducono nelle cellule neoplastiche una riduzione delle strutture antigeniche. Quest'ultima modificazione permette alle cellule neoplastiche di sfuggire ai meccanismi di difesa dell'ospite (Coussens e Werb, 2002).

Anche il processo riparativo sembra stimolare la crescita e l'invasività tumorale. Dingemans e collaboratori (1993) hanno infatti osservato che la crescita delle cellule di un adenocarcinoma del colon di ratto veniva stimolata dalla presenza nella sede di inoculo di un tessuto di granulazione ricco di miofibroblasti e cellule infiammatorie.

Tra i fattori locali che influenzano la disseminazione metastatica in organi specifici devono essere ricordate le caratteristiche biologiche della sede di crescita del tumore primitivo e quelle del microambiente degli organi secondari. Cellule di carcinoma del colon murino danno metastasi se trapiantate nella sottomucosa del ceco (Nakajima *et al.*, 1990) e non danno metastasi se trapiantate nel tessuto sottocutaneo o nella sottomucosa di altri distretti intestinali (Tan *et al.*, 1977). La colonizzazione di organi secondari ha luogo solo nel caso in cui si realizzano condizioni adeguate per la "ripresa" della crescita e della progressione neoplastica (Radinsky, 1995; Schirmacher, 1985). A questo proposito, si ritiene che l'incapacità di promuovere il processo neoangiogenetico, un controllo immunologico efficace e la non disponibilità di specifici

fattori di crescita nel nuovo microambiente, siano le condizioni microambientali responsabili delle “metastasi silenziose” (Wheelock *et al.*, 1981).

Una particolare attenzione è stata rivolta alle interazioni che le cellule tumorali stabiliscono con i vari tipi cellulari dell'ospite come le piastrine, i linfociti, i leucociti, i mastociti, i fibroblasti e i macrofagi. In condizioni opportune tutte queste cellule sono in grado di promuovere la diffusione metastatica.

Le piastrine liberano mediatori lipidici che agiscono sugli endoteli vascolari favorendo la fuoriuscita delle cellule tumorali dal microcircolo (Honn *et al.*, 1994). La partecipazione delle piastrine al processo metastatico è sostenuta, inoltre, dal fatto che l'uso di anticorpi contro le piastrine, o un trattamento con prostaciclina, un potente antiaggregante piastrinico, riducono la capacità di alcune linee tumorali di riprodurre metastasi sperimentali (Gasic *et al.*, 1968). Altri studi mostrano che le piastrine sono in grado di inibire l'attività delle cellule *Natural Killer* (NK), che rappresentano uno dei maggiori effettori della risposta antitumorale dell'ospite (Nieswandt *et al.*, 1999). Inoltre, le piastrine promuovono l'adesione delle cellule neoplastiche agli endoteli vascolari, il loro ingresso negli organi secondari (Karparkin e Pearlestein, 1981) e la neoangiogenesi (Triakha *et al.*, 2002).

Per quanto concerne l'interazione tra cellule tumorali e linfociti nella diffusione metastatica, Fidler (1974) ha mostrato che la capacità di riprodurre metastasi sperimentali è stimolata quando le cellule tumorali sono inoculate insieme ad un limitato numero di linfociti, mentre è inibita quando le cellule tumorali sono inoculate con un numero elevato di linfociti. L'effetto della interazione delle cellule tumorali con i leucociti è stata studiata in modo particolare da Welch, il quale ha dimostrato che i leucociti polimorfonucleati raccolti da animali portatori di tumore, favoriscono l'invasività *in vitro* delle cellule tumorali e la diffusione metastatica (Welch *et al.*, 1989).

Mediatori biologicamente attivi secreti da mastociti favoriscono l'insorgenza di un fenotipo invasivo nelle cellule neoplastiche (Dabbous *et al.*, 1995). Un effetto analogo può essere indotto dall'attività dei miofibroblasti associati al tumore che sono presenti nella gran parte dei tumori di origine epiteliale e sono in grado di promuovere i meccanismi di invasività e la proliferazione delle cellule tumorali (Orimo *et al.*, 2005; Powell *et al.*, 1999).

Di particolare interesse sono le interazioni che le cellule neoplastiche stabiliscono con i macrofagi dell'infiltrato infiammatorio del microambiente tumorale. La presenza dei macrofagi, sebbene variabile a seconda dell'istotipo del tumore e delle fasi di crescita, risulta una caratteristica costante tanto da giustificare la definizione di "Macrofagi Associati al Tumore".

Macrofagi Associati al Tumore

La maggior parte dei tumori, soprattutto nelle loro fasi precoci, sono caratterizzati dalla presenza di un contenuto particolarmente elevato di macrofagi definiti TAMs (Tumor-Associated Macrophages).

I TAMs originano da popolazioni di macrofagi residenti e da monociti migrati nella sede tumorale in seguito al rilascio di fattori chemiotattici da parte delle stesse cellule tumorali (Mantovani *et al.*, 1992). Il ruolo biologico dei macrofagi associati al tumore è stato oggetto di numerosi studi, in particolare per il significato prognostico da attribuire alla loro presenza nel contesto della massa tumorale (van Netten *et al.*, 1993). Se da una parte, numerosi studi hanno evidenziato un'attività tumoricida dei TAMs (Whitworth *et al.*, 1990; Fidler e Schroit, 1988; Eccles e Alexander, 1974), dall'altra vi sono numerose prove che i TAMs promuovono la crescita delle cellule neoplastiche (Kadhim e Rees, 1984). L'uso di vari modelli sperimentali, ha consentito di dimostrare che lo sviluppo di alcuni tumori dipende dal numero di TAMs presenti nel microambiente tumorale e dal loro stato di attivazione (Huget *et al.*, 1978). Altri autori hanno dimostrato che i macrofagi, in determinate fasi di attivazione, inducono una modificazione delle proprietà metastatiche di alcuni tipi di cellule tumorali (Mashiba e Matsunaga, 1986; Gabizon *et al.*, 1980). A sostegno del ruolo promuovente dei macrofagi nello sviluppo metastatico è stato osservato che la crescita di cellule tumorali su monostrati di macrofagi favorisce le loro proprietà invasive sia *in vivo* sia *in vitro* (Mukai *et al.*, 1987). I macrofagi, che costituiscono la componente principale dell'infiltrato infiammatorio presente in una massa tumorale (Pollard, 2004), sono indotti a secernere mediatori bioattivi (Liotta e Khon, 2001) che stimolano l'invasività delle cellule tumorali (Mantovani *et al.*, 2006; Normann, 1985). Tra i vari mediatori infiammatori prodotti dai TAMs capaci di influenzare varie risposte biologiche

coinvolte nella progressione tumorale (reazioni immunitarie, infiammatorie, l'emostasi e l'angiogenesi) è possibile trovare una isoforma inducibile di COX particolarmente espressa in vari tipi di tumore, la ciclo-ossigenasi COX-2 (Denkert *et al.*, 2004; Fosslie, 2000; Wolff *et al.*, 1998).

L'apparente contrasto che caratterizza il comportamento dei macrofagi nella diffusione metastatica potrebbe trovare una spiegazione in base alle diversità degli stati di differenziazione che il macrofago acquisisce, a seconda delle particolari condizioni ambientali, e a cui si associano specifiche proprietà biologiche compresa l'attività tumoricida. L'ipotesi della "bilancia macrofagica" proposta da Mantovani nel 1992 (Tavola II) suggerisce che la promozione o la restrizione della crescita e della diffusione di un tumore dipendono dalla prevalenza di alcune funzioni macrofagiche piuttosto che di altre (Mantovani *et al.*, 1992). Il metabolismo della L-arginina nei macrofagi è un buon esempio del diverso comportamento che i macrofagi possono presentare nei confronti delle cellule tumorali (Boutard *et al.*, 1995; Mills *et al.*, 1992). I macrofagi utilizzano la L-arginina per sintetizzare ossido nitrico (NO) mediante l'enzima ossido nitrico sintetasi di tipo inducibile (iNOS), o per produrre L-ornitina attraverso l'attività arginasi. Mentre l'NO può contribuire all'attività tumoricida macrofagica, le poliamine derivate dalla L-ornitina rappresentano nutrienti essenziali per la proliferazione delle cellule tumorali (Auvinen *et al.*, 1992). Questa osservazione indica che stimolare nei macrofagi l'espressione di iNOS o arginasi può risultare critico per la progressione tumorale (Chang *et al.*, 2001).

Nel laboratorio presso il quale ho svolto la mia attività di ricerca, è stato sviluppato un modello sperimentale basato sulla coltura di cellule tumorali su monostrati di macrofagi peritoneali murini attivati *in vivo* con vari stimolatori (Tavola III). Questo protocollo sperimentale ha consentito di osservare che il potenziale di colonizzazione polmonare delle cellule di melanoma B16-F10 (Fidler, 1973) veniva stimolato dalla coltura di queste cellule su monostrati di macrofagi attivati da *Corynebacterium parvum*, BCG o *Lysteria monocitogenes*, ma non su monostrati di macrofagi residenti o attivati con tioglicollato (Cecconi *et al.*, 1997). L'esposizione all'attività pro-metastatica secreta dai macrofagi attivati da *Corynebacterium parvum*, BCG, *Lysteria monocitogenes*, induce nelle cellule B16-F10 alcune caratteristiche biologiche tipiche di un fenotipo metastatico, quali l'aumentata adesività agli endoteli

vascolari, una maggiore capacità invasiva attraverso substrati rivestiti di Matrigel e una maggiore espressione degli antigeni MHC di classe I (Calorini *et al.*, 1999). L'attività prometastatica di origine macrofagica è stato osservato dipendere dall'azione combinata dell'Interferone gamma (IFN- γ) e del Fattore di Necrosi Tumorale alfa (TNF- α). L'uso di anticorpi monoclonali specifici ha permesso di verificare che l'attività del TNF- α è subordinata a quella dell'IFN- γ (Calorini *et al.*, 2002), in analogia con quanto accade nelle cellule infiammatorie stimulate dalle stesse citochine (Gordon *et al.*, 2005). Questi risultati dimostrano che i macrofagi di un ben definito stato di attivazione producono fattori capaci di promuovere il potenziale metastatico delle cellule tumorali (Fig. I).

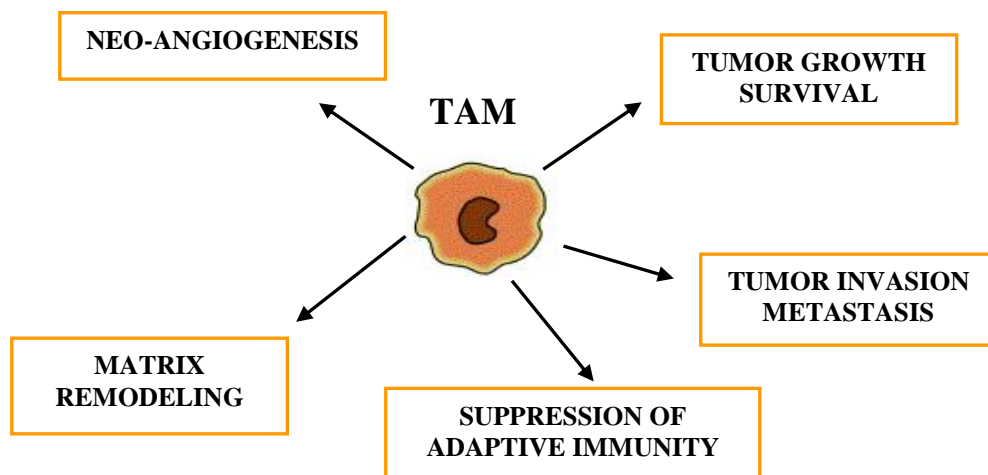


Figura I. I TAMs (Tumor-Associated Macrophages) come fattori cellulari dell'ospite in grado di stimolare la progressione neoplastica.

Citochine infiammatorie

Numerosi studi *in vivo* ed *in vitro* indicano che cellule neoplastiche rilasciano nel microambiente tumorale una grande varietà di fattori di crescita e di citochine infiammatorie cruciali sia per la progressione neoplastica sia per l'attivazione di cellule infiammatorie dell'ospite (Balkwill, 2006; Robinson e Coussen, 2005; Dranoff, 2004). La secrezione di sostanze biologicamente attive da parte delle cellule tumorali rappresenta un meccanismo attraverso il quale alcuni tipi cellulari dell'ospite possono

essere stimolati a produrre mediatori di particolare importanza per la loro progressione. Ricorderò, a questo proposito, enzimi proteolitici (MMP, uPA), fattori angiogenetici e linfoangiogenetici (VEGF-A, -C, -D) e fattori coinvolti nella sopravvivenza e crescita delle cellule tumorali (Lázár-Molnár *et al.*, 2000; Shih e Herlyn, 1993) (Fig. II).

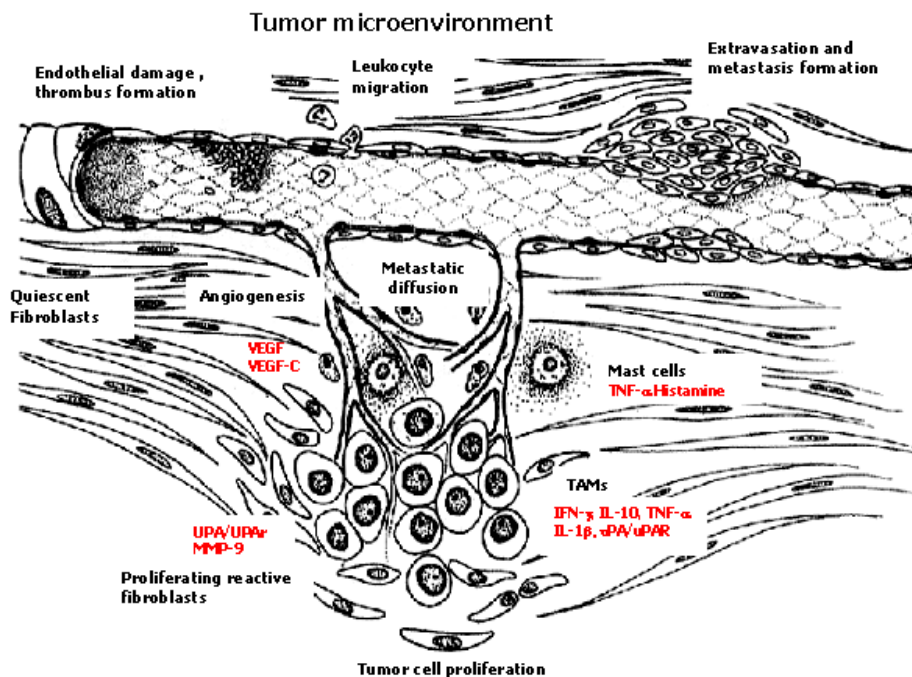


Figura II. Le citochine infiammatorie ed i mediatori di varia natura secreti nel microambiente tumorale

Il rilascio di citochine da parte di cellule tumorali e di cellule dell'ospite stimulate dalle stesse cellule tumorali induce un aumento del potenziale metastatico e partecipa alla promozione della cachessia dell'ospite (Tisdale, 2005).

In particolare, l'importanza del TNF- α per la crescita e la diffusione metastatica emerge dalle osservazioni di Balkwill e Mantovani (2001) e Rosen *et al.* (1991). Questi autori hanno dimostrato che il TNF- α è in grado di indurre l'angiogenesi e il rimodellamento tissutale necessari per la crescita del tumore. Inoltre, Moore *et al.* (1999) hanno osservato che animali knock-out (KO) per il gene che codifica per il TNF- α non sviluppano carcinomi della pelle. Il TNF- α induce in cellule di melanoma murino B16 la produzione di MMP-9, effetto che viene potenziato dalla co-stimolazione con

IFN- γ (Bianchini *et al.*, 2006). La co-stimolazione conferisce alle cellule B16 un fenotipo invasivo caratterizzato da un aumento di produzione di MMP-9, uPA, uPAR.

L'IL-1 è un altro fattore umorale coinvolto nella progressione neoplastica. Topi knock-out per l'IL-1 β e l'IL-1 α inoculati con cellule di melanoma murino B16-F10 mostrano una riduzione delle dimensioni del tumore rispetto a topi wild type, una minore formazione di microvasi all'interno di spugne di Matrigel introdotte per via sottocutanea e una maggiore sopravvivenza (Voronov *et al.*, 2003). Inoltre, la stimolazione di cellule di carcinoma polmonare umano con IL-1 β stimola l'espressione di COX-2, che è responsabile dell'accumulo del fattore di trascrizione Hypoxia Inducible Factor-1 α (HIF-1 α). HIF-1 α è responsabile dell'innescamento di una serie di attività biologiche caratteristiche del fenotipo metastatico delle cellule tumorali (Semenza, 2002). Loffek e collaboratori (2005) hanno dimostrato che l'IL-1 α rilasciata da cellule di melanoma umano induce l'espressione di enzimi coinvolti nell'invasività locale nei fibroblasti associati al tumore. Inoltre, il trattamento con IL-1 di cellule derivate da un mieloma multiplo dell'uomo stimola la produzione di IL-6 che promuove la crescita e la farmaco-resistenza nelle stesse cellule (Balkwill e Mantovani, 2001). Di particolare importanza è l'osservazione che il trattamento con l'antagonista del recettore per l'IL-1 determina una significativa riduzione dello sviluppo metastatico di melanomi murini (Balkwill e Mantovani, 2001; Vidal-Vanaclocha *et al.*, 1994).

La citochina IL-6 è stata osservata essere capace di inibire la proliferazione di cellule di melanomi iniziali (Sun *et al.*, 1992) e stimolare la crescita di tumori avanzati (Lázár-Molnár *et al.*, 2000). Alti livelli di IL-6 sono stati riscontrati nel siero di pazienti con carcinoma della mammella o di altri tipi di tumori e questo fenomeno si associa ad una prognosi peggiore (Hong *et al.*, 2007).

Altre attività umorali sono coinvolte nella progressione neoplastica. È stato dimostrato che il TGF- β è in grado di stimolare la crescita di cellule di melanoma (Krasagakis *et al.*, 1995), l'angiogenesi tumorale (Roberts *et al.*, 1986), l'espressione di MMP-9 (Janji *et al.*, 1999), l'adesione delle cellule tumorali alle cellule endoteliali (Teli *et al.*, 1997) e l'inibizione della sorveglianza immunitaria (Letterio e Roberts, 1998).

Il ruolo dell'IFN- γ nella progressione neoplastica risulta particolarmente complesso. È noto che l'IFN- γ promuove la risposta immunitaria dell'ospite (Yates *et al.*, 2000), ma la stimolazione dell'espressione degli antigeni MHC di classe I nelle

cellule tumorali, potrebbe favorire la loro sfuggita dal controllo delle cellule *Natural Killer* (Beatty e Peterson, 2000; Taniguchi *et al.*, 1987). Ricorderò che le cellule *Natural Killer* rappresentano uno dei principali fattori antitumorali. In pazienti portatori di melanoma uveale, elevati livelli di IFN- γ nel siero correlano con la formazione di metastasi e rappresentano un marker prognostico negativo. Le cellule tumorali trattate con IFN- γ risultano più resistenti alla lisi mediata dai linfociti citotossici (Hallermalm *et al.*, 2008).

Queste osservazioni contribuiscono a sostenere l'ipotesi che lo sviluppo di un fenotipo metastatico nelle cellule tumorali è influenzato dall'insorgenza di un processo infiammatorio che determina la presenza di citochine infiammatorie e dei loro recettori (Coussens e Werb, 2002; Burke *et al.*, 1996; Herlyn, 1993). Rimane però di particolare complessità la comprensione del ruolo finale delle singole citochine all'interno della massa neoplastica, essendo le citochine infiammatorie dotate di un'ampia serie di attività: pleiotropismo, sinergismo, antagonismo, ridondanza.

Ipossia

L'ipossia, insieme alla ridotta disponibilità di nutrienti e all'abbassamento del pH, rappresenta una condizione microambientale particolarmente frequente nei tumori e attiva nei meccanismi di progressione neoplastica (Fig. II).

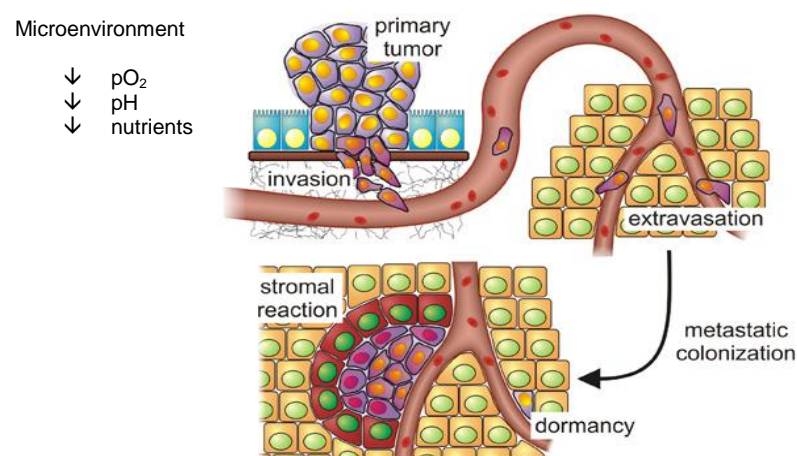


Figura II. Il microambiente tumorale come fattore locale in grado di stimolare la progressione neoplastica

Si tratta di una condizione che si stabilisce nei tumori solidi quando la massa tumorale cresce e la distanza delle cellule dai vasi sanguigni, che si trovano di solito alla periferia del tumore, diventa troppo elevata.

L'ipossia costituisce un fattore capace di promuovere la crescita tumorale e la diffusione metastatica (Hockel e Vaupel, 2001). E' stato infatti osservato che l'ipossia stimola il potenziale metastatico di linee cellulari derivate da fibrosarcomi e melanomi del topo, e di linee cellulari di melanoma umano (Rofstad e Danielsen, 1999). La determinazione del potenziale metastatico di cellule tumorali cresciute in un ambiente ipossico ha permesso di accertare che alcune linee tumorali esprimono una maggiore attività metastatica in seguito al trattamento con ipossia, altre linee tumorali esprimono un aumento del loro potenziale metastatico solo dopo un periodo di riossigenazione (Kunz *et al.*, 2002). Questo diverso comportamento è da attribuire ad una diversa sensibilità delle linee tumorali all'attività dell'HIF-1 α . Le risposte di adattamento che l'ipossia innesca nelle cellule dell'ospite e nelle stesse cellule tumorali, sono mediate per la maggior parte dall'espressione di un fattore di trascrizione noto come HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1). HIF-1 α è stato osservato essere espresso nelle cellule ipossiche di numerosi istotipi tumorali quali, il carcinoma del colon, della mammella, del polmone, dell'ovaio, della prostata, del pancreas, dello stomaco e il carcinoma dell'orofaringe (Aebersold *et al.*, 2001; Zhong *et al.*, 1999). L'HIF-1 α controlla l'espressione di oltre 40 geni tra i quali sono presenti i geni che codificano per le proteine trasportatrici il glucosio 1 e 3 (GLUT 1, GLUT 3), per alcuni enzimi della via glicolitica (aldolasi A e C, enolasi 1, esochinasi 1 e 3, lattato deidrogenasi A, fosfofruttocinasi L e fosfoglicerocinasi 1 (Semenza, 2002), per il VEGF-A e per i suoi recettori (Veikkola *et al.*, 2000) (Fig. III).

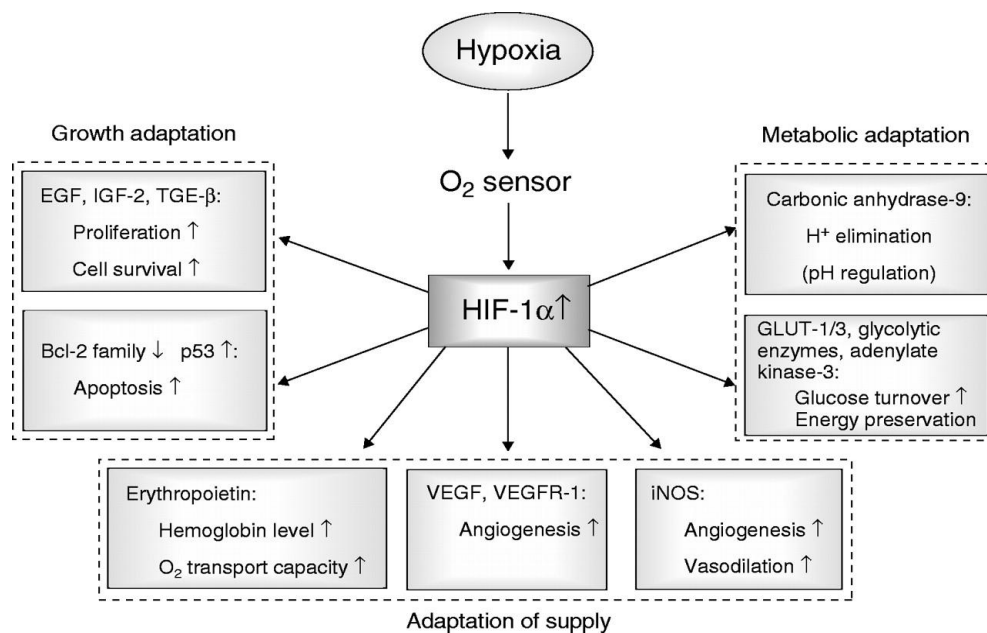


Figura III: ruolo di HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1) nella risposta cellulare all'ipossia

Il VEGF-A è un fattore di crescita di particolare importanza per la crescita tumorale perché capace di indurre la formazione di nuovi vasi a partire da cellule endoteliali pre-esistenti nei vasi dell'ospite e da precursori endoteliali circolanti (Lyden *et al.*, 2001; Dvorak *et al.*, 1999; Shweiki *et al.*, 1992). In quasi tutti i tumori il VEGF-A risulta over-espresso nelle cellule tumorali e nelle cellule del microambiente tumorale (Bergers e Benjamin, 2003; Augustin, 1998). È facile comprendere l'importanza della neo-angiogenesi nelle fasi precoci della crescita neoplastica, cioè quando la diffusione di ossigeno dai vasi pre-esistenti non è più sufficiente a soddisfare le necessità metaboliche delle cellule tumorali in crescita. In assenza di una adeguata rete vascolare, le cellule tumorali più distanti dai vasi sanguigni vanno incontro a apoptosi e/o necrosi (Folkman, 1990; Folkman 1971). La neo-angiogenesi assume un ruolo ancora più importante nella crescita di lesioni metastatiche, quando le cellule neoplastiche devono ristabilire le condizioni ambientali utili per la propria crescita. I nuovi vasi tumorali sono spesso incompleti, possono mancare di membrana basale e di periciti, ed in alcuni casi le cellule tumorali stesse partecipano al loro completamento (vasculogenic mimicry) (Sun *et al.*, 2006). Per questi motivi, i neovasi permettono un facile ingresso in circolo delle cellule tumorali.

L'importanza del VEGF-A nella diffusione delle cellule neoplastiche attraverso il circolo ematico è rafforzata dalla sua attività linfoangiogenetica (Schoppmann *et al.*,

2002). Il VEGF-A favorisce il processo linfangiogenetico direttamente, tramite l'attivazione del recettore VEGFR-2 sulla superficie di cellule endoteliali linfatiche, e indirettamente aumentando la secrezione di fattori linfangiogenetici VEGF-C e VEGF-D da parte di macrofagi intratumorali (Tammela *et al.*, 2005). Come il VEGF-A, anche il fattore linfangiogenetico VEGF-C può essere prodotto sia da cellule tumorali sia da cellule infiammatorie (Schoppmann *et al.*, 2002). E' stato osservato che molti tumori umani esprimono elevati livelli di VEGF-C, ed è stata trovata una correlazione tra la sua aumentata espressione nel tumore primitivo e la diffusione di cellule tumorali a linfonodi regionali: è per questo che viene considerato un importante marker di aggressività tumorale (Juttner *et al.*, 2006; Su *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2001). E' stato, inoltre, osservato che i vasi linfatici alla periferia della massa tumorale sono più numerosi e più grandi rispetto ai vasi linfatici intratumorali, e la presenza di un'alta densità di microvasi linfatici peritumorali e intratumorali si associa alla presenza di metastasi al linfonodo sentinella (Massi *et al.*, 2006).

L'ipossia svolge un ruolo cruciale nella disseminazione metastatica alterando anche l'espressione di molecole importanti nei processi di degradazione della matrice extracellulare. E' ampiamente dimostrato che l'ipossia è in grado di stimolare l'espressione delle proteasi. Linee di carcinoma mammario e di carcinoma del colon esposte ad ipossia aumentano i livelli di espressione di uPAR e della gelatinasi MMP-9 e presentano una riduzione di espressione dell'inibitore delle metalloproteinasi TIMP-1. A questi fenomeni molecolari si associa un aumento della capacità di invadere substrati ricoperti di Matrigel delle linee cellulari prese in esame (Krishnamachary *et al.*, 2003; Canning *et al.*, 2001; Graham *et al.*, 1999; Graham *et al.*, 1998). Le modificazioni innescate dall'ipossia sull'espressione di proteasi nelle cellule dell'ospite presenti nel microambiente tumorale, oltre che nelle cellule neoplastiche, possono contribuire alla progressione neoplastica anche promuovendo una marcata resistenza al trattamento farmacologico. Infatti, è stato dimostrato che i TAMs presenti nelle zone ipossiche di carcinomi mammari esprimono maggiori livelli di MMP-7 e questo si associa ad un aumento delle resistenze al trattamento chemioterapico con doxorubicina (Burke *et al.*, 2003).

FATTORI DELL'OSPITE CAPACI DI INFLUENZARE LA DIFFUSIONE METASTATICA

Fattori sistemici

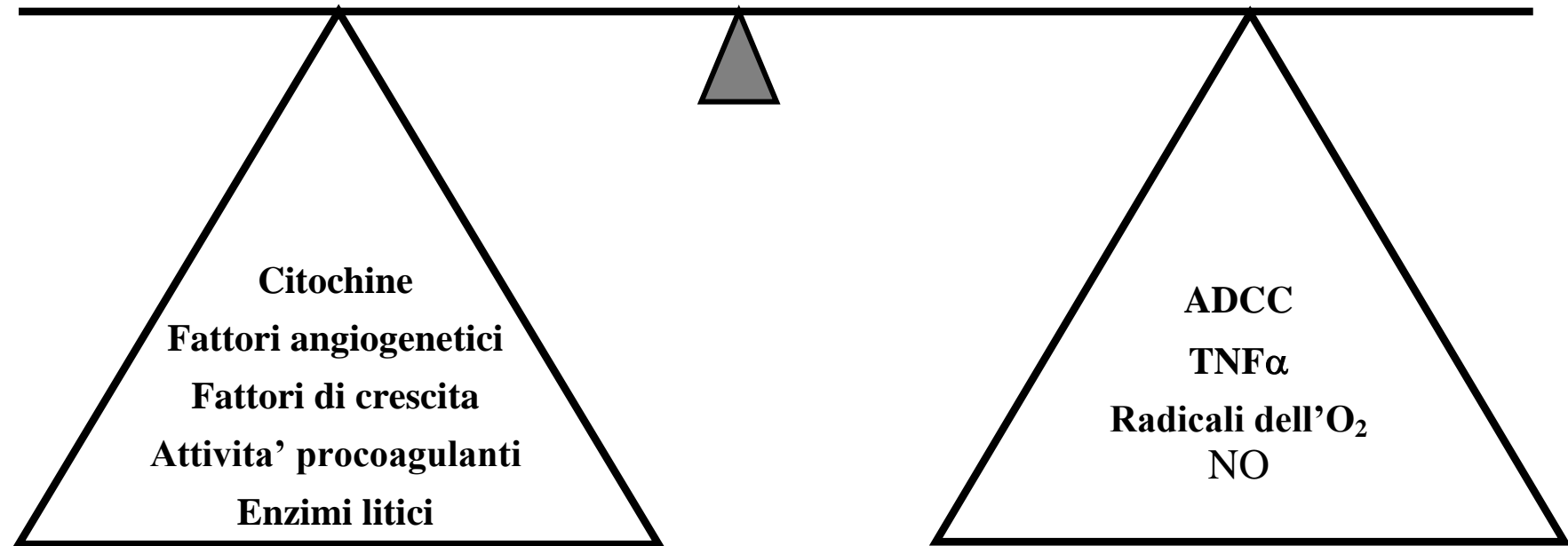
- **Condizioni nutrizionali**
- **Risposta neuro-endocrina**
- **Immunosoppressione**
- **Immunodeficienza**

Fattori locali

- **Processi flogistico-riparativi**
- **Danno tissutale**
- **Reazioni emostatiche**
- **Caratteristiche biologiche degli organi secondari (secrezione di fattori di crescita, di motilità, angiogenetici, etc.)**
- **Tensione di ossigeno**
- **Interazione delle cellule tumorali con cellule dell'ospite: piastrine, leucociti, linfociti, fibroblasti, cellule endoteliali, macrofagi**

(Tavola I)

IPOTESI DELLA “ BILANCIA MACROFAGICA” (Mantovani A. *et al.*, 1992)

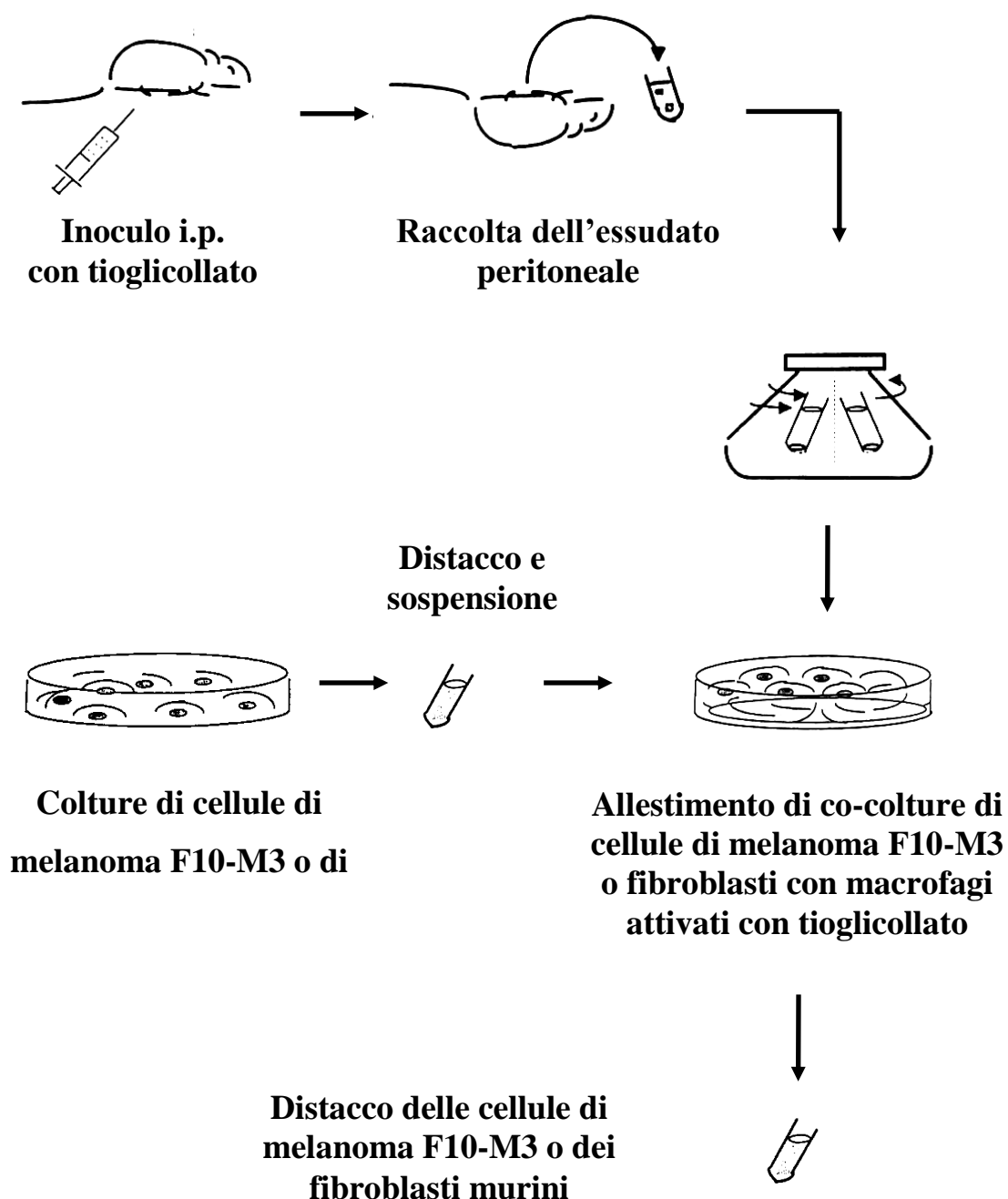


**Promozione della
progressione tumorale**

**Blocco della
progressione tumorale**

(Tavola II)

**ALLESTIMENTO DI CO-COLTURE DI MACROFAGI
ATTIVATI CON TIOGLICOLLATO E CELLULE DI
MELANOMA MURINO F10-M3 O FIBROBLASTI MURINI
NORMALI.**



(Tavola III)

SCOPO DELLA RICERCA

Lo scopo di questo studio è stato quello di verificare il ruolo di alcuni fattori umorali e cellulari dell'ospite e dell'ipossia nei meccanismi di progressione neoplastica e di disseminazione metastatica.

In particolare, la ricerca si è proposta i seguenti obiettivi:

- 1) valutare nei Macrofagi Associati al Tumore l'espressione di iNOS/Arginasi, COX-2 e di alcune attività proteasiche;
- 2) indagare il ruolo di alcune citochine infiammatorie e dei loro recettori nello sviluppo di un fenotipo metastatico;
- 3) esaminare l'effetto dell'ipossia sulla espressione dei fattori di crescita VEGF-A e VEGF-C e sulla espressione di proteasi nei TAMs e nelle cellule tumorali.

Per studiare le interazioni tra macrofagi e cellule tumorali sono state condotte indagini *in vitro* utilizzando un modello sperimentale messo a punto nel laboratorio presso il quale ho svolto la mia attività di ricerca. Tale modello ha permesso di riprodurre in condizioni ben controllate le relazioni che le cellule neoplastiche stabiliscono con i macrofagi in una massa tumorale, e si basava sulla coltura di cellule di melanoma murino F10-M3 su monostrati di macrofagi peritoneali murini singenici attivati *in vivo* con tioglicollato. Il tioglicollato è un agente capace di indurre nei macrofagi peritoneali del topo uno stato di attivazione definito "infiammatorio" che si associa ad una generale condizione di "responsività" a vari mediatori quali citochine e/o prodotti batterici (Cecconi *et al.* 1997; Calorini *et al.*, 1999; Calorini *et al.*, 2002). Le cellule F10-M3 rappresentano un modello di cellule tumorali particolarmente adatto alle indagini previste dall'argomento di ricerca, in quanto sono capaci di acquisire un fenotipo metastatico in seguito a stimolazione con citochine infiammatorie. L'attività metastatica delle cellule F10-M3 veniva valutata mediante la formazione di metastasi sperimentali *in vivo*, una tecnica che prevede l'inoculo delle cellule tumorali direttamente nel torrente circolatorio di animali singenici. L'attività invasiva delle cellule F10-M3 veniva valutata *in vitro* mediante test di migrazione attraverso membrane basali di Matrigel.

Ulteriori informazioni sulla espressione delle attività iNOS, COX-2 e VEGF-C, nei TAMs sono state acquisite mediante analisi immunohistochimiche su biopsie di melanomi umani a vario grado di malignità, disponibili presso il Dipartimento di Patologia Umana e Oncologia dell'Università di Firenze.

Lo studio degli effetti dell'ipossia sulla espressione di fattori angiogenetici e linfangiogenetici e di attività proteasiche, in cellule di melanoma e nei TAMs, è stato condotto esponendo le cellule ad una tensione di ossigeno dello 0.1%. Le cellule tumorali utilizzate in questa indagine erano rappresentate dalle cellule A375 derivate da un melanoma primitivo dell'uomo, e dalle cellule di melanoma Hs294T derivate da una lesione metastatica linfonodale. Il modello di macrofagi umani era rappresentato dalle cellule di linfoma istiocitario U937 inducibili a diventare macrofagi mediante trattamento con 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA).

MATERIALI E METODI

Analisi immunoistochimica

Preparazione degli inclusi in paraffina

Biopsie di melanomi umani a vario grado di progressione venivano fissate in formaldeide (Sigma) per 18 ore, lavate 2 volte in PBS e disidratate mediante una serie di passaggi in alcool etilico (Merk) a concentrazioni crescenti (50%, 75%, 95%, 30-45 minuti per trattamento) e, infine, in alcool etilico assoluto (due trattamenti di 30 minuti). In seguito, i preparati venivano chiarificati mediante doppio passaggio in toluene (Merk) per 20 minuti, immersi in paraffina liquida (Bio-Optica) e mantenuti in incubatore a 37°C per 8-12 ore. Una volta rimossi dai contenitori di inclusione, i preparati venivano montati su appositi supporti e tagliati in sezioni di 5 µm di spessore.

Immunoistochimica

Le sezioni venivano poste su vetrini portaoggetti e riscaldate a 56°C per 20 minuti per aumentare l'adesione al vetrino. La paraffina veniva allontanata mediante immersione in toluene per 5 minuti e i preparati venivano reidratati attraverso una serie di passaggi, ognuno della durata di 5 minuti, in alcool etilico a concentrazioni progressivamente decrescenti (alcool etilico assoluto - alcool etilico 95%, 75%, 50%) e sottoposti a lavaggi in acqua distillata (5 minuti) e PBS (3 minuti). Dopo aver inattivato le perossidasi endogene mediante trattamento con una soluzione al 3% di acqua ossigenata per 20 minuti (Merk), le sezioni venivano sottoposte ad un trattamento termico per facilitare l'esposizione degli antigeni ai sistemi di rivelazione, attraverso un passaggio in forno a microonde (MicroMED T/T Mega, Milestone, Italy) immersi in una soluzione tampone (Tris-EDTA-Citrato, TEC, pH 7.8) per 20 minuti. Le sezioni venivano quindi esposte ad una soluzione di siero equino (UltraVision) per bloccare i siti di legame aspecifici. Le sezioni incubate per 16 ore a 4°C con gli anticorpi primari, venivano esposte ad anticorpi secondari specifici coniugati con biotina e successivamente incubati per 1 ora a temperatura ambiente con una soluzione di streptavidina-perossidasi (UltraVision). Il legame specifico degli anticorpi primari veniva visualizzato mediante l'uso della 3,3'-diaminobenzidina (DAB) quale cromogeno

(BioGenex) per 5 minuti a temperatura ambiente. I nuclei venivano evidenziati mediante il colorante ematossilina di Mayer (Merk). I controlli negativi venivano ottenuti ogni volta mediante l'uso di un siero di coniglio non immunogeno al posto dell'anticorpo primario. Gli anticorpi utilizzati per le indagini di immunistochemica sono riassunti nella Tavola IV.

Valutazione semiquantitativa dell'espressione antigenica

La presenza di macrofagi associati al tumore (tumor associated macrophages TAMs) mediante espressione di CD68 viene valutata come negativa (0), bassa densità (1), moderata densità (2) o elevata densità (3). L'espressione di iNOS e arginasi veniva valutata confrontando, rispettivamente, l'espressione in campioni di epitelio delle vie aeree superiori o epitelio renale come controllo positivo e epitelio renale. La valutazione dell'espressione di COX-2 nel citoplasma delle cellule tumorali veniva valutata come negativa (-), focale (+), moderata (++) e diffusa (+++). Anche l'espressione del VEGF-C veniva valutata nelle cellule di melanoma come negativa (0); con cellule positive fra l'1% ed il 20% come 1+; fra il 21% ed il 50% come 2+ e con più del 50% come 3+. Il numero di macrofagi reattivi ai diversi marcatori veniva valutato nel loro punto di maggior densità (hot spot) ad un ingrandimento 400X (HPF) (un campo equivalente a 0.08 mm²), veniva quindi calcolato un valore medio di 5 differenti campi.

Linee cellulari e condizioni di coltura

In questo studio sono state utilizzate linee cellulari di origine murina ed umana: a) la linea cellulare F10-M3, una variante isolata dalle cellule di melanoma murino B16-F10 (Fidler, 1973) con la tecnica della diluizione limite (Gattoni-Celli *et al.*, 1993). Le cellule F10-M3 hanno la proprietà di colonizzare il polmone e il fegato di animali immunodeficienti, o, se opportunamente stimolate con citochine infiammatorie, di colonizzare il polmone di animali immunocompetenti (Calorini *et al.*, 2002); b) cellule A375 isolate da un melanoma amelanotico dell'uomo (Giard DJ *et al.*, 1973); c) cellule Hs294T, una linea cellulare derivata da una metastasi linfonodale di melanoma dell'uomo (Creasey *et al.*, 1979); d) cellule HT1080, una linea allestita partendo da un fibrosarcoma umano (Rasheed *et al.*, 1974); e) cellule U937, una linea cellulare

stabilizzata a partire da un linfoma istiocitario dell'uomo, utilizzata *in vitro* quale modello di differenziazione monocito/macrofagica.

I diversi tipi cellulari venivano coltivati in terreno DMEM 4500 (Dulbecco's Modified Essential Medium, contenente 4500 mg/L di glucosio, Gibco) integrato con siero fetale bovino (FCS, Invitrogen, scomplementato a 56°C per 30 minuti) al 10% e glutammina 2 mM (Gibco), a 37°C, in atmosfera umidificata contenente il 10% di CO₂ (21% di O₂). Le cellule venivano rimosse da colture sub-confluenti con una soluzione di Tripsina 0.05%-EDTA 1mM (Gibco) e venivano risospese in un terreno di coltura contenente FCS al 10% allo scopo di inibire l'attività proteolitica della tripsina. Il conteggio delle cellule veniva eseguito in una camera contaglobuli (Bürker). Le cellule di melanoma murino venivano sottocoltivate insemenzando 0.5x10⁶ cellule/piastra (per piastre da 10 cm di diametro), 2.5x10⁵ cellule/piastra (per piastre da 6 cm di diametro). Le cellule di melanoma e fibrosarcoma umano venivano sottocoltivate insemenzando 1x10⁶ cellule/piastra (per piastre da 10 cm di diametro) oppure 0.5x10⁶ cellule/piastra (per piastre da 6 cm di diametro). Le cellule U937 venivano sottocoltivate mediante diluizione dalla sospensione cellulare, insemenzando 1x10⁶ cellule/fiasca (per fiasche da 25 cm²). Prima dell'utilizzo le cellule U937 venivano indotte a differenziarsi in senso macrofagico mediante un trattamento di 72 ore con 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA, Sigma) 50 nM.

In alcuni esperimenti, le cellule F10-M3 venivano cresciute per 24 ore in terreni standard e per successive 24 ore in terreni di coltura contenenti FCS al 10% addizionati con interferone gamma (IFN γ 25-100 U/mL) in presenza o in assenza di Janus Kinasi inhibitor I (inibitore di JAK1 murino, 500 nM, Calbiochem), Tirfostina A47 (inibitore delle tirosin-chinasi, 25 μ M, Calbiochem), Rottlerina (inibitore della protein chinasi C δ , 5 μ M, Calbiochem, UK) o di AG490 (inibitore di JAK2 murino, 500 nM, Calbiochem).

In alcuni esperimenti, le cellule A375 e Hs294T venivano incubate per 24 ore in un terreno privo di FCS (starvazione) per ottenere la sincronizzazione del ciclo cellulare. Successivamente le colture cellulari venivano cresciute in un terreno contenente l'1% di FCS e glutammina 2 mM, per 48 ore in condizioni di normossia (CO₂ 10%, O₂ 20%), o di ipossia in un incubatore Concept 400 in cui la tensione parziale di ossigeno era mantenuta allo 0.1% (5% CO₂, 10% H₂ e 85% N₂). Le colture, recuperate dall'incubatore a bassa tensione di O₂, venivano, inoltre, incubate per 24 ore

in condizioni di normossia (riossigenazione). In altri esperimenti le due linee di melanoma dell'uomo venivano cresciute in condizioni di normossia per 48 ore in terreni contenenti l'interleuchina 1 beta ricombinante (IL-1 β , 1000 U/mL Preprotech) o il fattore di necrosi tumorale ricombinante (TNF α , 20 ng/mL, Preprotech).

Negli esperimenti condotti utilizzando la linea cellulare U937, le cellule venivano indotte al differenziamento in macrofagi e successivamente venivano incubate in condizioni di normossia o di ipossia per 24 ore, in terreno DMEM 4500 contenente 250 μ g/mL di albumina bovina (BSA, Sigma).

La vitalità cellulare veniva valutata con il metodo dell'esclusione del colorante vitale Trypan Blue (soluzione di Trypan Blue allo 0.1% in PBS, aggiunta in parti uguali alla sospensione cellulare).

Accertamento della contaminazione da mycoplasmi

Le cellule utilizzate per questo studio venivano mantenute in assenza di antibiotici e la presenza di *mycoplasmi* veniva accertata periodicamente. L'analisi si basa sul legame tra la bis-benzamide (fluorocromo H33258, Hoechst) e le basi adenina e timina del DNA (Chen, 1977). Il procedimento veniva eseguito su cellule adese su vetrini coprioggetto (Bio-Optica), fissate in acido acetico:metanolo (1:3, v/v) ed esposte per 30 minuti, a temperatura ambiente, ad una soluzione di bis-benzamide in PBS (0.25 μ g/mL). I preparati, lavati in acqua distillata e montati su un vetrino portaoggetti (Bio-Optica) venivano esaminati al microscopio a epifluorescenza. Tale procedura consentiva di individuare le cellule contaminate da *mycoplasmi* in base alla presenza di una fluorescenza diffusa (puntiforme o a bastoncino) nel citoplasma.

Crioconservazione delle cellule

Le cellule recuperate da colture subconfluenti venivano lavate mediante centrifugazione e risospese alla concentrazione di $1-2 \times 10^6$ cellule/ml, in terreno di coltura contenente FCS al 45% e dimetilsolfossido (DMSO, Sigma Aldrich) al 10%. Le sospensioni cellulari venivano distribuite in fiale sterili (Sarstedt), precongelate a -80°C per 24 ore e successivamente trasferite in appositi contenitori dove rimanevano criopreservate mediante esposizione a vapori di azoto liquido (-150 C°).

Isolamento e allestimento di colture di fibroblasti murini

L'isolamento di fibroblasti murini veniva effettuato a partire da frammenti di tessuto sottocutaneo di topi di ceppo C57Bl/6 (Charles River), deposti in piastre da coltura del diametro di 10 cm e coperti con un vetrino coprioggetto sterile. Gli espianti venivano incubati a 37°C in atmosfera umidificata al 10% di CO₂ in aria, in terreno DMEM 4500 addizionato con il 10% di FCS, glutammina (2 mM), penicillina (50 U/mL)/ streptomina (50 µg/mL) (Gibco). Quando era osservabile un adeguato numero di cellule nell'area intorno ai frammenti espiantati (dopo circa 14 giorni), i vetrini coprioggetto venivano sterilmente rimossi e le cellule venivano recuperate mediante trattamento con una soluzione di tripsina-EDTA. Da un'analisi morfologica effettuata su colture colorate con una soluzione di May-Grunwald e Giemsa (Merck), era possibile accertare che la popolazione cellulare era costituita prevalentemente da fibroblasti.

Allestimento di colture di macrofagi peritoneali attivati in vivo con tioglicollato

Animali di ceppo C57Bl/6 (Charles River) venivano inoculati per via intraperitoneale con 1 mL di una sospensione di tioglicollato (Thioglycollate medium, FTG) (Sigma) al 3% in H₂O. Al quarto giorno dopo l'inoculo con tioglicollato gli animali venivano sacrificati e le cavità peritoneali venivano lavate con 10 mL di PBS. Le cellule dell'essudato peritoneale venivano centrifugate a 250xg per 5 minuti a 4°C, risospese in terreno DMEM 4500 contenente 250 µg/mL BSA e insemminate in piastre da 6 pozzetti (Sarstedt) (1x10⁶ cellule/pozzetto). Le cellule venivano fatte aderire a 37°C, in atmosfera al 10% di CO₂ in aria e dopo 1 ora le cellule non adese venivano allontanate mediante ripetuti lavaggi con PBS. Un esame morfologico delle cellule aderenti, eseguito mediante colorazione con May-Grunwald e Giemsa, consentiva di accertare che il 95-98% delle cellule che avevano aderito era costituito da macrofagi. Nei vari esperimenti era possibile ottenere per ogni singolo animale 5-8x10⁶ macrofagi attivati con tioglicollato.

In alcuni esperimenti, i macrofagi attivati con tioglicollato venivano incubati per 24 ore in terreno DMEM/BSA contenente citochine ricombinanti murine (Peprotech) come il fattore di necrosi tumorale (TNF-α 100 U/ml), l'interleuchina-1 beta (IL-1β 100 U/mL), l'interleuchina-4 (IL-4 20 ng/mL) interleuchina-10 (20 ng/mL), l'interferone

gamma (IFN γ 50U/mL), il transforming growth factor beta (20 ng/mL), e/o il lipopolisaccaride batterico (LPS, 10 ng/mL, Sigma).

In altri esperimenti, i macrofagi attivati con tioglicollato venivano incubati per 24 ore nel terreno condizionato da colture di cellule F10-M3.

Allestimento di co-culture di macrofagi peritoneali attivati con tioglicollato e cellule di melanoma murino F10-M3 o fibroblasti murini normali

Le cellule di melanoma murino F10-M3 e i fibroblasti murini normali venivano recuperati da colture subconfluenti e insemnati su monostrati di macrofagi attivati con tioglicollato in modo da ottenere un rapporto 1:1 tra macrofagi e cellule tumorali o fibroblasti (densità cellulare 200.000 cellule/cm²). Dopo 3 ore, il terreno di coltura contenente siero al 10%, indispensabile per l'adesione delle cellule tumorali e dei fibroblasti, veniva allontanato e sostituito con terreno DMEM/BSA. Le co-culture venivano incubate per 24 ore. A questo punto, le co-culture venivano trattate con una soluzione di tripsina-EDTA che permetteva il recupero delle cellule tumorali e dei fibroblasti senza modificare sostanzialmente l'adesione dei macrofagi. In alcuni esperimenti le co-culture venivano realizzate in presenza di IFN γ (50 U/mL) e/o LPS (10 ng/mL), oppure in presenza di anticorpi diretti contro uPAR (R&D). In altri esperimenti, co-culture di macrofagi e cellule F10-M3 venivano incubate per 24 ore in condizioni di ipossia.

Per valutare le interazioni tra cellule tumorali e macrofagi in assenza di contatto le cellule di melanoma murino F10-M3 venivano insemnate su membrane porose (4 μ m di diametro) poi inserite in appositi multipozzetti nei quali erano stati insemnati i macrofagi (Transwell Costar).

Determinazione del potenziale di colonizzazione polmonare

Le cellule di melanoma murino F10-M3, recuperate mediante trattamento con una soluzione di tripsina-EDTA da colture sub-confluenti, venivano contate e risospese in terreno privo di FCS in modo da ottenere una concentrazione di 0.5×10^6 cellule/mL. 0.2 mL delle sospensioni cellulari venivano inoculati nella vena caudale di animali singenici di ceppo C57Bl/6. Dopo 21 giorni dall'inoculo, gli animali venivano sacrificati e sottoposti all'esame autoptico. I polmoni venivano prelevati, immersi in

PBS per rimuovere eventuali residui ematici, e fissati in formalina al 5% in PBS. Il numero dei noduli metastatici superficiali veniva determinato mediante l'ausilio di un microscopio da dissezione (Zeiss).

Il potenziale di colonizzazione polmonare delle cellule F10-M3 veniva determinato in cellule cresciute in condizioni standard, in cellule cresciute per 24 ore in terreni contenenti IL-1 β (300 U/mL), IL-6 (300 U/mL), o TNF- α (25 ng/mL) e in cellule stimulate con IFN- γ 25 U/mL per 24 ore e poi cresciute per ulteriori 24 ore in terreni contenenti le citochine suddette. La capacità di formare colonie polmonari veniva, inoltre, valutata in cellule F10-M3 cresciute per 24 ore in presenza IFN- γ 100 U/mL. Infine, il potenziale di colonizzazione polmonare ed epatico veniva determinato mediante l'inoculo di cellule F10-M3, cresciute in terreno standard e cresciute in terreno contenente JAK Inhibitor I, in animali immunocompromessi. Gli animali venivano resi immunocompromessi mediante l'inoculo intraperitoneale con una soluzione di ciclofosfamide (CFA, Baxter Oncology) (240 mg/Kg di peso) 4 giorni prima dell'inoculo endovenoso, in modo da abolire le difese immunitarie Natural Killer-dipendenti maggiormente coinvolte nei processi di diffusione metastatica per via ematica.

Determinazione della produzione di NO

La determinazione della produzione di NO nei terreni di colture macrofagiche e di co-culture di macrofagi e cellule tumorali veniva eseguita, dopo 24 o 48 ore dall'allestimento delle colture e co-culture, mediante la misurazione spettrofotometrica dell'anione nitrito (NO $_2^-$), secondo il metodo di Griess (Aggarwal and Metha, 1996). Aliquote di 500 μ L venivano prelevate dai mezzi di cultura e fatte reagire con 500 μ L della soluzione di Griess, costituita da 250 μ L di una soluzione all'1% di sulfanilamide (Sigma) diluita in acido ortofosforico (H $_3$ PO $_4$ Merk) al 5% e da 250 μ L di una soluzione allo 0.1% di naftiletildiamina (Sigma). Dopo 15 minuti di incubazione al buio, il prodotto della reazione veniva misurato a 546 nm. Il contenuto di NO $_2^-$ nei terreni di cultura macrofagici veniva determinato mediante l'uso di una scala di riferimento preparata con concentrazioni scalari di NaNO $_2$.

Determinazione delle capacità invasive delle cellule tumorali attraverso filtri porosi rivestiti di Matrigel

L'invasività delle cellule tumorali utilizzate in questo studio è stata determinata saggiando la loro capacità di penetrare il Matrigel, un substrato proteico costituito da collagene di tipo IV, laminina ed eparansolfati. Il test di invasività veniva eseguito utilizzando filtri di policarbonato del diametro di 13 mm, con pori di 8 μ m (Biomap), su ciascuno dei quali venivano depositi 200 μ L di una soluzione contenente 50 μ g di Matrigel (R&D) diluiti con acqua sterile. Lo strato di Matrigel veniva fatto essiccare per 18 ore a temperatura ambiente in condizioni di sterilità, e poi reidratato per 1 ora a 37°C in terreno DMEM 4500 contenente 250 μ g/mL di BSA. I filtri reidratati venivano depositati sui bordi del compartimento inferiore della camera di Boyden contenente terreno DMEM 4500. Dopo aver avvitato il compartimento superiore della camera di Boyden al compartimento inferiore, 200 μ L delle sospensioni cellulari venivano depositi nel compartimento superiore della camera. Dopo aver incubato le camere di Boyden per 24 ore, a 37°C, in atmosfera umidificata contenente il 10% di CO₂ in aria, i filtri venivano prelevati, fissati in metanolo e liberati dal Matrigel. I filtri venivano quindi colorati con Diff-Quick, montati su vetrini porta-oggetto ed infine esaminati al microscopio ottico. La capacità invasiva delle cellule tumorali veniva valutata in base al numero di cellule presenti sulla parte inferiore dei filtri. In alcuni esperimenti la migrazione avveniva in presenza di anticorpi diretti contro MMP-9 (Chemicon), o contro i recettori per l'IL-1 β (Abnova) e il TNF- α (Santa Cruz); in altri esperimenti la migrazione in presenza di Ilomastat 50 μ M (USBiological), un inibitore delle metalloproteinasi.

Determinazione dell'attività metalloproteinasica secreta nei terreni di coltura mediante zimografia

I terreni dei vari tipi di colture venivano recuperati. Aliquote pari ad un volume finale di 15 μ L di ogni terreno e normalizzato in base al numero di cellule presenti nella piastra al termine dell'esperimento, venivano aggiunti a 5 μ L del tampone di Laemmli (4% sodio dodecilsolfato, SDS; 20% glicerolo, 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.004% blu di bromo fenolo) e sottoposte ad elettroforesi su gel di acrilammide (8% p/v, Applichem)

contenente gelatina porcina 0.1% (p/v) (Sigma). La separazione elettroforetica veniva condotta per 1 ora a 200 V in un tampone contenente SDS. I gel venivano sottoposti a due lavaggi di 30 minuti con Triton X-100 2.5% (v/v) in H₂O in modo da rimuovere l'SDS, e successivamente incubati per 18 ore a 37°C in un tampone costituito da 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.2 mM NaCl e 5 mM CaCl₂. Il tampone permetteva la rinaturazione delle proteine separate elettroforeticamente e la loro attivazione. I gel venivano colorati a temperatura ambiente con una soluzione di Blu di Coomassie R-250 (Merck) in metanolo-acido acetico-H₂O (50:10:40, v/v) allo 0.05% (p/v), e decolorati con una soluzione di metanolo-acido acetico-H₂O (40:10:50, v/v).

Le aree corrispondenti alle attività metalloproteinasiche separate elettroforeticamente e visibili come bande chiare su sfondo blu, venivano identificate in base alla migrazione delle metalloproteinasi rilasciate dalle cellule di fibrosarcoma murino HT-1080 (Rasheed *et al.*, 1974).

In alcuni esperimenti i terreni recuperati venivano concentrati mediante centrifugazione a temperatura ambiente per 25 min a 10.000 rpm, in provette (Amicon) munite di filtro da 10.000 Da.

Analisi proteica mediante Western blot

Le colture cellulari recuperate dall'incubatore venivano immediatamente lavate con una soluzione fredda di ortovanadato di sodio (Na₃VO₄) (Sigma) in PBS. Le cellule venivano rimosse dai substrati e lisate in un buffer di lisi (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 100mM Hepes, 1% Triton X-100, 10 mM glicerofosfato, 100 µM PMSF, e Inhibitor cocktail III Calbiochem diluito 1:1000). Per la determinazione del contenuto proteico veniva impiegato il metodo Bradford. I campioni venivano preparati in modo da avere una soluzione contenente il 65% di estratto proteico, il 25% di Buffer di Laemmli 4x e il 10% di 2β-mercaptoetanol 1 M. Per la determinazione di HIF1-α veniva utilizzato un tampone di lisi costituito da Tris-HCl 75 mM pH 7.4, urea 9 M e 2β-mercaptoetanol 0.15 M. Le proteine venivano separate mediante elettroforesi su gel di acrilammide. La separazione elettroforetica veniva condotta per 1 ora a 200 V in un tampone contenente SDS. I gel venivano sottoposti a trasferimento su membrane di nitrocellulosa utilizzando il sistema Bio-Rad. Le membrane venivano quindi esposte per 2 ore a temperatura ambiente, ad una soluzione tampone in grado di bloccare i siti

aspecifici di legame (Odyssey Blocking Buffer) e successivamente mantenute in agitazione a 4°C per 16 ore in presenza degli anticorpi primari di interesse diluiti in una soluzione contenente Odyssey Blocking Buffer e PBS in rapporto 1:1. Le membrane venivano lavate mediante trattamento con soluzione allo 0.1% di Tween in PBS (T-PBS) ed esposte ai rispettivi anticorpi secondari specifici coniugati con il fluoro cromo Alexa Fluor 680 (Invitrogen) diluiti in Blocking Buffer. Dopo ripetuti lavaggi con T-PBS, le membrane venivano esaminate con il sistema di rivelazione Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR® Bioscience). Gli anticorpi utilizzati per le indagini di Western Blot sono riassunti nella Tavola IV.

Determinazione citofluorimetrica dell'espressione dei recettori per citochine

L'analisi dell'espressione dei recettori per le citochine infiammatorie veniva effettuata con tecniche di immunofluorescenza indiretta con lo strumento FACScan della Becton & Dickinson del Laboratorio di Biologia Cellulare e Radiobiologia dell'Università di Firenze. Le cellule di melanoma murino F10-M3 venivano staccate dalle piastre con una soluzione di tripsina/EDTA e incubate in presenza dei seguenti reagenti: a) una concentrazione appropriata di anticorpo diretto contro IL-6 α R o IL-1 β R1 o contro TNF- α Rp55, b) una soluzione contenente immunoglobuline IgG coniugate alla biotina; c) una soluzione contenente il complesso streptavidina coniugata con la phycoeritina (streptavidine-PE-conjugate). Tutte le incubazioni erano effettuate a 4°C per 30 minuti al termine dei quali i composti venivano allontanati mediante lavaggio con PBS-BSA 0.5%. Le cellule venivano quindi risospese in 1 mL di una soluzione di paraformaldeide al 5% in PBS e mantenute a 4°C fino al momento dell'analisi con citofluorimetro. In tutti gli esperimenti venivano effettuati controlli negativi utilizzando PBS-BSA 0.5% al posto dell'anticorpo primario. Gli anticorpi utilizzati per le indagini sono riassunti nella Tavola IV.

Estrazione dell'RNA

L'RNA totale dei diversi tipi cellulari veniva estratto mediante l'uso del sistema RNAagent®, Total RNA Isolation System (Promega). La determinazione del contenuto in RNA veniva valutata spettrofotometricamente ad una lunghezza d'onda di 260 nm. Il grado di purezza dell'RNA estratto veniva determinato in base al rapporto tra il valore di assorbimento a 260 nm (caratteristico degli acidi nucleici) e quello a 280 nm (caratteristico delle proteine) (valore ottimale: 1.8-2.0). L'integrità dell'RNA estratto veniva valutata mediante elettroforesi su gel di agarosio all'1.2%. L'RNA veniva conservato ad una temperatura di -80°C.

Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA

La reazione di retrotrascrizione avveniva utilizzando il sistema di amplificazione ImProm-II™ (Promega). Per ciascun campione veniva preparata una sospensione contenente RNA (1-2 µg), 1 µL di random primers (Promega, 500 µg/mL) costituiti da sequenze esameriche casuali e acqua sterile per raggiungere un volume totale di 5 µL. L'appaiamento dei primers avveniva mediante un'incubazione dei campioni a 70°C per 5 minuti, seguita da un'incubazione a 4°C per 5 minuti. Ad ogni campione venivano quindi aggiunti 15 µL di una soluzione contenente: MgCl₂ (3 mM finale), deossi-ribonucleotidi (dNTPs 0.5 mM finale), 20 U di RNAsina (Recombinant RNAsin® Ribonuclease Transcriptase, 40 U/µL), 1 µL di enzima trascrittasi inversa (ImProm-II Reverse Transcriptase), e un tampone di reazione (ImProm-II Reaction Buffer). La retrotrascrizione avveniva secondo il seguente protocollo: 5 minuti a 25°C, 1 ora a 42°C e 15 minuti a 70°C. Per le reazioni di appaiamento e retrotrascrizione del materiale dei diversi campioni, veniva utilizzato un Thermal Cycler (Eppendorf S.r.l.). Al termine della reazione, i cDNA venivano conservati ad una temperatura di -20°C fino al momento della reazione di amplificazione.

Amplificazione del cDNA mediante PCR (end point-Polymerase Chain Reaction)

Aliquote di 2-3 µL di cDNA venivano amplificate in una miscela di reazione contenente: un tampone di reazione (GoTaq Reaction Buffer), deossi-ribonucleotidi (dNTPs 0.2 mM), primers senso e antisenso (0.1 µM), 1 U/campione di polimerasi

(GoTaq Polymerase) e H₂O sterile fino ad un volume di 20 µL (Promega). Le sequenze e le temperature di appaiamento dei primers usati per le indagini di RT-PCR sono riassunti nella Tavola V.

Il cDNA amplificato era sottoposto a elettroforesi su gel di agarosio al 2% (contenente 0.5 µg/mL di bromuro di etidio) e confrontato con un marcatore di pesi molecolari (Promega). Le immagini relative alle bande di cDNA dei geni di interesse potevano essere acquisite mediante fotocamera digitale (Kodak) e confrontate con quelle corrispondenti alle bande di cDNA della β₂-microglobulina o della glutaraldeide deidrogenasi utilizzate, rispettivamente, come geni di riferimento murino e umano. In alcuni esperimenti le intensità delle bande elettroforetiche (OD) venivano determinate con un programma di elaborazione di intensità ottiche (Scion® Image) ed i seguenti calcoli permettevano di valutare le variazioni del contenuto in RNAm dei singoli amplificati:

$$\text{variazione OD del campione corretta per la OD della } \beta_2\text{-m o GAPDH} = \frac{\text{OD campione}}{\text{OD } \beta_2\text{-m o GAPDH}} \times 100$$

$$\text{normalizzazione del controllo} = \frac{\% \text{ del campione corretta per la relativa } \beta_2\text{-m o GAPDH}}{\% \text{ del campione di controllo corretta per la relativa GAPDH}} \times 100$$

Amplificazione del cDNA mediante PCR Real-Time

Per gli esperimenti di PCR Real-Time sono state utilizzate aliquote di 1 µL di cDNA. La reazione avveniva in presenza del tampone SYBR Premix Ex-Taq (Takara) in soluzione concentrata (2 volte) addizionato con primers senso e antisenso specifici (0.1 µM) e H₂O sterile per ottenere un volume finale di 15 µL. L'amplificazione e il rilevamento di fluorescenza sono stati effettuati utilizzando lo strumento Rotor-Gene 6000 (Corbett Research). Le condizioni di reazione erano quelle utilizzate per la end-point PCR.

Trasfezione con small interfering RNA (siRNA)

Colture confluenti all'80% di cellule di melanoma umano A375 e Hs294T venivano trasfettate con siRNA specifici contro HIF-1 α (sequenza bersaglio 5'-AAA GGA CAA GUC ACC ACA GGA-3', Qiagen) utilizzando Oligofectamina (Invitrogen) 48 ore prima del trasferimento in ipossia. Gli siRNA contro HIF-1 α venivano diluiti ad una concentrazione di 20 nM in terreno DMEM 4500, ed incubati per 30 minuti a temperatura ambiente in presenza di 10 μ L del reagente di trasfezione oligofectamina. Le colture venivano lavate con PBS per eliminare ogni residuo di FCS e quindi incubate in presenza di siRNA per 16 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione il terreno veniva sostituito con terreno standard contenente il 10% di FCS e, le colture venivano mantenute in normossia per 48 ore. Successivamente, dopo aver sostituito il terreno con uno nuovo contenente l'1% di FCS, le colture venivano trasferite in condizioni di normossia o di ipossia severa per 48 ore.

Analisi statistica

Le differenze, tra i vari gruppi sperimentali esaminati in questo studio, sono state valutate con l'uso del test t di Student e definite significative per $p < 0.05$.

Anticorpi utilizzati:

Primari	fornitore	origine	bersaglio	Sistema di rivelazione			Neutralizzante
				Western Blotting	FACS	Immuno-istochimica	
VEGF-A	Santa Cruz	¹ m	² h m	1:200			
VEGF-C	Abcam	³ r	h m ⁴ ra	1:500			
VEGF-C	Santa Cruz	⁵ g	h			1:100	
uPAR	R&D	g	m	1:50			26 µg/ml
MMP9	Chemicon	r	m				17.5 µg/ml
MMP9	Oncogene	m	h				
IL6Rα	Santa Cruz	r	m		1:50		
IL1R1	Santa Cruz	r	m		1:50		
TNFαRp55	Santa Cruz	r	m		1:50		
IL1R1	Ab nova	m	h	1:1.000			5µg/ml
TNFαRp60	Santa Cruz	g	h	1:100			2µg/ml
TNFαRp80	Santa Cruz	g	h	1:100			
Erk 1/2	Sigma		m				
actina	Genetex	r	h m ra	1:500			
iNOS	Biomol	r	h m ra			1:600	
COX-2	Zymed	g	h				
COX-2	Biomol	m	h m	1:1.000			
arginasi	Santa Cruz		h			1:100	
HIF1α	Santa Cruz	r	h				
CD68	DAKO	m	h			1:50	
actina	Genetex	r	h m ra	1:500			
α-tubulina	Sigma	m	h	1:10.000			
Secondari							
Western Blotting Odyssey Infrared Imaging System							
				rabbit anti-goat IgG Alexa Flour 680	1:8.000		LI-COR® Bioscience
				rabbit anti-mouse IgG Alexa Flour 680	1:8.000		LI-COR® Bioscience
				goat anti-rabbit IgG Alexa Flour 680	1:8.000		LI-COR® Bioscience
Immunoistochimica							
				anti-goat IgG biotin conjugate	1:1.000		DAKO
				anti-rabbit IgG biotin conjugate	1:1.000		DAKO
				anti-mouse IgG biotin conjugate	1:1.000		DAKO
				streptavidina-perossidasi	1:100		UltraVision
FACS							
				anti-goat IgG biotin conjugate	1:100.000		Sigma
				streptavidina-PE	1:10		Sigma

(Tavola IV)

Primers utilizzati:

Primers murini

Primer	Sequenze Senso Antiseno	basi	T°C	cicli	PubMed Accession Numbers	Bibliografia
Arg-1	CAAGACAGGGCTCCTTTCAG GTAGTCAGTCCCTGGCTTAGG	159	60	40	NM007482.2	Misson P, van den Brùle S, Barbarin V, Lison D, Huaux FJ <i>Leukoc Biol.</i> 2004 Nov;76(5):926-32
$\beta 2$ microglobulina	GTCATGCTTAAGTCTGCAGG GTCATGCTTAAGTCTGCAGG	258	55	29	NM009735	Orlic D, Anderson S, Biesecker LG, Sorrentino BP, Bodine DM. <i>PNAS</i> 1995, 92:4601
COX-2	AACTCCCATGGGTGTGAAGGG CCAAAGATAGCATCTGGACGAG	1000	60	35	NM011198	Pouliot M, Clish CB, Petasis NA, Van Dyke TE, Serhan CN. <i>Biochemistry</i> ;2000; 39:4761-8.
IFN γ	TGGAGGAACTGGCAAAGGATGGT TTGGGACAATCTCTCCCCAC	335	55	35	NM008337.2	Gray PW, Goeddel DV. <i>PNAS</i> 1983;80:5842-5846
IFN γ R1	GACTGATTCTGCACCAACATTT AGTCCTTGCTCTCTGTGGTAAA	660	58	34	M28233	Hemmi S, Peghini P, Metzler M, Merlin G, Dembic Z, Aguet M. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 1989 Dec;
iNOS	CCCTTCCGAAGTTCTGCAGCAGC GGCTGTGAGCCTCGTGGCTTTGG	496	60	25	NM010927.2	Jeohn GH, Chang RC, Kim WG, Wilson B, Mohnhey RP, Wetsel WC, Hong JS. <i>Brain Res Mol Brain Res.</i> 2000 Jun 23;79(1-2):18-31.
IL-1 β	CCTGCAGCTGGAGAGTGTGGA CCCATCAGAGGCAAGGAGGAA	400	60	30	NM008361.3	Bartolomucci A, Palanza P, Parmigiani S, Pederzani T, Merlot E, Neveu PJ, Dantzer R. <i>Brain Res Bull.</i> 2003 Dec 30;62(3):173-8.
IL-1 β R1	ACCCCCATATCAGCGGACCG TTGCTTCCCCCGAAGCTAT	429	58	35	NM008362	Pinteaux E, Parker LC, Rothwell NJ, Luheshi GN. <i>J Neurochem.</i> 2002 Nov;83(4):754-63.
IL-6	CTTCCATCCAGTTGCCTTCT TGCATCATCGTTGTTCATAC	462	61	35	NM031168.1	Bartolomucci A, Palanza P, Parmigiani S, Pederzani T, Merlot E, Neveu PJ, Dantzer R. <i>Brain Res Bull.</i> 2003 Dec 30;62(3):173-8
IL-6Ra	AAGAGTGACTTCCAGGTGCC GGTATCGAAGCTGGAACCTGC	301	57	35	NM010559	<i>J. Immunol.</i> 2002, 169: 3353–3362
TNF- α	GCGGTGCCTATGTCTCAGCC TGAGGAGCACGCTAGTCGGGG	361	60	30	NM013693.2	Bartolomucci A, Palanza P, Parmigiani S, Pederzani T, Merlot E, Neveu PJ, Dantzer R. <i>Brain Res Bull.</i> 2003 Dec 30;62(3):173-8
TNF- α Rp55	GGATACAGTCTGCAGGGAGTG TCCACCGGGATATCGGCACATTA	490	60	34	NM011609.3	Zhuang L, Wang B, Shinder GA, Shivji GM, Mak TW, Sauder DN. <i>J Immunol.</i> 1999, 162:1440-1447
TGF- β	GGCTTCTAGTGTGACG GGGTGCTGTTGTACAAAAG	203	50	30	NM011577.1	primers disegnati con il programma FAST PCR
TGF- β R	TAGTGATACCAATCCCAGAT CATTCGTCCTACAGTTACTTT	170	48		NM011577.1	Kuan J, Kono DH. <i>Mamm Genome</i> 1998 Jan;9(1):95-6
MMP-2	AGAGACTCAGGGTGACAC AAGAAGTTGTAGTTGGCCA	378	58	30	NM008610.2	Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, Nishimoto H, Yoshioka T, Suzuki R, Uehira M. <i>Clin Exp Metastasis</i> 1999; 17:177-181
MMP-9	GCTCCTGGCTCTCCTGGCTT GTCCCACTTGAGGCCTTTGA	331	58	30	NM013599.2	Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, Nishimoto H, Yoshioka T, Suzuki R, Uehira M. <i>Clin Exp Metastasis</i> 1999; 17:177-181
uPA	TATGCAGCCCCACTACTATGG CTC GAAGTGTGAGACCCCTGTGTAGAC	210	60	34	NM008873.2	Rakic JM, Lambert V, Munaud C, Bajou K, Peyrollier K, Alvarez-Gonzalez ML, Carmeliet P, Foidart JM, Noël A. <i>Invest Ophthalm Vis Sci</i> 2003 ;44 :1732-39
uPAR	GGACTCCCAAGGCGGTGTGTC GGGCCACCATTCAGTGGGTG	598	55	34	NM011113 ESONE 5	Gutierrez LS, Schulman A, Brito-Robinson T, Noria F, Ploplis VA, Castellino FJ. <i>Cancer Res</i> 2000;60:5839.
VEGF-A	TGCACCCACGACAGAAGGAGAG GCACGCACTCCAGGGCTTCATC	206	65	35	NM001110268	primers disegnati con il programma FAST PCR
VEGF-C	CCATGCACTGTGCTGCTTC ACCGGCAGGAAGTGTGATTG	622	59.4		NM009506.2	Tang Y, Zhang D, Fallavollita L, Brodt P. <i>Cancer Res</i> 63, 1166–1171, March 15, 2003

Primers umani

GAPDH	ACCACAGTCCATGCCATCAC TCCACCACCTGTTGCTGTA	452	58	36	NM002046.3	Arikawa T, Omura K, Morita I. <i>Journal J Cell Physiol</i> 200;400–406 (2004)
VEGF-A	ATGGCAGAAGGAGGGCAGCAT TTGGTGAGGTTTGTATCCGCATCAT	255	56	36	NM001025366	primers disegnati con il programma FAST PCR
VEGF-C	TCCGGACTCGACTCTCGGAC CCCCACATCTATACACACTCC	303	60	36	NM005429.2	primers disegnati con il programma FAST PCR
IL-1 β	TGAACTGCACGCTCCGGGACTC TTCTGCTTGAGAGGTGCTGATG	368	58	34	NM000576.2	primers disegnati con il programma FAST PCR
IL-1 β R I	AAGGTGGAGGAGGATTGAGGACAT AGCTATCTTTGACTCCAATA	284	55	35	NM008362	primers disegnati con il programma FAST PCR
TNF α	ACCAGGGAGCCTTTGGTCTGG AAGGCAGCTCTACATTGGGTC	273	58	34	NM000594.2	primers disegnati con il programma FAST PCR
TNF- α Rp60	CAGGATACGGACTGCAGGGAC ATTCTCAATCTGGGGTAGGCA	375	60	35	NM001065	primers disegnati con il programma FAST PCR
TNF- α Rp80	GCTCGCCGGCCAATATGC GGCTTGACACCAACGCTGTA	319	63	35	NM001066	primers disegnati con il programma FAST PCR

(Tavola V)

RISULTATI

1) STUDIO DI ALCUNE ATTIVITÀ NEI TAMs

Espressione di iNOS e di Arginasi su sezioni istologiche di melanomi umani a vario grado di malignità (Fig. 1, 2, 3)

L'analisi immunohistochimica condotta su sezioni istologiche di melanomi dell'uomo a vario grado di malignità ha mostrato che nella maggior parte dei tumori primitivi era presente un'alta densità di cellule CD68-positivo alla periferia del tumore (Fig. 1A,B). L'espressione del CD68 identificava cellule appartenenti alla popolazione macrofagica. I macrofagi presenti in sede peritumorale si trovavano, in molti casi, raggruppati sul fronte invasivo del tumore, in stretto contatto con le strutture vascolari e con l'infiltrato linfocitario. All'interno della massa tumorale invece, i macrofagi CD68-positivi erano presenti in bassa densità e distribuiti come singole unità. Inoltre, queste indagini hanno permesso di osservare che nei melanomi metastatici, i macrofagi intratumorali erano più numerosi dei macrofagi peritumorali (Fig. 1C,D).

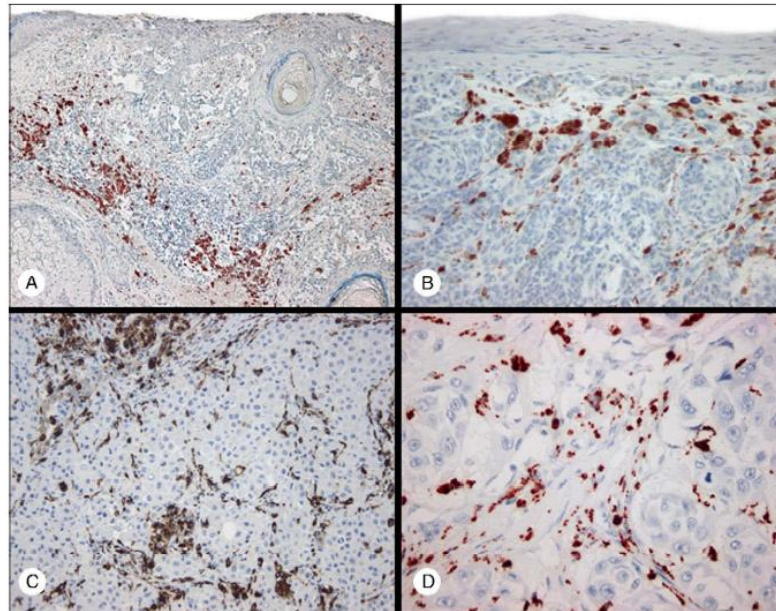


Fig.1

Analisi immunohistochimica dell'espressione di CD68 in TAMs dello stroma tumorale di melanomi invasivi dell'uomo. In melanomi primari a crescita verticale i TAMs sono localizzati prevalentemente sul fronte invasivo del tumore (A) e sono raggruppati in sede peritumorale sotto l'epidermide (B). I TAMs sono presenti all'interno della massa tumorale sia in melanomi primari a crescita verticale (C) sia nei melanomi metastatici (D). (Massi D, Marconi C, Franchi A *et al. Human Pathology* 2007; 38:1516-25).

Nei melanomi *in situ* e nei melanomi sottili, a crescita radiale, la popolazione macrofagica esprimente iNOS era fortemente rappresentata, soprattutto in sede peritumorale. Il numero di macrofagi esprimenti iNOS si riduceva in melanomi in stadio più avanzato (melanomi a crescita verticale) e in melanomi metastatici, sia alla periferia del tumore sia in sede intratumorale (Fig. 2A-D). L'indagine ha mostrato inoltre che cellule tumorali di lesioni invasive e metastatiche esprimevano iNOS.

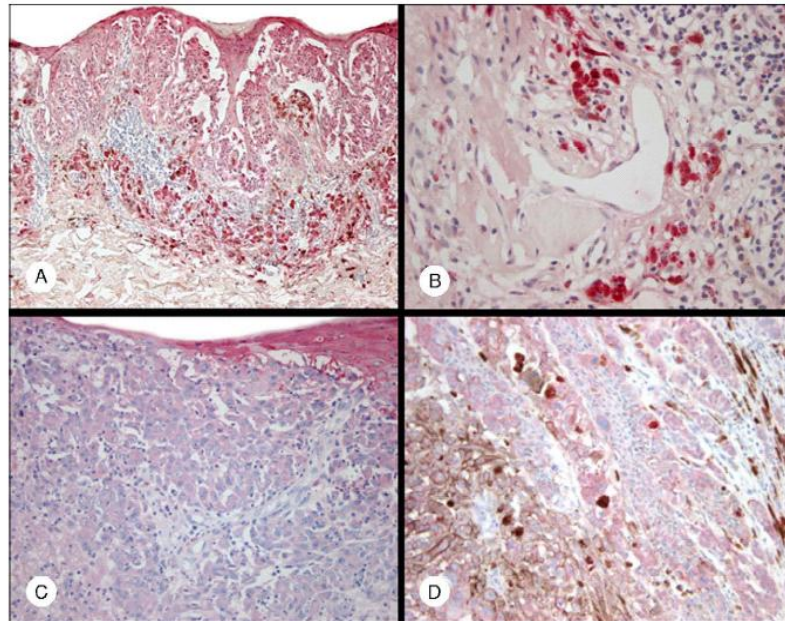


Fig. 2

Analisi immunocistochimica dell'espressione di iNOS in TAMs dello stroma tumorale di melanomi invasivi dell'uomo. Macrofagi iNOS-positivi sono presenti in grande quantità nei melanomi sottili (A), localizzati prevalentemente in sede peritumorale e spesso associati con l'infiltrato linfocitario intorno alle strutture vascolari (B). Una piccola quantità di macrofagi iNOS-positivi sono evidenziabili in melanomi spessi (C) e in lesioni metastatiche (D). Anche le cellule tumorali di melanomi primari e metastatici risultano iNOS-positive. Gli strati superficiali dell'epidermide e le strutture annesse mostrano una intensa e diffusa positività per iNOS. (Massi D, Marconi C, Franchi A *et al. Human Pathology* 2007; 38:1516-25).

Ulteriori analisi immunocistochimiche hanno mostrato che nei melanomi non metastatici i TAMs reattivi per arginasi si trovavano in percentuali variabili, ma le differenze non risultavano essere statisticamente significative. Nei melanomi metastatici invece, non erano presenti macrofagi esprimenti arginasi. Nella maggior parte dei melanomi analizzati, le cellule tumorali mostravano una moderata e diffusa positività all'arginasi.

Complessivamente è risultato che nei melanomi sottili, a crescita radiale, che sono quelli meno aggressivi, la percentuale di macrofagi che esprimevano arginasi, sia a livello peritumorale, sia a livello intratumorale, era inferiore rispetto ai TAMs esprimenti iNOS (Fig. 3).

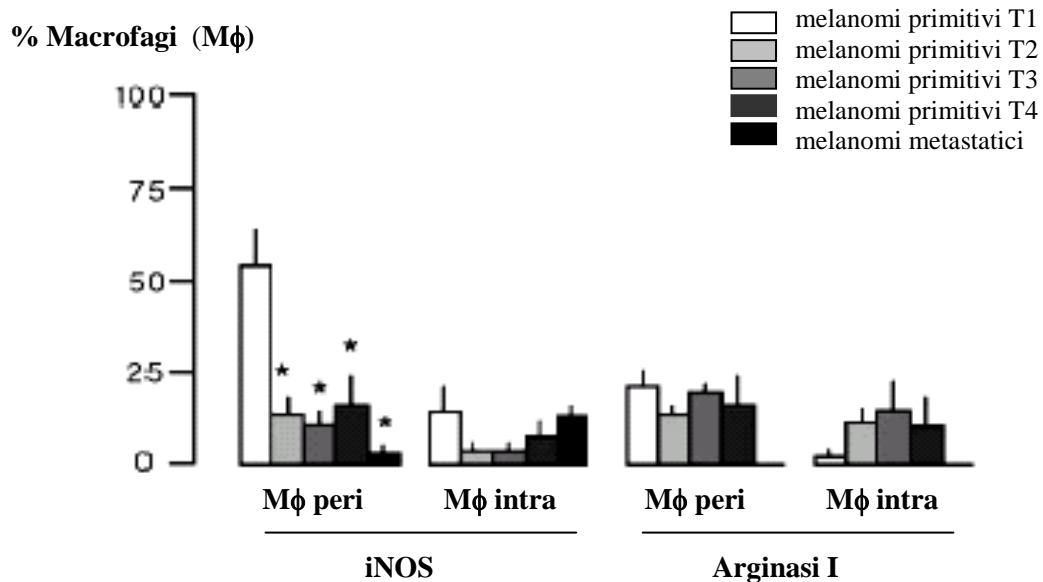


Fig. 3
Percentuale di macrofagi iNOS- e arginasi-positivi in melanomi primari invasivi ed in melanomi metastatici dell'uomo. I melanomi maligni primitivi analizzati venivano identificati in base al loro spessore: melanomi T1 hanno spessore 0.2-0.8 mm; melanomi T2 hanno spessore 1.5-2.08; melanomi T3 hanno spessore 2.2-3.9 mm; melanomi T4 hanno spessore 4.0-7.0 mm. (Massi D, Marconi C, Franchi A *et al.* *Human Pathology* 2007; 38:1516-25).

Espressione dell'RNAm di iNOS e di arginasi in macrofagi stimolati con vari agonisti ed in macrofagi esposti al contatto con cellule tumorali (Fig. 4)

Indagini condotte mediante RT-PCR hanno mostrato che macrofagi murini attivati *in vivo* con tioglicollato esprimevano bassi livelli di RNAm per iNOS e notevoli livelli di arginasi. E' opportuno ricordare che macrofagi attivati *in vivo* con tioglicollato riproducevano, secondo un classico schema di classificazione dello stato di attivazione dei macrofagi, lo stato di macrofago infiammatorio. L'espressione di RNAm per iNOS era stimolata in macrofagi esposti a TNF- α e diventava massima con esposizione a LPS o IFN- γ /LPS (Fig. 4A). L'espressione di RNAm per arginasi non variava nei macrofagi stimolati con varie citochine pro-infiammatorie.

Macrofagi attivati con tioglicollato mostravano un notevole aumento dei livelli di RNAm per iNOS anche quando venivano co-coltivati con cellule singeniche di melanoma murino F10-M3 (Fig. 4B). Tale aumento risultava essere un fenomeno indotto in modo specifico dalle cellule tumorali infatti, macrofagi co-coltivati con fibroblasti murini normali non mostravano livelli di RNAm per iNOS diversi da quelli di monostati macrofagici. Nelle condizioni sperimentali utilizzate né cellule di melanoma murino F10-M3 né fibroblasti normali esprimevano RNAm per iNOS. A differenza di quanto osservato per l'espressione di iNOS, i macrofagi co-coltivati con cellule tumorali non mostravano variazioni di espressione di RNAm per arginasi. L'assenza di variazioni dell'espressione di arginasi si verificava anche in macrofagi co-coltivati con fibroblasti normali. Inoltre, sia cellule di melanoma murino F10-M3, sia fibroblasti normali, esprimevano livelli apprezzabili di RNAm per arginasi.

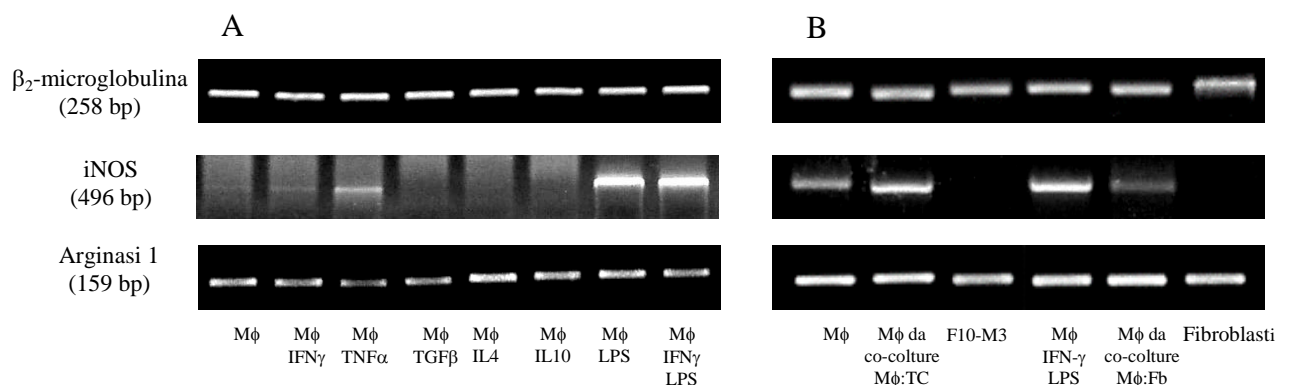


Fig. 4
Espressione di iNOS e di arginasi in macrofagi attivati *in vivo* con tioglicollato e stimolati *in vitro* con diversi agonisti (A) ed in macrofagi attivati *in vivo* con tioglicollato e poi co-coltivati con cellule di melanoma murino B16 o con fibroblasti murini normali (B).
(Massi D, Marconi C, Franchi A *et al.* *Human Pathology* 2007; 38:1516-25).

Produzione di ossido nitrico (NO) in terreni di coltura di monostati macrofagici ed in terreni di co-culture di macrofagi e cellule tumorali (Fig. 5)

La valutazione della produzione di ossido nitrico con il metodo di Griess, ha permesso di osservare che la produzione di NO da parte di macrofagi attivati *in vivo* con tioglicollato era modesta e non aumentava in macrofagi co-coltivati con cellule tumorali. Quando, invece, i macrofagi venivano co-coltivati con cellule di melanoma

murino F10-M3 in presenza di IFN- γ /LPS, producevano una maggiore quantità di NO rispetto ai monostrati macrofagici. L'IFN- γ è risultato responsabile dell'aumento di NO osservato. Infatti, l'ossido nitrico prodotto dai macrofagi attivati da tioglicollato co-coltivati con cellule F10-M3 risultava potenziato da dosi crescenti di IFN- γ in presenza di una piccola dose di LPS, ma non da dosi crescenti di LPS in presenza di una piccola dose di IFN- γ (Fig. 5A-B). Il fenomeno è risultato ancora più evidente per un di tempo di co-coltura di macrofagi e cellule tumorali di 48 ore (Fig. 5C-D). La quantità di NO rilasciata dai macrofagi co-coltivati con cellule tumorali raggiungeva il valore massimo in presenza di IFN- γ 100 U/mL e LPS 10 ng/mL. Questo livello di NO era responsabile di una citotossicità pari al 25% nei confronti delle cellule tumorali F10-M3, valutata mediante il test di esclusione del colorante vitale Trypan blue.

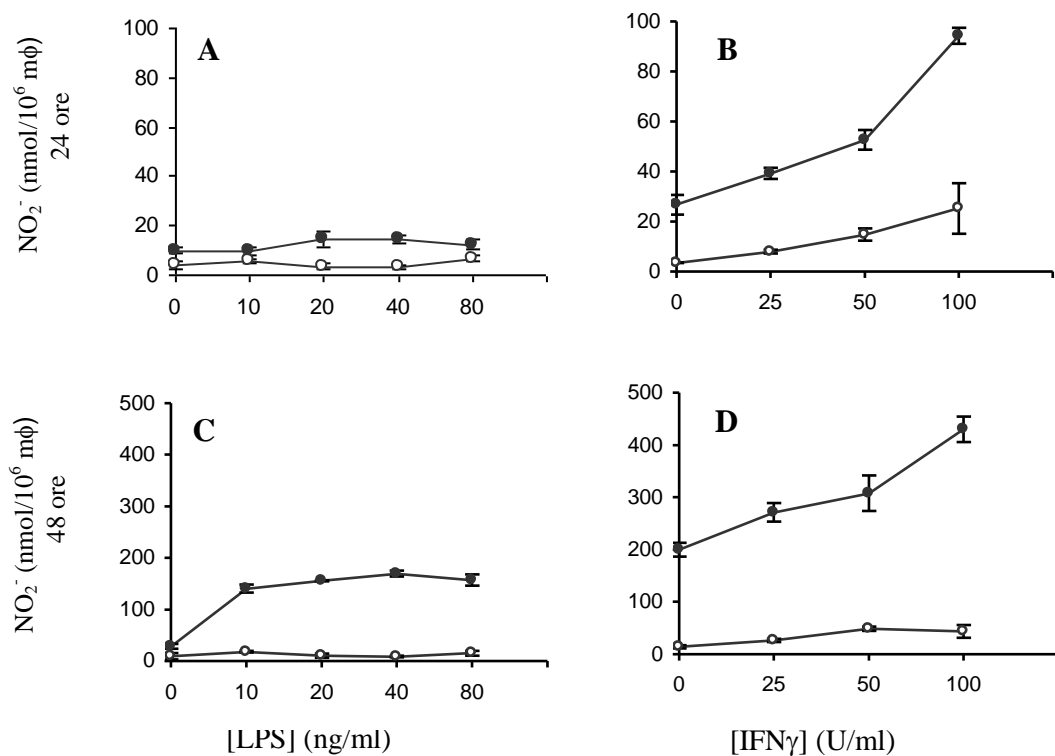


Fig. 5

Produzione di NO $_2^-$ da parte di macrofagi attivati con tioglicollato (\circ) e di macrofagi attivati con tioglicollato e poi co-coltivati per 24 ore (A,B) o per 48 ore (C,D) con cellule di melanoma murino B16 (\bullet) in presenza di IFN- γ /LPS. Macrofagi e cellule tumorali vengono trattate con IFN γ 25 U/mL e concentrazioni crescenti di LPS (A,C), o con LPS 10 ng/mL e concentrazioni crescenti di IFN γ (B,D). La quantità di NO $_2^-$ secreta dai macrofagi attivati da tioglicollato co-coltivati per 48 ore con le cellule tumorali in assenza di IFN γ /LPS è 9.2 ± 4.2 nmol/10 6 macrofagi e questa quantità non è diversa da quella secreta dai monostrati macrofagici (12.3 ± 3.8 nmol/10 6 macrofagi). (Massi D, Marconi C, Franchi A *et al. Human Pathology* 2007; 38:1516-25).

Espressione di COX-2 su sezioni istologiche di melanomi umani a vario grado di malignità (Fig. 6)

Analisi immunohistochimiche condotte su sezioni istologiche di melanomi dell'uomo a vario grado di malignità hanno mostrato che i macrofagi CD68-positivi che esprimevano COX-2 erano pressoché assenti in nevi comuni benigni ed in nevi displastici, mentre erano presenti nei melanomi primitivi e nei melanomi in stadio più avanzato (Fig. 6A-F). La presenza di TAMs esprimenti COX-2, localizzati prevalentemente sul fronte invasivo del tumore, risultava maggiore nei melanomi *in situ* e nei melanomi sottili (a crescita radiale) rispetto ai melanomi invasivi e metastatici,. Queste analisi hanno permesso, inoltre, di osservare che COX-2 non è espressa nei melanociti delle lesioni benigne, ma è espressa dalle cellule di melanomi primari e di lesioni metastatiche.

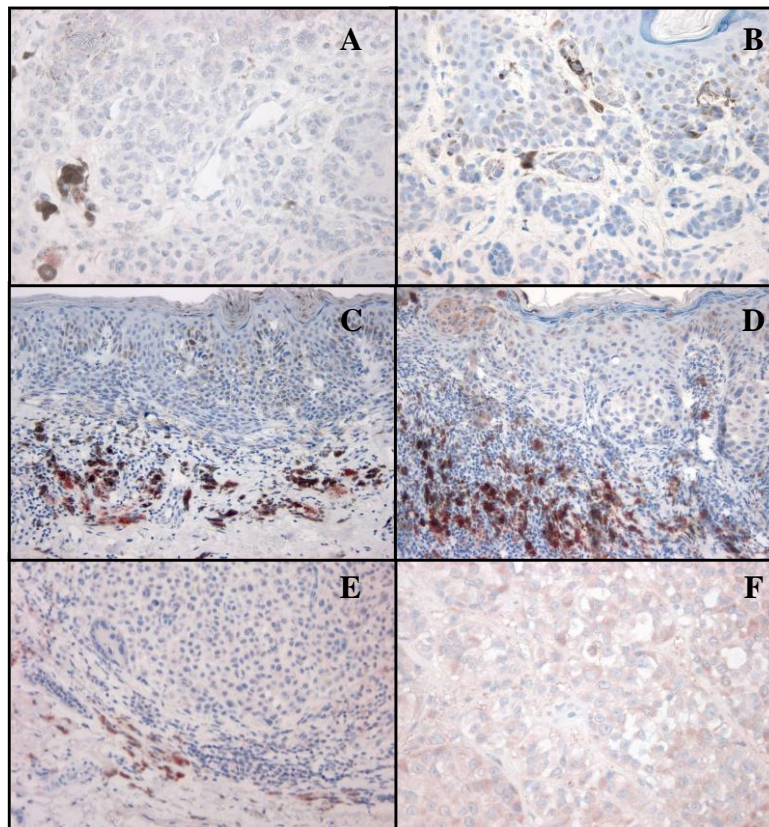


Fig. 6. **Analisi immunohistochimica dell'espressione di COX-2 in TAMs dello stroma tumorale di melanomi invasivi dell'uomo.** Una piccola percentuale di TAMs esprime COX-2 in nevi comuni benigni (A) ed in nevi displastici (B), mentre una elevata quantità di TAMs COX-2-positivi si osservano in melanomi *in situ* (C) e melanomi sottili (D). Non si osservano TAMs COX-2-positivi in melanomi in stadio avanzato (E) ed in melanomi metastatici (F). (Bianchini F, Massi D, Marconi C *et al.* *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 2007; 83:320-8).

Espressione di COX-2 in macrofagi esposti al contatto con cellule tumorali

(Fig. 7)

Mediante tecniche di RT-PCR è stato osservato che l'espressione di RNAm per COX-2 veniva indotta in macrofagi peritoneali murini attivati *in vivo* con tioglicollato, stimolati con IFN- γ /LPS (Fig. 7A). L'espressione di COX-2 veniva inoltre promossa nei macrofagi co-coltivati con cellule di melanoma murino F10-M3. Questo effetto risultava potenziato quando macrofagi e cellule tumorali venivano co-coltivati in presenza di IFN- γ /LPS (Fig. 7B). A differenza di quanto accadeva nei macrofagi, le cellule tumorali recuperate dalle co-culture non esprimevano COX-2 né in assenza né in presenza degli agenti infiammatori. L'attività promuovente l'espressione di COX-2 mediata dalle cellule F10-M3 dipendeva in modo specifico dalle cellule tumorali in quanto COX-2 non era indotta nei macrofagi co-coltivati con fibroblasti murini normali.

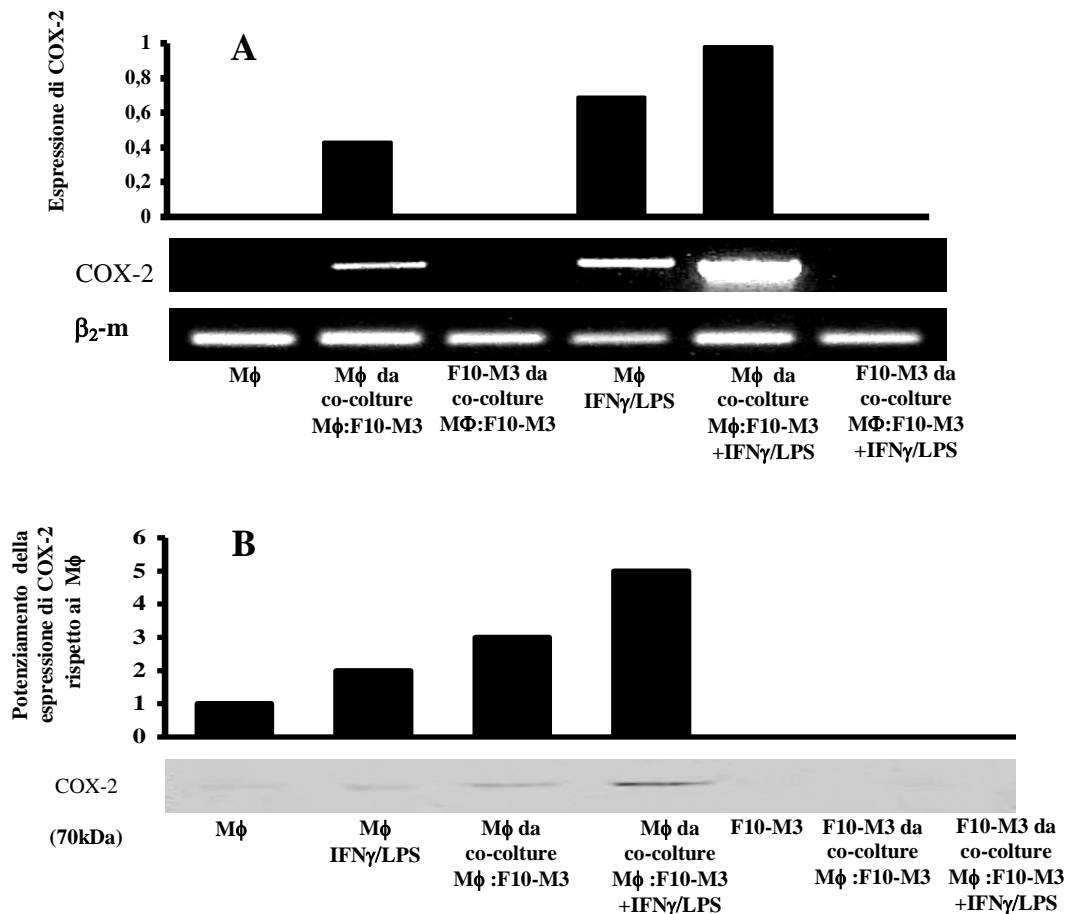


Fig. 7

Espressione di RNAm (A) e proteina (B) per COX-2 in macrofagi attivati con tioglicollato (Mφ) co-coltivati con cellule di melanoma murino F10-M3, in preseza o in assenza di IFN γ /LPS. (Bianchini F, Massi D, Marconi C et al. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 2007; 83:320-8).

Espressione di uPA/uPAR e di MMPs in macrofagi esposti al contatto con cellule tumorali (Fig. 8, 9)

La Fig. 8A mostra che macrofagi attivati con tioglicollato esprimevano elevati livelli di RNAm per uPA, uPAR, MMP-9 e MMP-2 in seguito a stimolazione con IFN- γ /LPS. La figura mostra, inoltre, che i macrofagi co-coltivati con cellule di melanoma murino F10-M3 esprimevano maggiori livelli di RNAm per uPAR e MMP-9 rispetto ai macrofagi che non erano stati a contatto con le cellule tumorali. L'aumento di espressione di RNAm per MMP-9 si associava ad una più elevata attività pro-MMP-9 nei terreni di co-coltura di macrofagi e cellule tumorali, valutata mediante zimografia (Fig. 8B). L'analisi mediante Western Blot ha dimostrato che all'aumento di espressione di RNAm per uPAR nei macrofagi co-coltivati con cellule F10-M3 si associava un aumento anche della proteina (Fig. 8C). Il potenziamento della espressione di uPAR e di MMP-9 non era mediato da fattori solubili infatti, non variava in macrofagi co-coltivati con cellule F10-M3 in piastre comunicanti, o coltivati nel terreno condizionato dalle stesse cellule tumorali (Fig. 9A). Fibroblasti normali non modificavano l'espressione di uPAR/uPA e MMP-9 nei macrofagi (Fig. 9B).

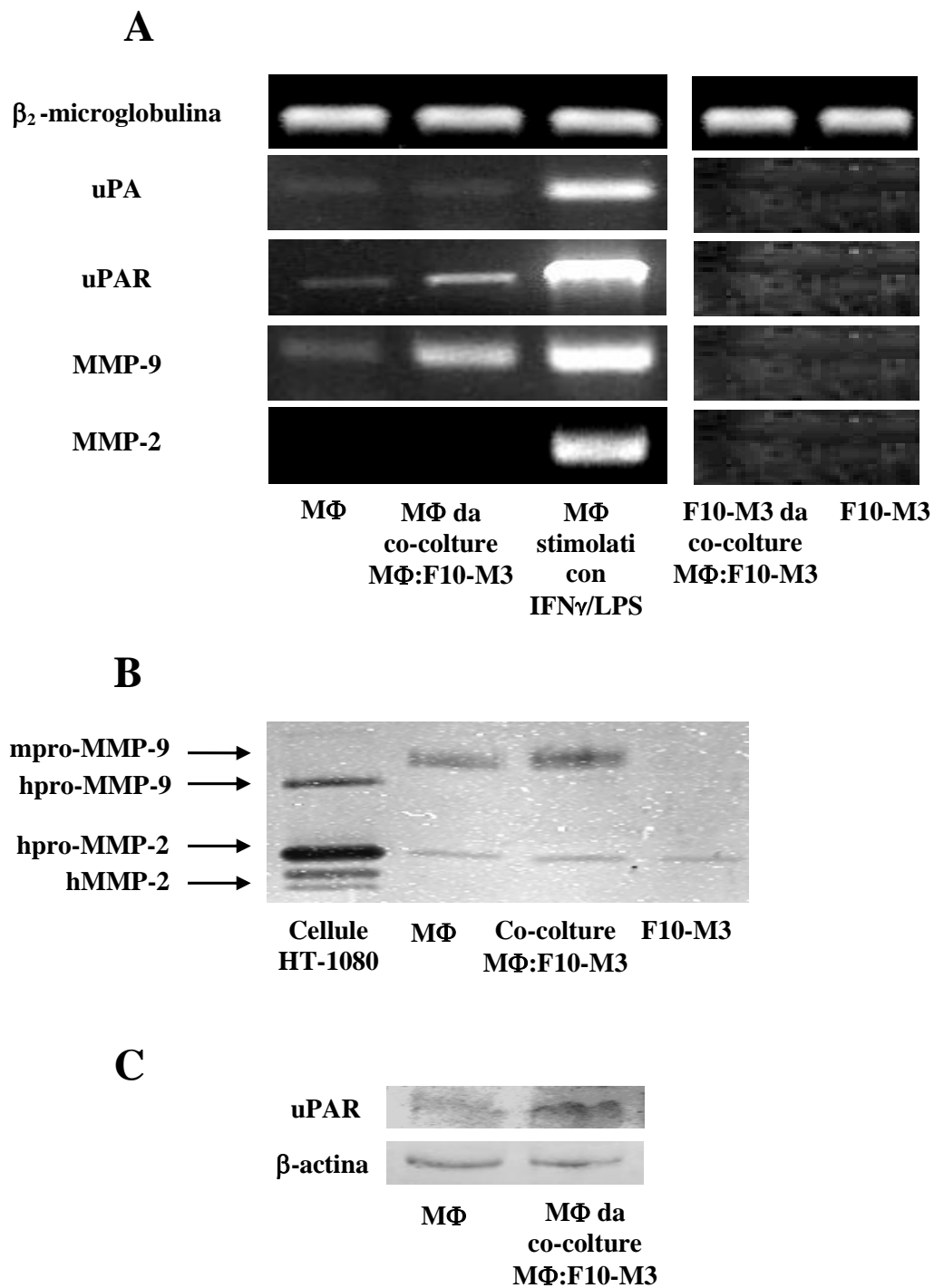


Fig. 8

Espressione di attività proteasiche in macrofagi esposti al contatto con cellule di melanoma F10-M3. RNAm per uPA, uPAR, MMP-9 e MMP-2 in macrofagi attivati *in vivo* con tioglicollato e co-cultivati con cellule di melanoma murino F10-M3 o stimolati *in vitro* con IFN- γ /LPS, e in cellule F10-M3 cresciute in condizioni standard o co-cultivate con macrofagi (A). Espressione delle proteasi MMP-9 e MMP-2 secrete in terreni condizionati da macrofagi coltivati in assenza o in presenza di cellule tumorali valutata mediante Zimografia (B). Espressione di uPAR in macrofagi co-cultivati con cellule tumorali valutata mediante Western Blot (C). (Marconi C, Bianchini F, Mannini A *et al.* *Clin Exp Metastasis* 2008; 25:225-31).

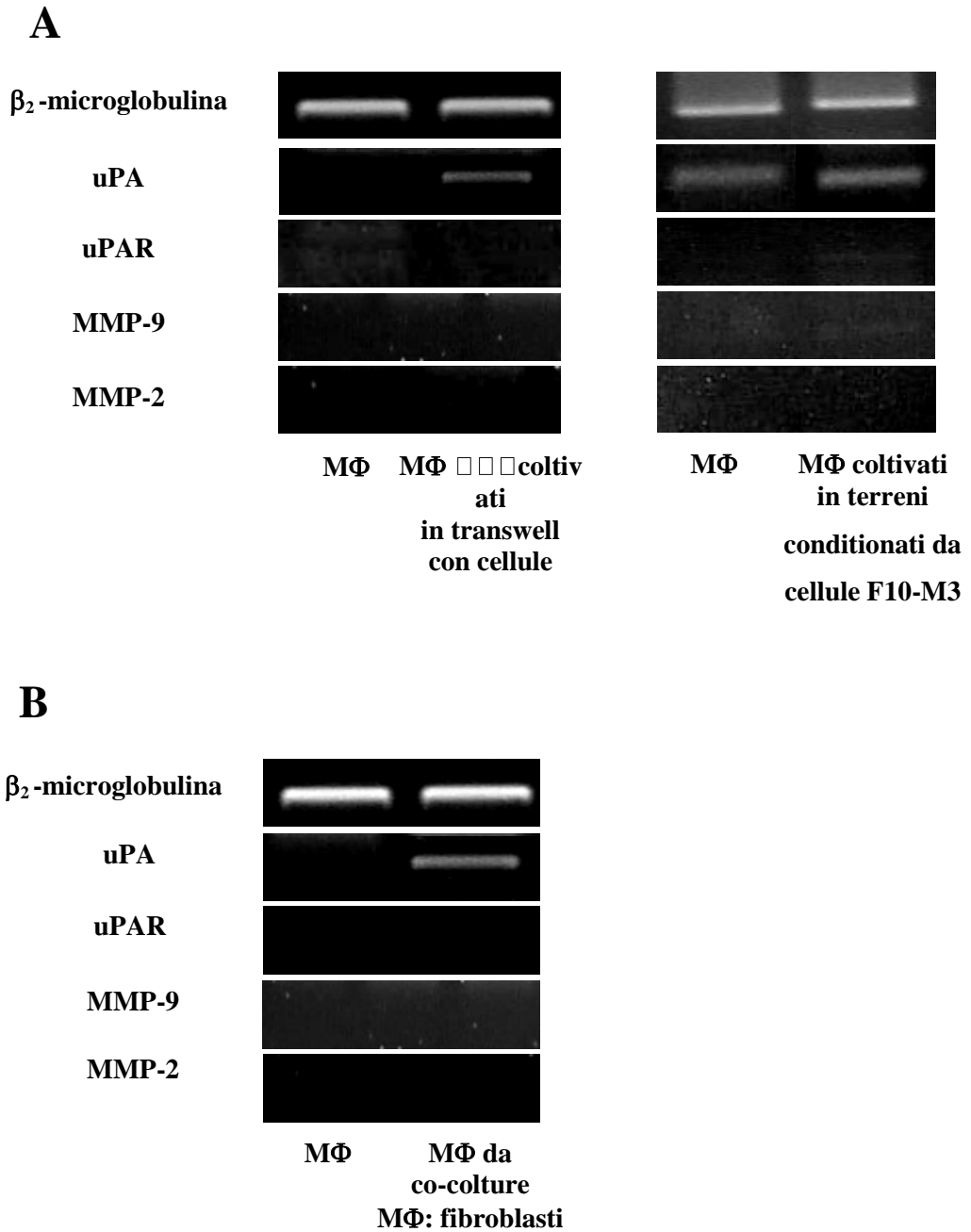
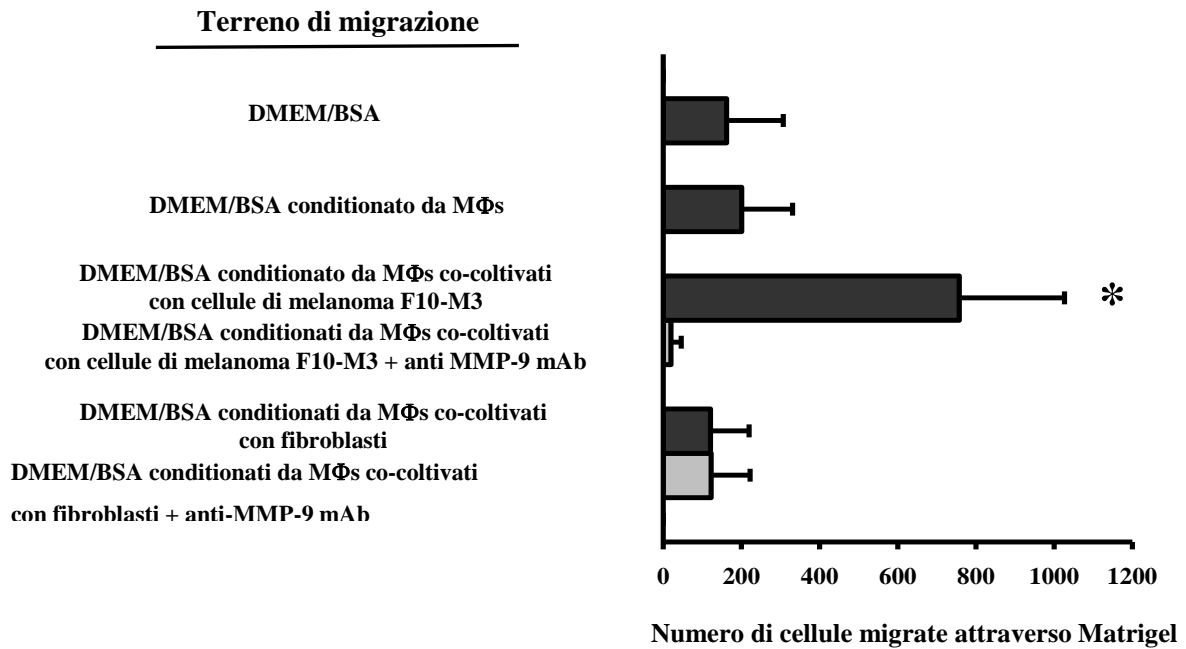
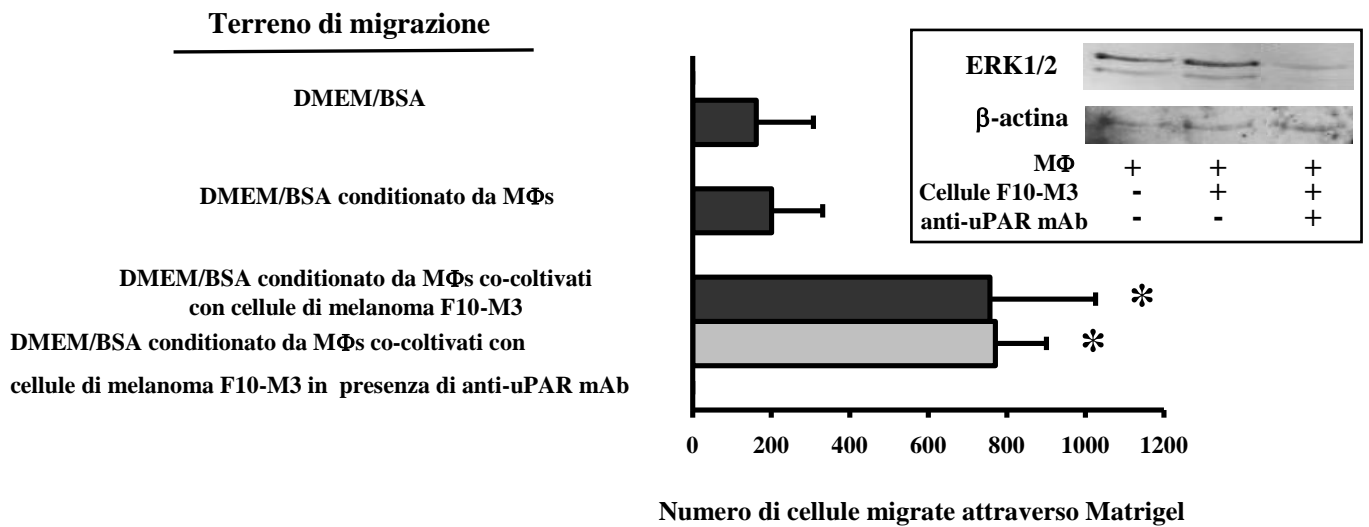


Fig. 9

Espressione di mRNA di uPA, uPAR, MMP-9 e MMP-2 in macrofagi attivati *in vivo* con tioglicollato e coltivati in transwell con cellule di melanoma murino F10-M3 o in terreni condizionati dalle stesse cellule tumorali (A). Espressione di mRNA di uPA, uPAR, MMP-9 e di MMP-2 in macrofagi attivati *in vivo* con tioglicollato e co-cultivati con fibroblasti murini normali (B). (Marconi C, Bianchini F, Mannini A *et al.* *Clin Exp Metastasis* 2008; 25:225-31).

Capacità invasiva delle cellule F10-M3 in terreni condizionati da co-culture di macrofagi e cellule tumorali (Fig. 10)

Test di invasività attraverso Matrigel hanno mostrato che cellule di melanoma murino F10-M3 acquisivano una maggiore capacità invasiva quando il test di migrazione veniva eseguito con cellule risospese in terreni condizionati da co-culture di macrofagi e cellule tumorali. Questo effetto veniva abolito dalla presenza di anticorpi monoclonali anti-MMP-9 aggiunti prima del test di migrazione ai terreni condizionati. Cellule F10-M3 non modificavano la loro capacità invasiva quando venivano risospese in terreni condizionati da co-culture di macrofagi e fibroblasti murini normali (Fig. 10A). L'aumento della capacità invasiva promosso nelle cellule F10-M3 dal terreno di co-cultura di macrofagi e cellule tumorali non era abolito dalla presenza di anticorpi monoclonali anti-uPAR (Fig. 10B). Anticorpi anti-uPAR nei terreni di co-cultura abolivano l'aumento di espressione di ERK 1/2 che si verificava nel macrofago a contatto con le cellule tumorali (pannello Fig. 10B).

A**B****Fig. 10**

Capacità invasiva di cellule di melanoma murino F10-M3 migrate in: (A) DMEM/BSA condizionato da co-culture di macrofagi e cellule F10-M3, in presenza di anticorpi monoclonali anti-MMP-9; (B) DMEM/BSA condizionato da co-culture di macrofagi e cellule F10-M3 realizzate in presenza di anticorpi monoclonali anti-uPAR. Espressione della proteina ERK1/2 in macrofagi co-coltivati con cellule tumorali in presenza o assenza di anticorpi monoclonali anti-uPAR (riquadro pannello B). * Valore significativamente diverso da quello ottenuto in cellule migrate in DMEM/BSA ($p < 0.05$). (Marconi C, Bianchini F, Mannini A *et al. Clin Exp Metastasis* 2008; 25:225-31).

2) EFFETTO DI ALCUNE CITOCHINE INFIAMMATORIE SULLA DIFFUSIONE METASTATICA DI CELLULE TUMORALI ED ESPRESSIONE DI RECETTORI CITOCHINICI

Colonizzazione polmonare di cellule di melanoma murino F10-M3 stimulate con alcune citochine infiammatorie (Tabella 1).

Cellule F10-M3 cresciute in terreni standard e inoculate nella vena caudale di topi singenici davano origine ad un numero limitato di colonie polmonari superficiali e l'esposizione delle cellule a IL-1 β , IL-6, o TNF- α non modificava il loro potenziale metastatico. Tuttavia, se le cellule di melanoma venivano esposte a basse dosi di IFN- γ prima di essere stimulate con le citochine, il loro potenziale di colonizzazione polmonare risultava incrementato. L'effetto più pronunciato si osservava con l'inoculo di cellule F10-M3 stimulate con IFN- γ /TNF- α (Tabella 1).

Tabella 1. Modificazione del potenziale di colonizzazione polmonare di cellule di melanoma murino F10-M3 stimulate con IL-1 β (300 U/mL), IL-6 (300 U/mL) o TNF α (25 ng/mL) dopo trattamento con IFN γ (25 U/mL).

Trattamento in coltura		Colonizzazione polmonare	
Giorno 1	Giorno 2	Mediana (intervallo)	Peso polmoni (mg) media \pm SEM
—	—	1 (0-2)	265 \pm 58.6
IFN γ	—	11 (8-13)	275 \pm 2.5
—	IL-1 β	1 (0-13)	273 \pm 23.9
—	IL-6	0 (0-4)	249 \pm 56.8
—	TNF- α	15 (6-29)	290 \pm 9.1
IFN γ	IL-1 β	128 (53-172)*	457 \pm 55.9*
IFN γ	IL-6	143 (86-172)*	446 \pm 33.1*
IFN γ	TNF- α	>200*	703 \pm 76.8*

* Valore significativamente diverso da quello ottenuto dall'inoculo di cellule cresciute in terreno standard (p<0.05).

Colonizzazione polmonare e capacità invasiva di cellule di melanoma murino F10-M3 stimulate con IFN- γ (Fig. 11).

Il potenziale di colonizzazione polmonare di cellule F10-M3 stimulate con IFN- γ 25 U/mL rimaneva invariato rispetto a quello delle cellule tumorali cresciute in terreni standard. L'esposizione a terreni contenenti IFN- γ 50 o 100 U/mL determinava un aumento significativo del potenziale di colonizzazione polmonare delle cellule F10-M3, determinato in base al numero di colonie polmonari superficiali osservabili con l'uso del microscopio da dissezione (Fig. 11A).

Test *in vitro* di invasività attraverso Matrigel hanno mostrato che l'esposizione a terreni di coltura contenenti IFN- γ 100 U/mL stimolava nelle cellule F10-M3 un incremento delle loro capacità invasive, se confrontate con le cellule coltivate in terreni standard o in terreni contenenti IFN- γ 25-50 U/mL (Fig.11B).

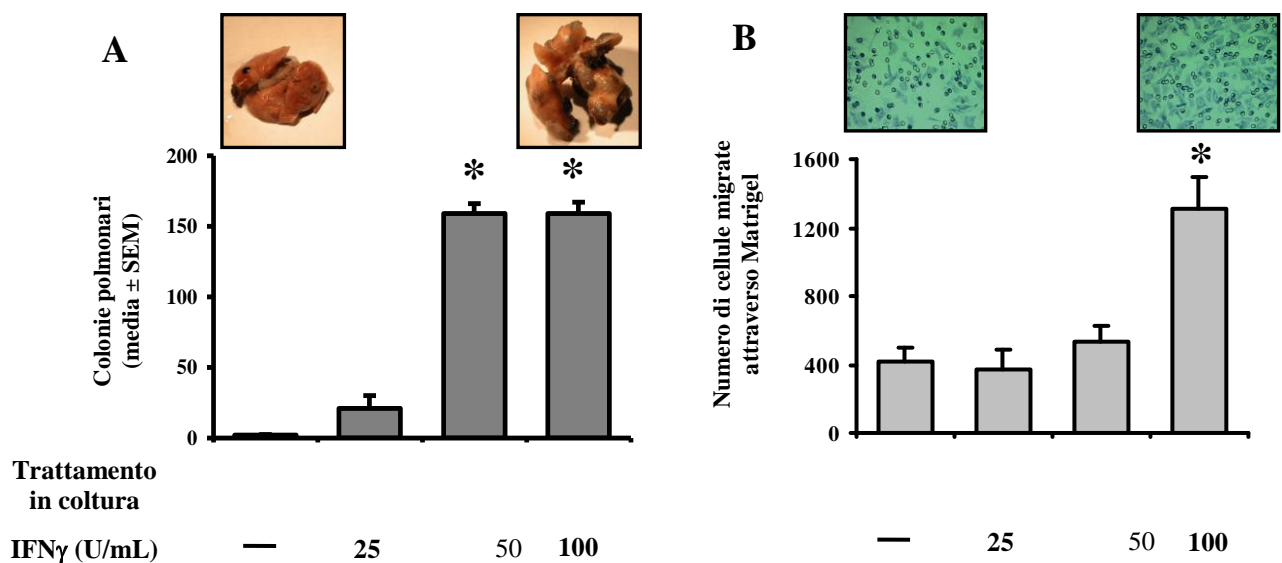


Fig. 11

Effetto dell'esposizione a dosi crescenti di IFN- γ sulla colonizzazione polmonare (A) e sulla capacità invasiva (B) di cellule di melanoma murino F10-M3. * Valore significativamente diverso da quello ottenuto in cellule coltivate in terreno standard ($p < 0.05$).

Espressione dei recettori per IL-1 β , IL-6 e TNF- α in cellule di melanoma murino F10-M3 stimulate con IFN- γ (Fig. 12).

Mediante tecniche di RT-PCR è stata valutata l'espressione di RNAm per il recettore di tipo 1 dell'IL-1 β , per il recettore α dell'IL-6 e per il recettore p55 del TNF- α . La Figura 12 mostra che cellule F10-M3 cresciute in terreni standard esprimevano modesti livelli di RNAm per i recettori oggetto dello studio. Tali livelli incrementavano in seguito all'esposizione delle cellule F10-M3 a terreni di coltura contenenti concentrazioni crescenti di IFN- γ .

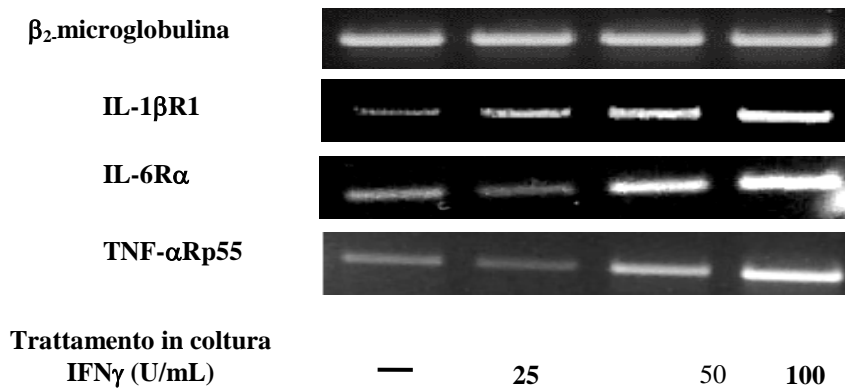


Fig. 12
Espressione di mRNA di IL-1 β R1, IL-6R α e TNF- α Rp55 in cellule di melanoma murino F10-M3 stimulate con dosi crescenti di IFN- γ (25-100 U/mL).

Effetto di JAK Inhibitor I sulla espressione dei recettori per IL-1 β , IL-6 e TNF- α in cellule di melanoma murino F10-M3 stimulate con IFN- γ e sulla loro capacità invasiva (Fig. 13, 14).

L'analisi citofluorimetrica riportata nella figura 13 mostra che JAK Inhibitor I aboliva l'aumento delle proteine IL-1 β R1, IL-6R α e TNF- α Rp55 determinato in cellule F10-M3 dalla esposizione a IFN- γ 100 U/mL. Ricorderò che JAK Inhibitor I è un inibitore del fattore di trascrizione JAK1 coinvolto nella via di segnalazione JAK-dipendente attivata dal legame dell'IFN- γ con il suo recettore. La figura 14 mostra che JAK Inhibitor I aboliva l'aumento delle capacità invasive delle cellule F10-M3 stimulate con IFN- γ 100 U/mL.

Trattamento in coltura

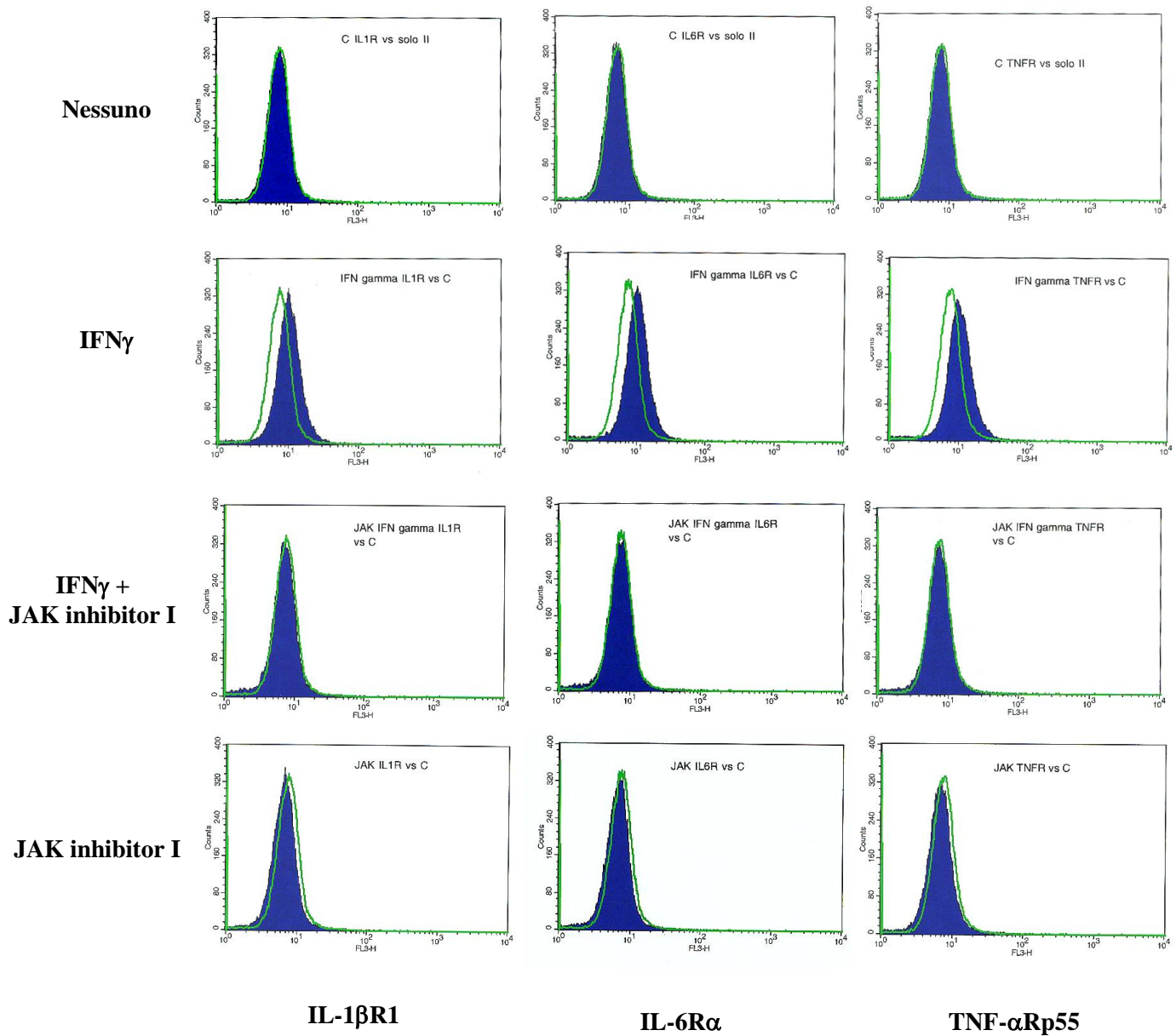
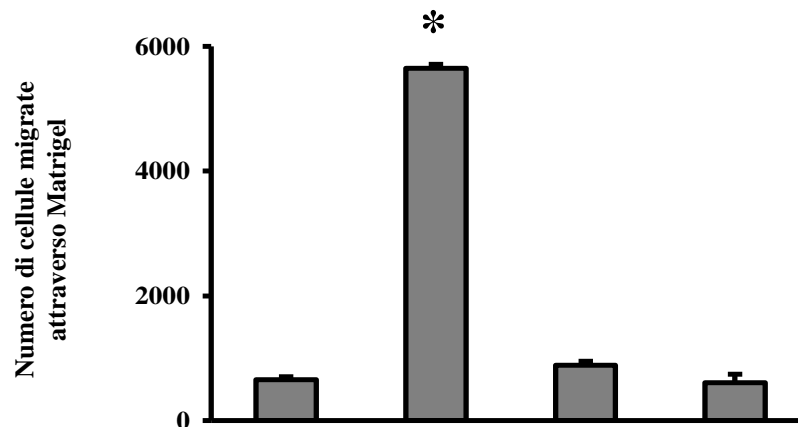


Fig. 13

Analisi citofluorimetrica della espressione di IL-1βR1, IL-6Rα e TNF-αRp55 in cellule di melanoma murino F10-M3 stimulate con IFN-γ 100 U/mL in presenza ed in assenza di JAK Inhibitor I.



Trattamento in coltura

— IFN γ JAK inhibitor I AG490
 (100 U/ml) + IFN γ + IFN γ

Terreno di migrazione

DMEM/BSA DMEM/BSA DMEM/BSA DMEM/BSA

Fig. 14

Capacità invasiva di cellule di melanoma murino F10-M3 stimulate con IFN- γ 100 U/mL in presenza ed in assenza di JAK Inhibitor I. * Valore significativamente diverso da quello ottenuto in cellule migrate in DMEM/BSA ($p < 0.05$). (Marconi C, Bianchini F, Mannini A *et al. Clin Exp Metastasis* 2008; 25:225-31).

Effetto di JAK Inhibitor I sul potenziale metastatico di cellule di melanoma murino F10-M3 in animali immuno-compromessi (Fig. 15).

Mediante analisi in RT-PCR è stato osservato che il trattamento con JAK Inhibitor I inibiva l'espressione di RNAm per i recettori citochinici IL-1 β R1, IL-6R α , TNF- α Rp55, TGF- β R1 e IFN- γ R in cellule F10-M3 (Fig. 15A). L'effetto non si verificava quando le cellule tumorali venivano trattate con Tirfostina A47 o con Rottlerina. L'effetto inibitorio di JAK Inhibitor I si presentava come un fenomeno transiente infatti, dopo 24 ore dalla rimozione dell'inibitore dal terreno di coltura, cellule F10-M3 ristabilivano un profilo di espressione di RNAm per i recettori indagati simile a quello delle cellule tumorali non trattate. Nella Figura 15B si osserva che cellule F10-M3 trattate con JAK Inhibitor I e inoculate in animali singenici trattati con ciclofosfamide, che è un noto inibitore dell'attività delle cellule *Natural Killer* (NK), formavano una quantità di colonie polmonari invariate rispetto alle cellule non trattate, ma davano origine ad un numero di colonie epatiche significativamente inferiore rispetto alle cellule cresciute in terreno standard.

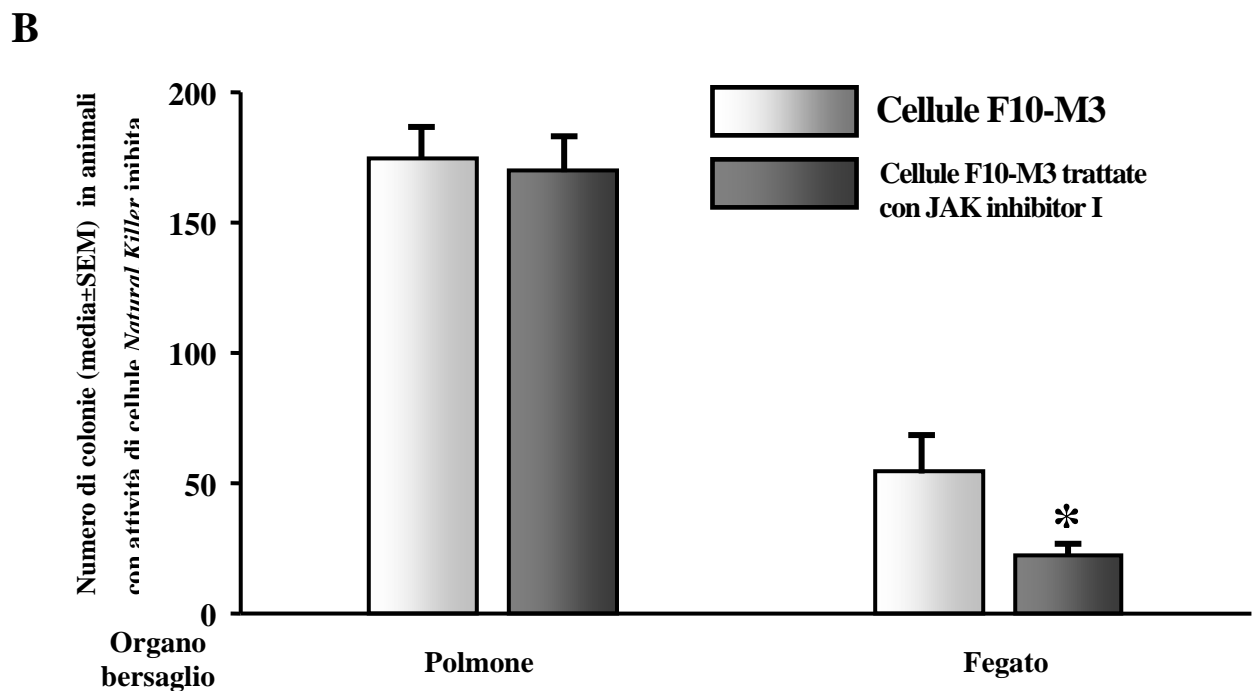
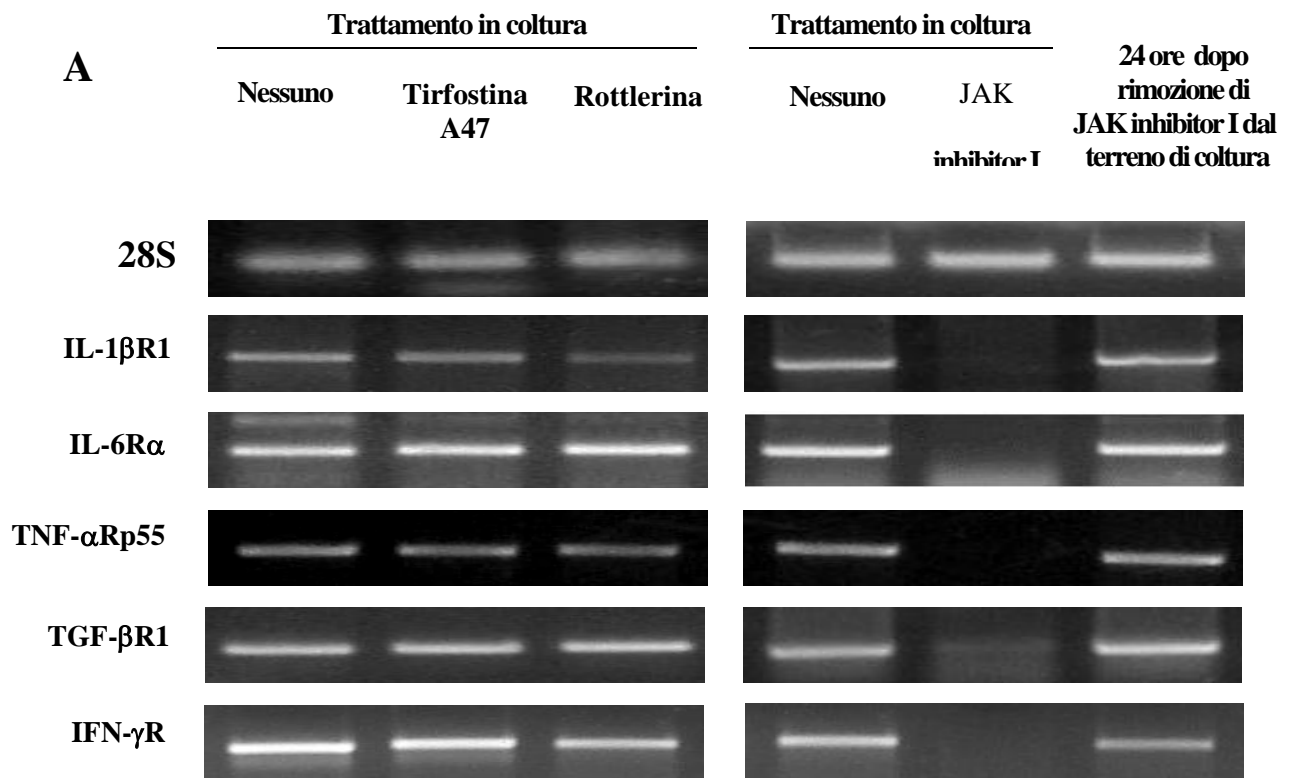


Fig. 15

Effetto di JAK Inhibitor I sulla espressione dell'RNAm per recettori per citochine infiammatorie in cellule di melanoma murino F10-M3 (A) e sulla colonizzazione metastatica in animali immunocompromessi (B). * Valore significativamente diverso da quello ottenuto con l'inoculo di cellule cresciute in terreno standard ($p < 0.05$).

3) EFFETTO DELL'IP OSSIA SULL'ESPRESSIONE DI VEGF-A E VEGF-C E SULL'ESPRESSIONE DI PROTEASI NEI TAMs E NELLE CELLULE TUMORALI

Espressione di VEGF-C su sezioni istologiche di melanomi umani a vario grado di malignità (Fig. 16, 17)

Analisi immunoistochimiche condotte su sezioni istologiche di melanomi invasivi dell'uomo hanno permesso di osservare che i cellule CD68-positive, che esprimono VEGF-C erano localizzati prevalentemente in sede peritumorale, spesso in stretto contatto con l'infiltrato linfocitario e con le strutture vascolari (Fig. 16A-D). A livello intratumorale, i TAMs VEGF-C-positivi erano limitati in numero e potevano presentarsi associati in gruppi o come cellule singole (Fig. 17A-D). L'intensità di espressione di VEGF-C nei TAMs era superiore a quella delle cellule tumorali vicine.

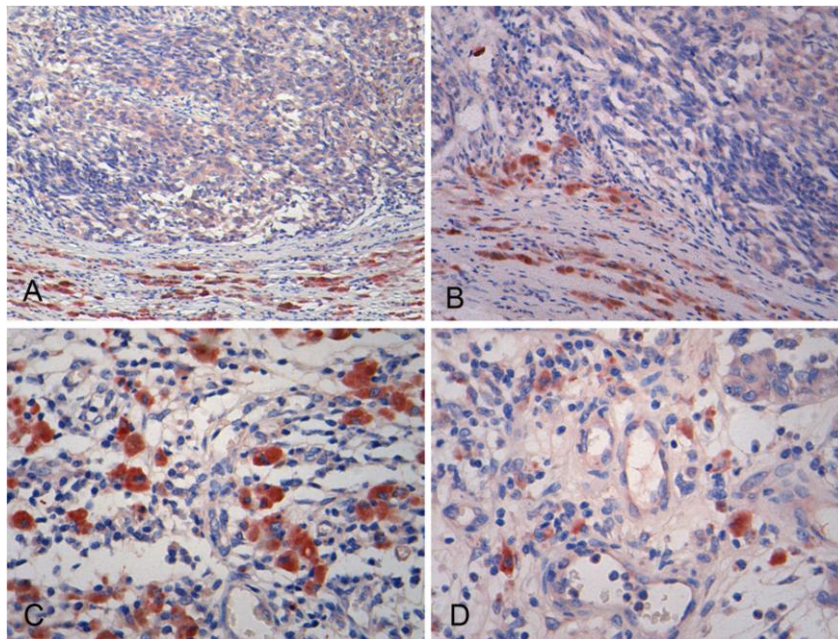


Fig. 16

Analisi immunoistochimica dell'espressione di VEGF-C in TAMs presenti in sede peritumorale in melanomi invasivi dell'uomo. Un elevato numero di macrofagi associati al tumore VEGF-C-positivi sono presenti in sede peritumorale in un melanoma a crescita verticale (A) e la reattività di VEGF-C nei macrofagi è maggiore rispetto a quella nelle cellule di melanoma (B). I macrofagi peritumoral VEGF-C-positivi sono in stretto contatto con l'infiltrato linfocitario (C) e con le strutture vascolari (D).

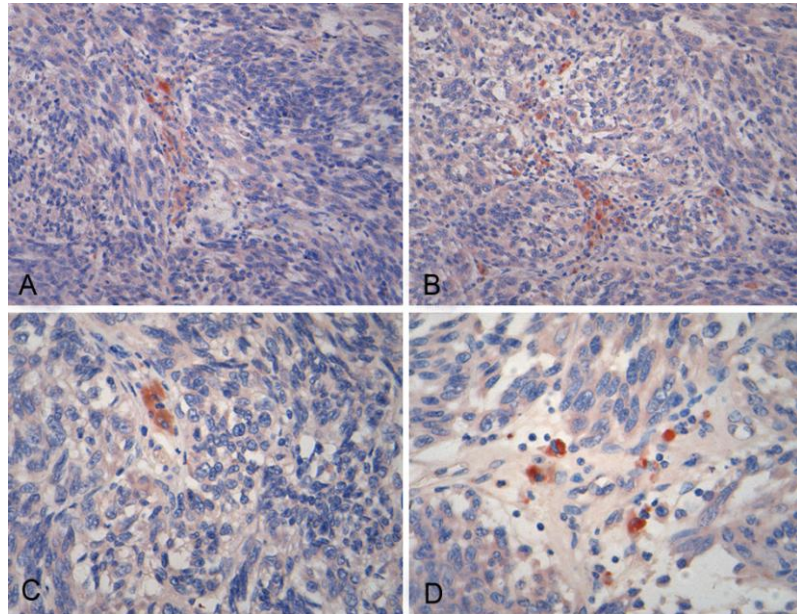


Fig. 17

Analisi immunohistochemica dell'espressione di VEGF-C in TAMs presenti in sede intratumorale in melanomi invasivi dell'uomo. All'interno della massa tumorale di melanomi a crescita verticale è presente un basso numero di macrofagi associati al tumore VEGF-C-positivi (A). Tali macrofagi possono essere uniti in gruppi (B), o possono essere presenti come singole cellule (C). I TAMs intratumorali VEGF-C-positivi sono in contatto con aree necrotiche (D).

Effetto dell'ipossia sull'espressione di VEGF-A e VEGF-C in macrofagi umani coltivati in vitro (Fig. 18)

La Figura 18A mostra che cellule di linfoma istiocitario U937 differenziate in macrofagi mediante stimolazione con TPA, esprimevano maggiori livelli di RNAm per VEGF-A quando venivano esposte a una tensione di ossigeno dello 0.1%, mentre non presentavano variazioni nell'espressione di RNAm per VEGF-C. L'analisi delle proteine mediante Western Blot ha confermato che l'ipossia induce, nelle cellule U937, l'espressione di VEGF-A, ma non di VEGF-C (Fig. 18B). L'espressione della proteina HIF-1 α , nelle cellule U937 ipossiche, era utilizzata come controllo dello stato ipossico.

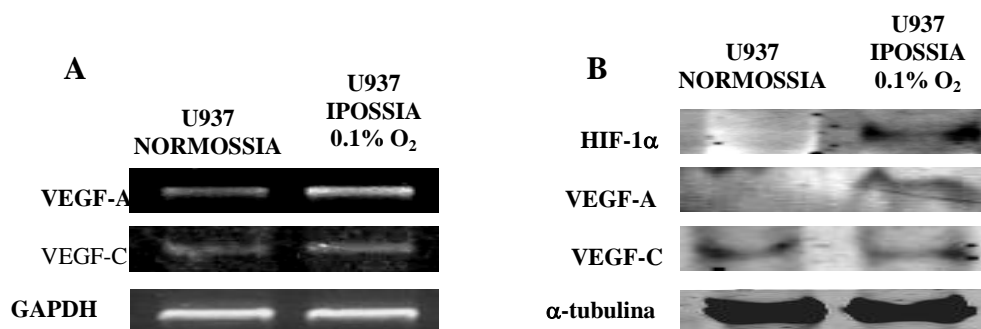


Fig. 18

Effetto dell'ipossia sulla espressione di mRNA (A) di VEGF-A e il VEGF-C e delle proteine (B) in macrofagi umani (cellule U937 stimulate con TPA).

Effetto dell'ipossia sull'espressione di VEGF-A e VEGF-C in cellule di melanoma dell'uomo (Fig. 19, 20, 21)

Tecniche di RT-PCR hanno mostrato che cellule A375 derivate da un melanoma primitivo dell'uomo, e cellule di melanoma Hs294T derivate da una lesione metastatica linfonodale, esprimono maggiori livelli di RNAm per VEGF-A se esposte ad ipossia. L'effetto dell'ipossia veniva abolito quando le cellule, dopo essere state incubate in ambiente ipossico, venivano esposte ad una tensione di ossigeno del 21% (Fig. 19A). I livelli di espressione di RNAm per VEGF-C venivano down-regolati in ipossia in entrambe le linee cellulari e si ristabilivano con la riossigenazione. L'analisi delle proteine ha confermato che l'ipossia induceva il VEGF-A e down-regolava il VEGF-C sia in cellule A375 sia in cellule Hs294T (Fig.19B). L'effetto dell'ipossia osservato nelle due linee di cellule tumorali è stato confermato da una ulteriore indagine dell'espressione di RNAm per VEGF-A e VEGF-C in PCR Real-Time (Fig. 20).

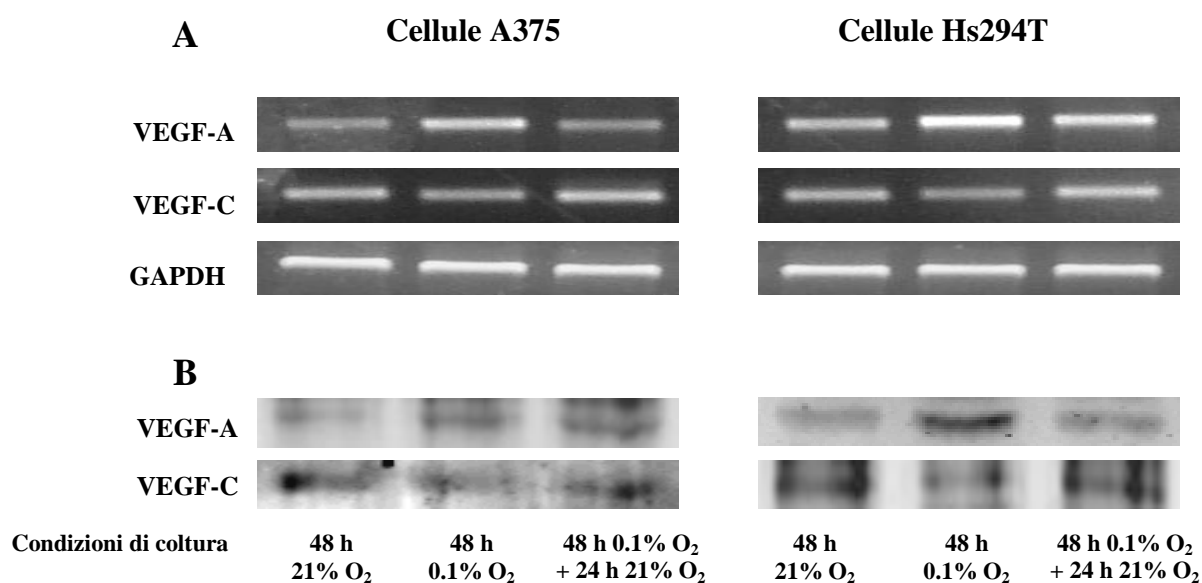


Fig. 19

Effetto dell'ipossia sulla espressione di mRNA (A) di VEGF-A e il VEGF-C valutata mediante RT-PCR e delle proteine valutata mediante immunoprecipitazione (B) in cellule A375 derivate da un melanoma primitivo dell'uomo e in cellule di melanoma Hs294T derivate da una lesione metastatica linfonodale dell'uomo.

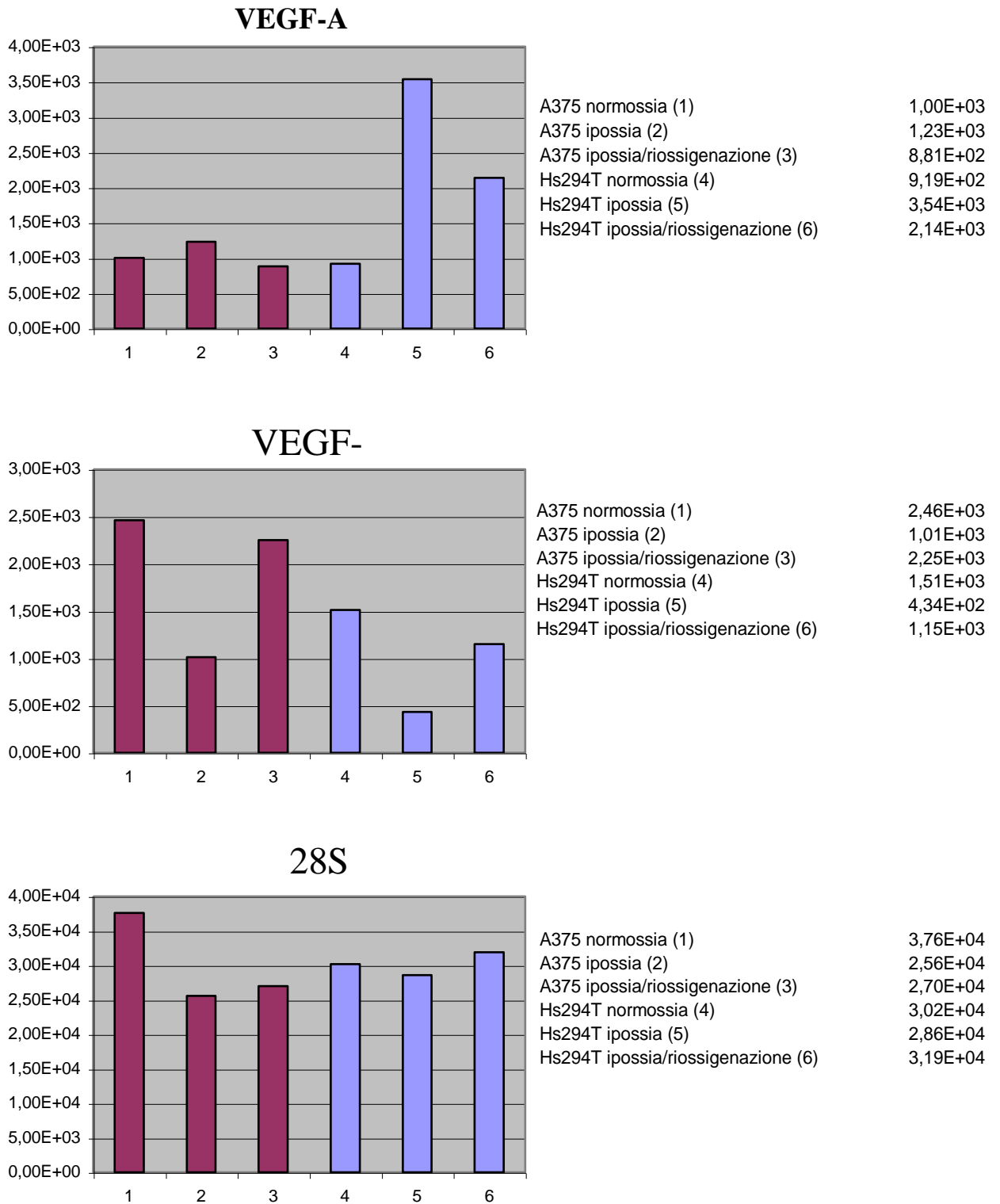


Fig. 20
Effetto dell'ipossia sulla espressione di RNAm per VEGF-A e VEGF-C valutata mediante qPCR in cellule di melanoma A375 e Hs294T.

Dalla Figura 21 emerge che l'inibizione della produzione di HIF-1 in cellule A375 e Hs294T, mediante il trattamento con siRNA HIF-1 α , aboliva l'effetto dell'ipossia sull'espressione di VEGF-A ma non su quella di VEGF-C dimostrando che i due fattori sono soggetti a meccanismi di regolazione diversi. La marcata riduzione della proteina HIF-1 α in cellule trattate con siRNA per HIF-1 α ed esposte ad ipossia era prova dell'efficacia del trattamento.

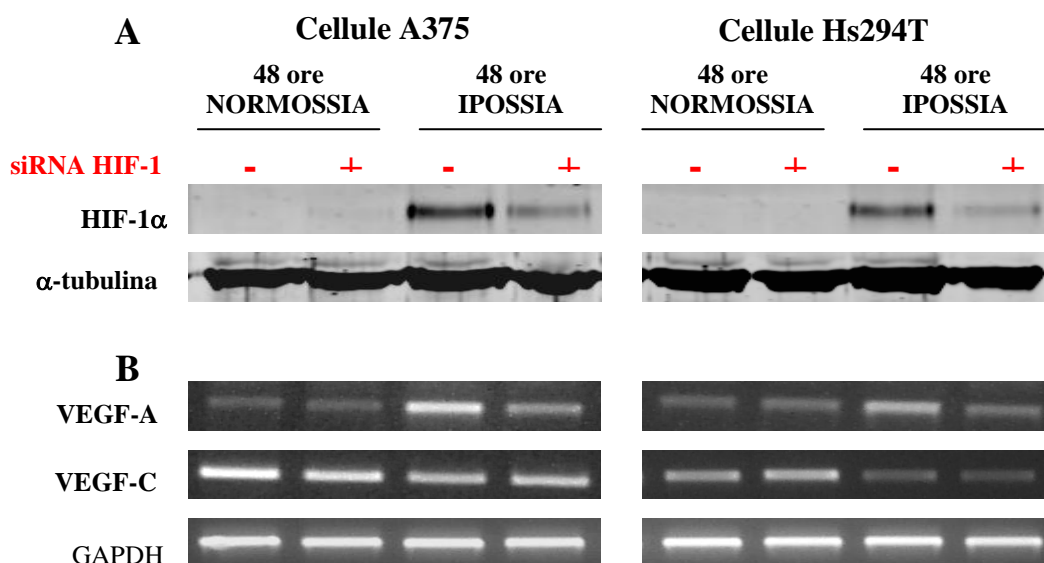


Fig. 21
Effetto dell'inibizione di HIF-1 α sulla espressione della proteina HIF-1 α (A) e dell' RNAm per VEGF-A e VEGF-C (B) in cellule di melanoma A375 e Hs294T dell'uomo esposte a condizioni di ipossia.

Espressione di VEGF-A e VEGF-C in macrofagi murini esposti al contatto con cellule tumorali, in condizioni di normossia e di ipossia (Fig. 22, 23, 24)

Analisi di RT-PCR hanno mostrato che l'ipossia induceva in macrofagi murini attivati con tioglicollato l'espressione del VEGF-A, mentre invece down-regolava l'espressione del VEGF-C (Fig. 22). Dalla Figura 22 emerge, inoltre, che in normossia il contatto con le cellule tumorali stimolava nei macrofagi un aumento di espressione di RNAm sia per VEGF-A sia per VEGF-C. In ipossia, invece, il contatto con le cellule non stimolava nei macrofagi l'espressione di RNAm per VEGF-A, mentre induceva un aumento di espressione del VEGF-C.

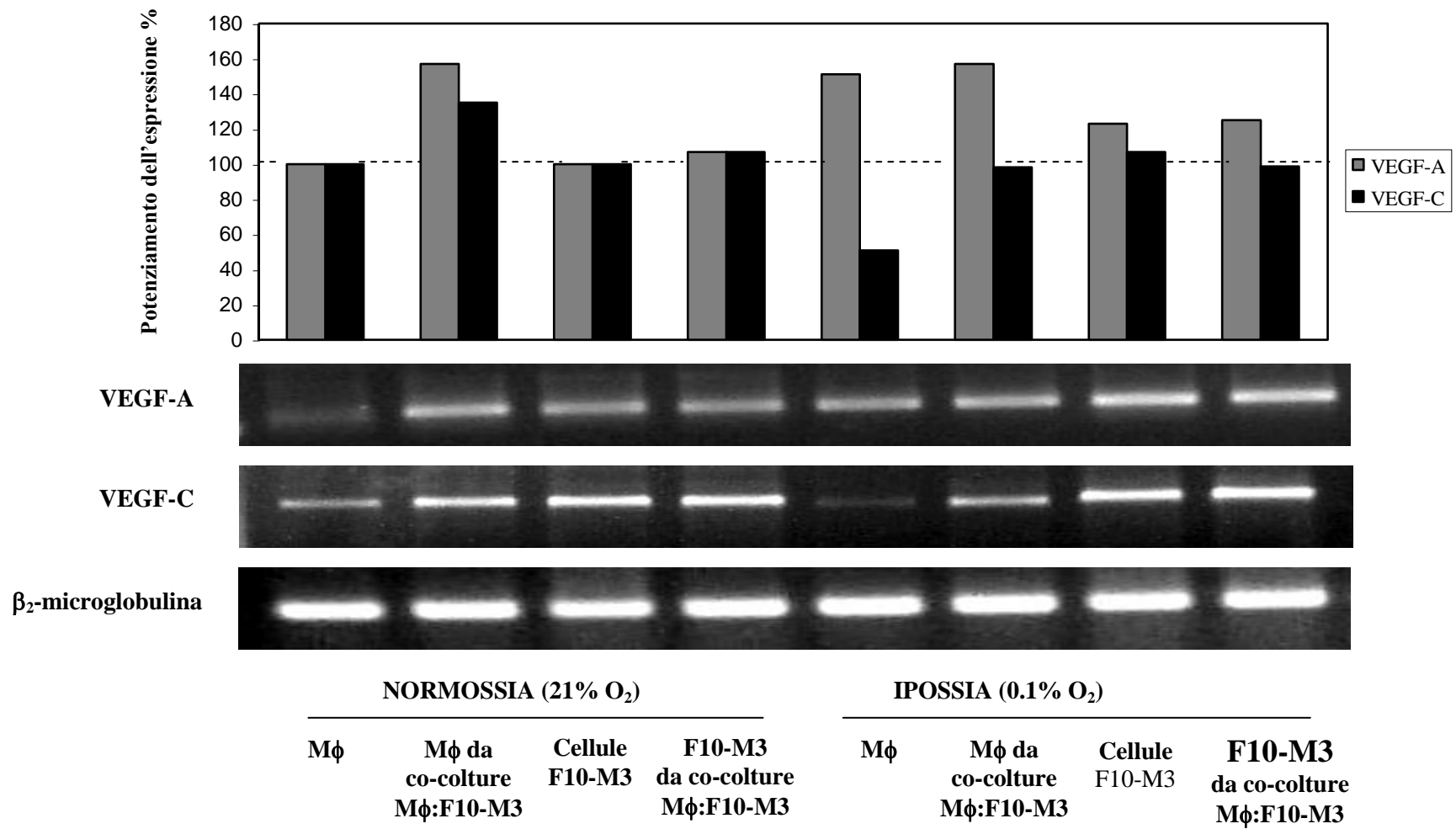


Fig. 22
Espressione dell'RNAm per VEGF-A e VEGF-C in macrofagi murini attivati *in vivo* con tioglicollato e in cellule di melanoma murino F10-M3 co-cultivate in condizioni di normossia e di ipossia. La rappresentazione grafica dei risultati è ottenuta mediante analisi densitometrica quantitativa dell'RNAm per VEGF-A e del VEGF-C normalizzati rispetto alla β_2 -microglobulina. I valori così ottenuti sono a loro volta normalizzati, per i macrofagi, rispetto a macrofagi cresciuti in normossia e per le cellule F10-M3, rispetto alle stesse cellule cresciute in normossia.

Studi paralleli hanno condotto all'osservazione che macrofagi attivati in vivo con tioglicollato esposti al contatto con cellule F10-M3 esprimevano maggiori livelli di RNAm per IL-1 β rispetto a monostrati macrofagici (Fig. 23A). Dalle analisi di RT-PCR, il recettore per IL-1 β espresso nei macrofagi, non è risultato modificato nei macrofagi a contatto con le cellule tumorali (Fig. 23B).

Allo stesso tempo, agenti infiammatori quali IL-1 β , TNF- α e LPS inducevano nei macrofagi attivati con tioglicollato un aumento di espressione di RNAm per VEGF-C e per VEGF-A (Fig. 24). Queste osservazioni suggeriscono che nei macrofagi mentre l'espressione di VEGF-A è sotto il controllo di HIF-1 e di citochine infiammatorie, il VEGF-C è controllato soltanto da infiammatorie, in particolare l'IL-1 β .

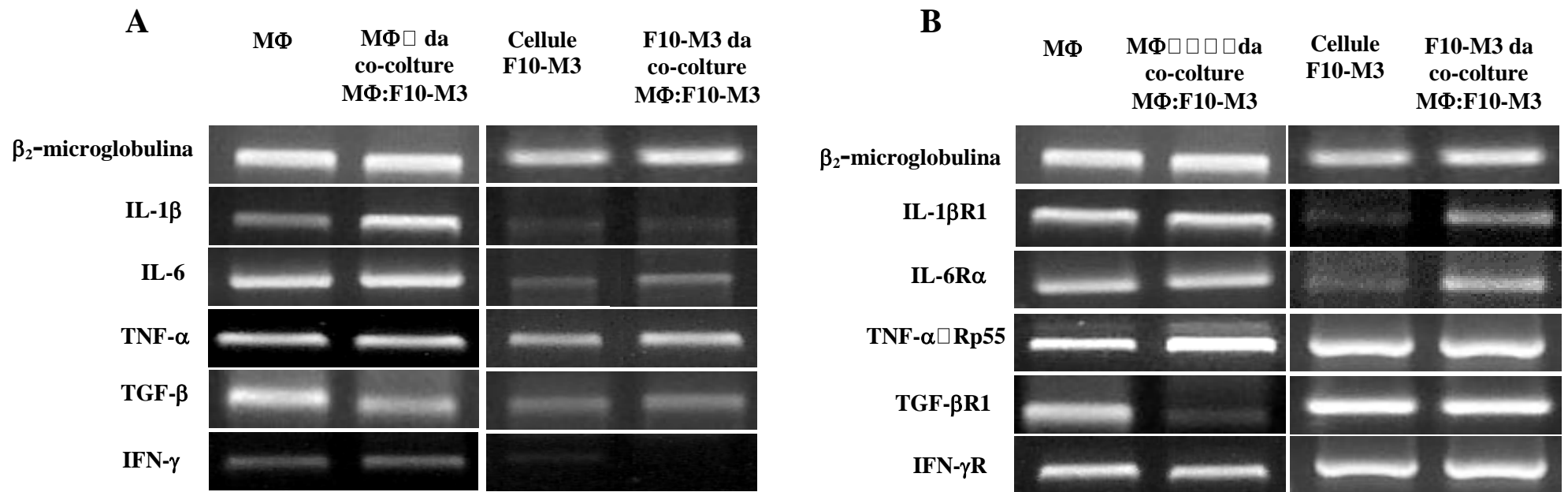


Fig. 23

Espressione dell'RNAm per alcune citochine infiammatorie (A) e per i loro recettori (B) in macrofagi e cellule di melanoma murino F10-M3 co-cultivati in condizioni di normossia.

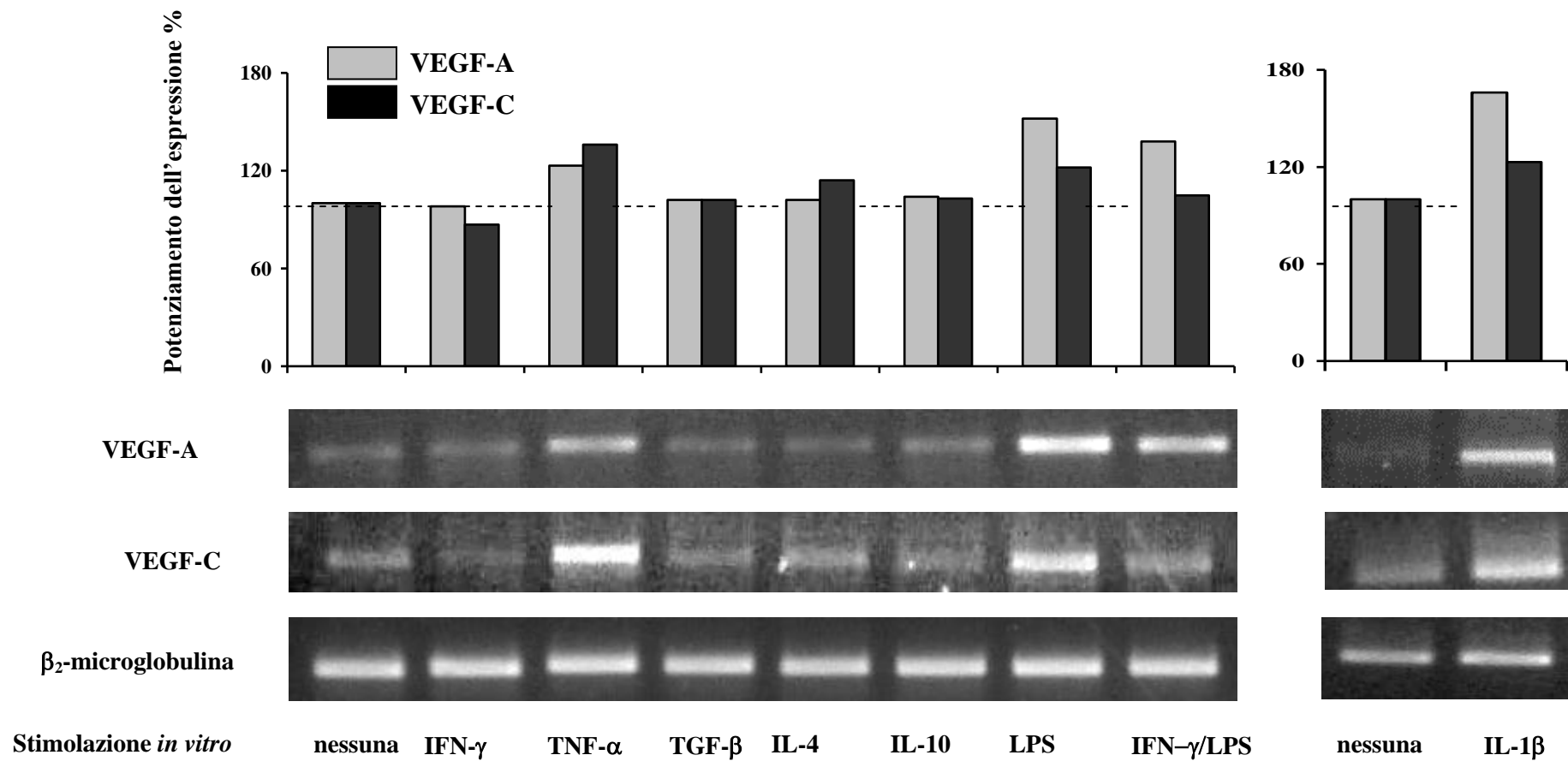


Fig. 24
Espressione di VEGF-A e di VEGF-C in macrofagi attivati *in vivo* con tioglicollato e stimolati per 24 ore con diversi agonisti prima dell'estrazione dell'RNA totale.

Effetto dell'ipossia sulla capacità invasiva e sull'espressione di proteasi in cellule di melanoma dell'uomo a vario grado di malignità (Fig. 25, 26, 27).

L'analisi di Western Blot riportata nella Figura 25 mostra che cellule di melanoma dell'uomo A375 derivate da un melanoma primitivo, e Hs294T derivate da una lesione metastatica linfonodale, erano linee cellulari stimolabili da una condizione di ipossia. Infatti, entrambe le linee esprimevano elevati livelli del fattore di trascrizione HIF-1 α dopo essere state esposte ad una tensione di ossigeno di 0.1%. La proteina HIF-1 α risultava assente quando le cellule venivano riportate in presenza di ossigeno.

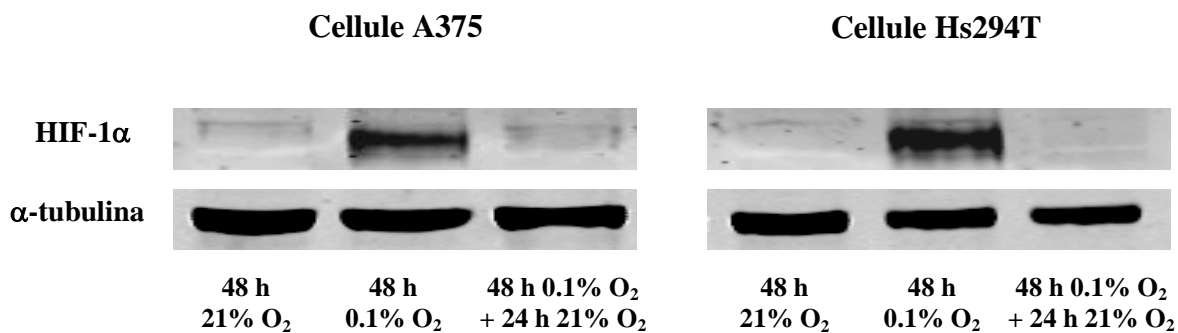


Fig. 25

Effetto dell'ipossia sulla espressione del fattore di trascrizione HIF-1 α in cellule A375 derivate da un melanoma primitivo dell'uomo e in cellule di melanoma Hs294T derivate da una lesione metastatica linfonodale dell'uomo.

La Figura 26 mostra che le cellule Hs294T, ma non le cellule A375, acquisivano una maggiore capacità di invadere substrati ricoperti di Matrigel dopo essere state esposte ad ipossia; l'effetto si manteneva anche in seguito alla riossigenazione delle cellule.

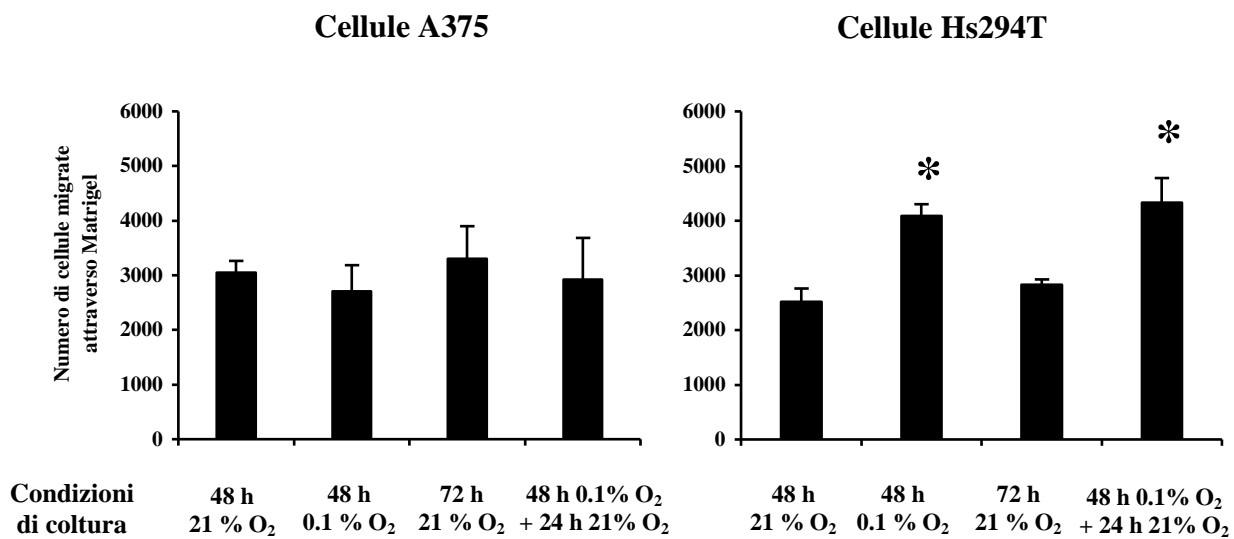


Fig. 26

Effetto dell'ipossia sulla capacità invasiva di cellule A375 derivate da un melanoma primitivo dell'uomo e di cellule di melanoma Hs294T derivate da una lesione metastatica linfonodale dell'uomo. * Valore significativamente diverso da quello ottenuto in cellule cresciute in normossia ($p < 0.05$).

Analisi condotte mediante RT-PCR e mediante zimografia hanno consentito di osservare che cellule A375 mantenute in condizioni di normossia non esprimevano MMP-9 e continuavano a non esprimerla anche se mantenute in ambiente ipossico (Fig. 27A,B). Inoltre, cellule A375 esposte ad ipossia mostravano una riduzione dei livelli di RNAm per MMP-2 e della proteina secreta nei terreni di coltura.

L'aumento di invasività delle cellule Hs294T esposte ad ipossia e delle cellule esposte ad una tensione di O₂ del 21% dopo ipossia, si associava ad una maggiore espressione di RNAm per MMP-9 (Fig. 27C) e ad una maggiore quantità della proteina MMP-9 secreta nei terreni di coltura (Fig. 27D). L'Ilomastat, un inibitore di metalloproteinasi, aggiunto ai terreni di migrazione, inibiva l'aumento di invasività delle cellule Hs294T ipossiche (Fig. 27E).

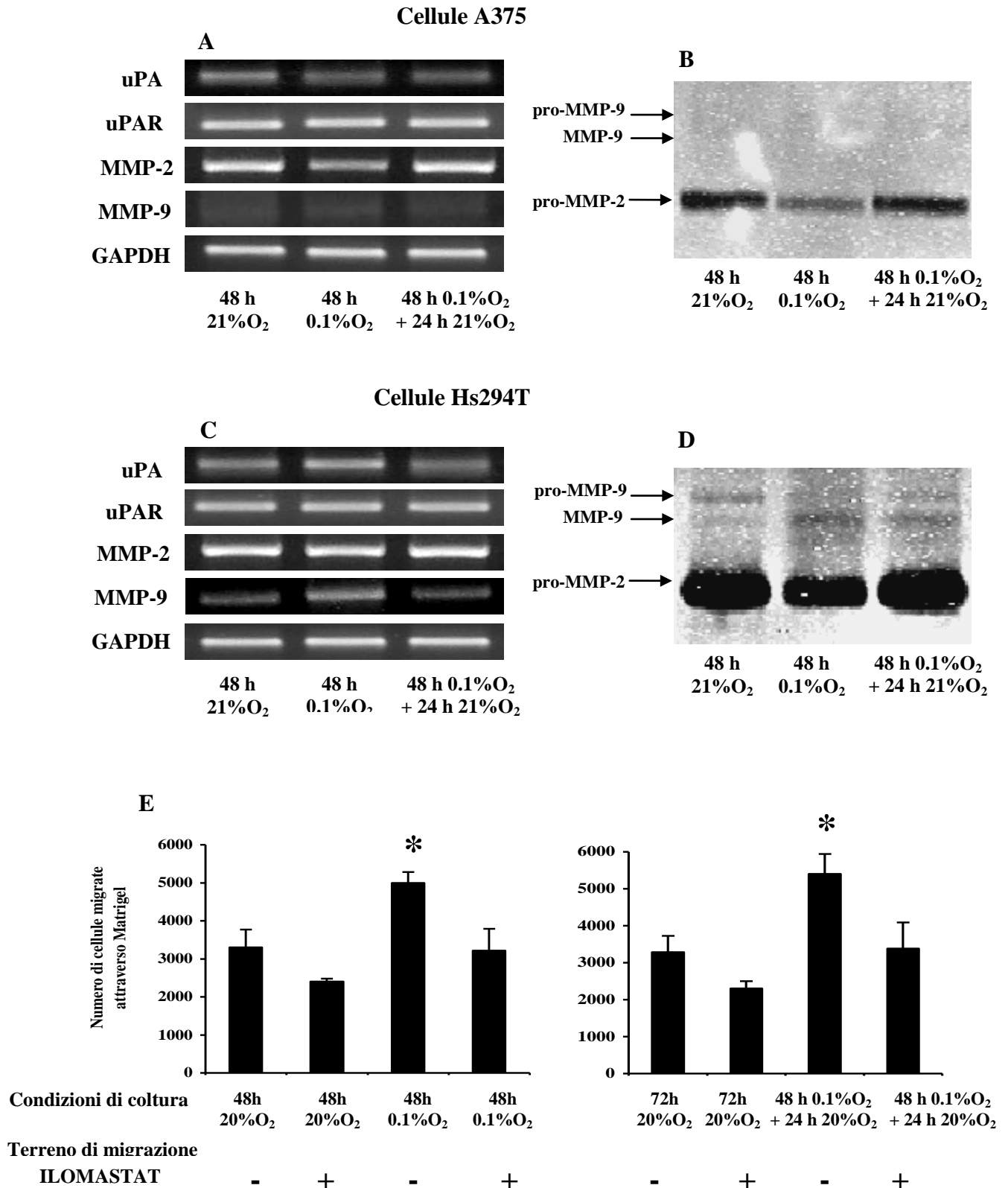


Fig. 27

Effetto dell'ipossia sulla espressione dell'RNAm per uPA, uPAR, MMP-2 e MMP-9 in cellule A375 (A) e Hs294T (C) valutata mediante RT-PCR e sulla secrezione di MMP-2 e MMP-9 nei terreni di coltura di cellule A375 (B) e Hs294T (D) valutata mediante Zimografia. Effetto della presenza di Iloprost nei terreni di migrazione, sulla capacità invasiva di cellule Hs294T esposte ad ipossia ed esposte ad ipossia e successiva riossigenazione (E). * Valore significativamente diverso da quello ottenuto in cellule cresciute in normossia (p<0.05).

Capacità invasiva di cellule A375 e Hs294T stimulate con IL-1 β o TNF- α (Fig. 28).

La zimografia dei terreni di coltura ha dimostrato che la stimolazione con IL-1 β 1000 U/mL in condizioni di normossia induceva la produzione di pro-MMP-9 sia in cellule A375 (Fig. 28A) sia in cellule Hs294T (Fig.28C). La produzione di pro-MMP-9 era indotta in modo ancora più significativo dalla stimolazione con TNF- α 20 ng/mL. All'aumento dell'attività proteasica di MMP-9 nelle cellule stimulate con IL-1 β o TNF- α si associava un aumento della capacità invasiva attraverso Matrigel sia delle cellule A375 (Fig. 28B) sia delle cellule Hs294T (Fig. 28D). Tale aumento era abolito dalla presenza di Ilomastat nei terreni di migrazione.

Effetto dell'ipossia sulla espressione di IL-1 β o TNF- α e dei loro recettori in cellule A375 e Hs294T (Fig. 29, 30).

Da analisi di RT-PCR è emerso che i livelli di espressione di RNAm per IL-1 β e IL-1 β R1, e per TNF- α e TNF- α Rp60 nelle cellule A375 mantenute in ipossia erano inferiori a quelle delle cellule incubate in normossia (Fig. 29A). Anche i livelli di proteina per i recettori IL-1 β R1 e TNF- α Rp60, valutati mediante Western Blot, risultano down-regolati in cellule A375 esposte a ipossia (Fig. 29B). L'espressione di RNAm per IL-1 β e IL-1 β R1, e per TNF- α e TNF- α Rp60 non veniva modificata in cellule Hs294T mantenute in condizioni ipossiche (Fig. 29C). Anche l'espressione delle proteine IL-1 β R1 e TNF- α Rp60 non risultava modificata in cellule Hs294T, nelle quali i recettori indagati continuavano ad essere fortemente espressi (Fig. 29D). L'espressione del recettore TNF- α Rp80 rimaneva invariata in entrambe le linee in seguito a esposizione ad ipossia.

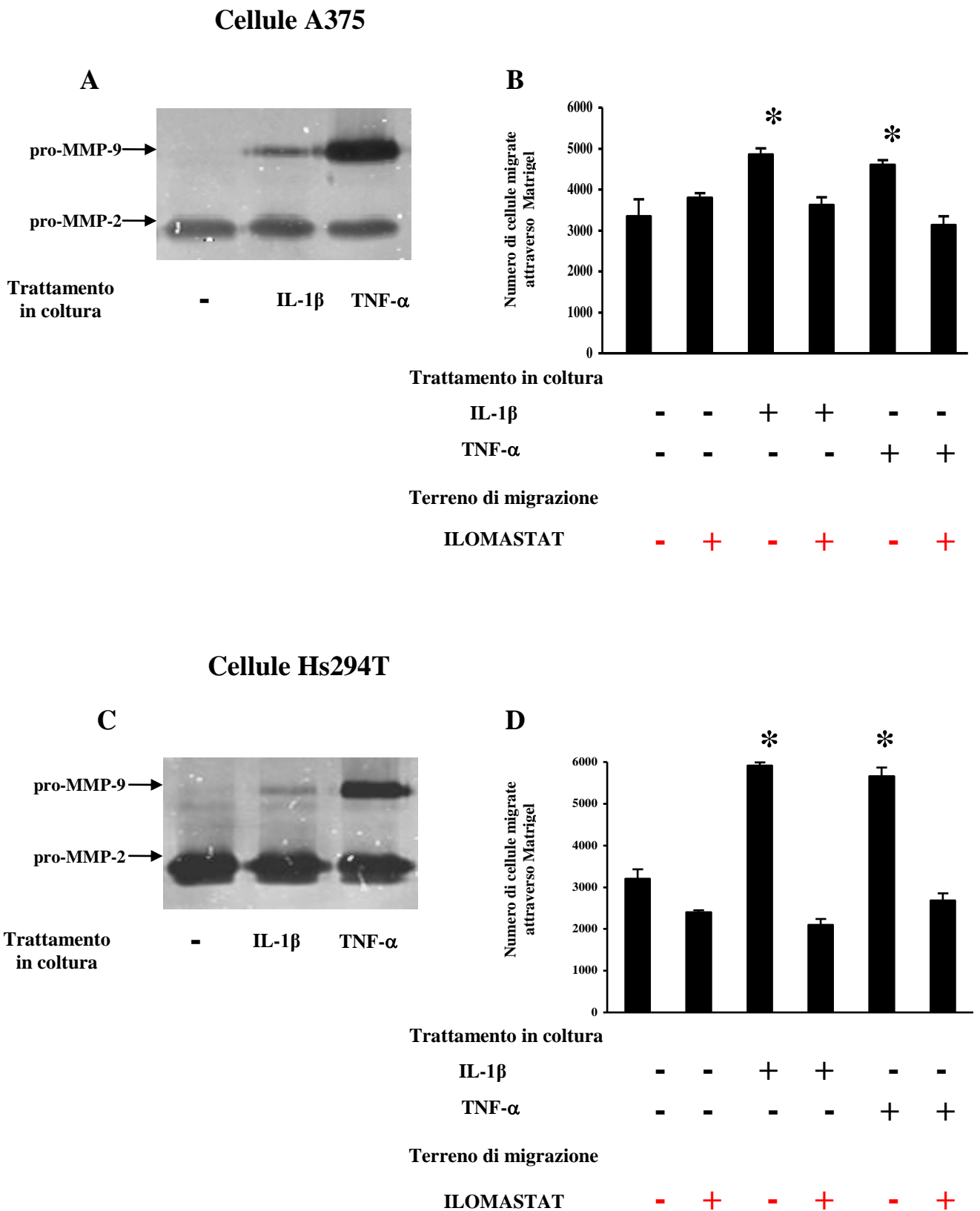
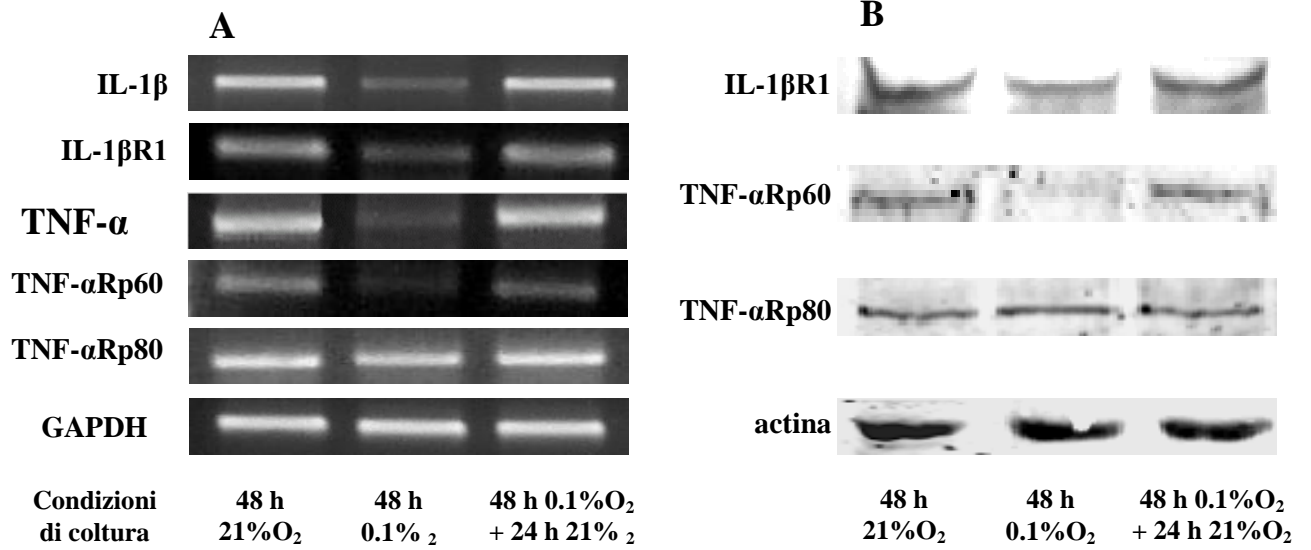


Fig. 28

Effetto della stimolazione con IL-1 β o con TNF- α sulla produzione di MMP-2 e MMP-9 di cellule A375 (A) e cellule Hs294T (C) e sulla capacità invasiva, in presenza o in assenza di Iloprost, di cellule A375 (B) e Hs294T (D). * Valore significativamente diverso da quello ottenuto in cellule cresciute in terreno standard (p<0.05).

Cellule A375



Cellule Hs294T

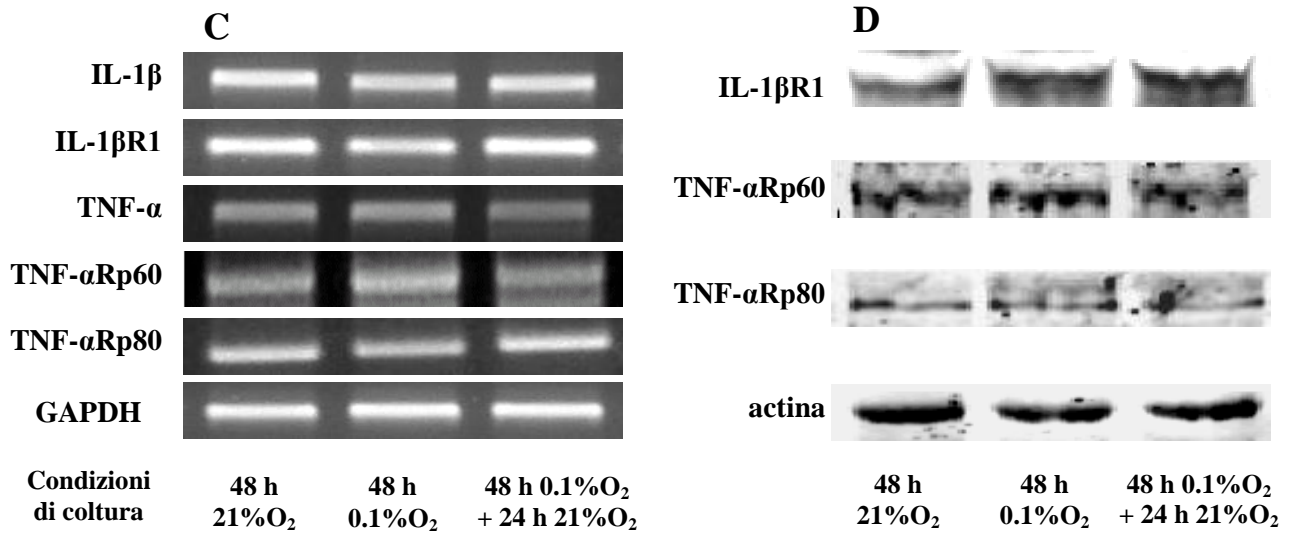


Fig. 29

Effetto dell'ipossia sulla espressione dell'RNAm per IL-1 β e TNF- α e per i loro recettori in cellule di melanoma dell'uomo A375 (A) e Hs294T (C), e sulla espressione delle proteine IL-1 β R1, TNF- α Rp60 e TNF- α Rp80 in cellule A375 (B) e Hs294T (D).

La Figura 30 mostra che l'effetto di down-regolazione indotto dall'ipossia sull'espressione dei recettori IL-1 β R1 e TNF- α Rp60 in cellule A375, non dipendeva dal fattore di trascrizione HIF-1 infatti non veniva abolito dal trattamento delle cellule con siRNA HIF-1. Il silenziamento di HIF-1 α nelle cellule trattate con siRNA anti-HIF-1 α è dimostrato dall'analisi della proteina determinata mediante Western Blot.

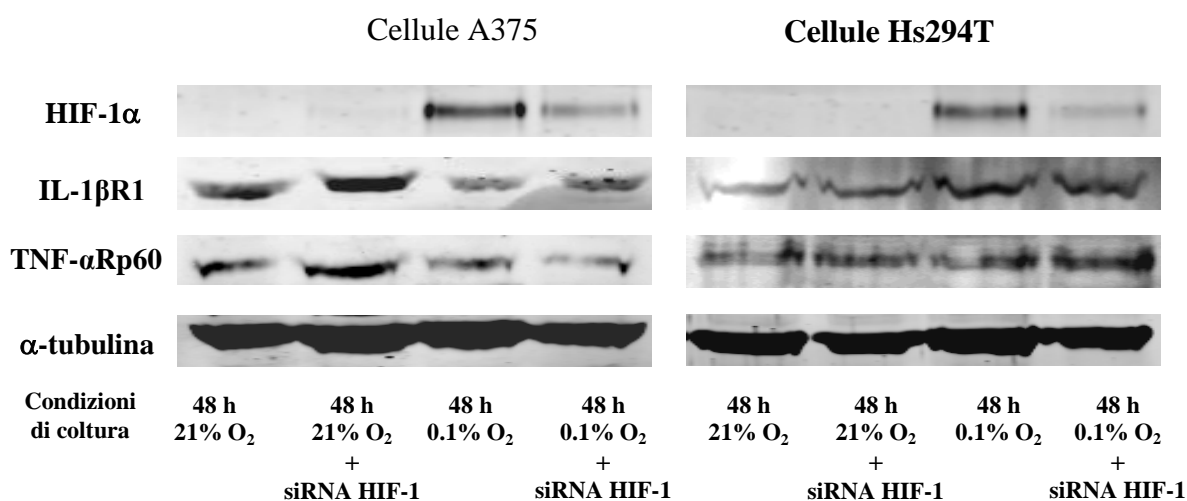


Fig. 30

Effetto dell'inibizione di HIF-1 α sulla espressione delle proteine IL-1 β R1 e TNF- α Rp60 in cellule di melanoma A375 e Hs294T dell'uomo esposte a condizioni di ipossia.

Effetto di anticorpi diretti contro i recettori per IL-1 β e TNF- α sulla capacità invasiva delle cellule Hs294T ipossiche (Fig. 31).

L'aumento della capacità invasiva attraverso Matrigel, di cellule Hs294T incubate in condizioni ipossiche e di cellule Hs294T esposte a riossigenazione dopo incubazione ipossia, risultava bloccata dalla presenza di anticorpi diretti contro i recettori per l'IL-1 β e TNF- α nei terreni di migrazione (Fig. 31).

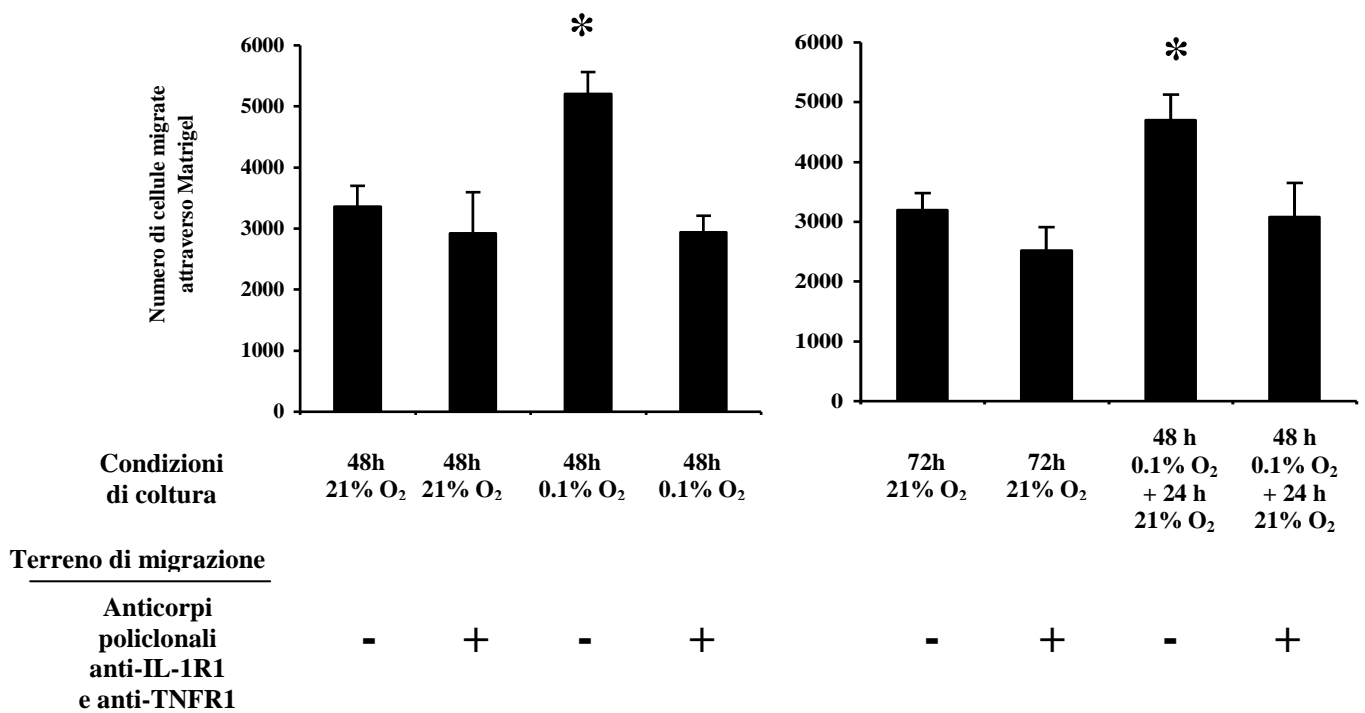


Fig. 31
Effetto di anticorpi diretti contro i recettori per IL-1 β e TNF- α sulla capacità invasiva di cellule Hs294T esposte ad ipossia. * Valore significativamente diverso da quello ottenuto in cellule cresciute in normossia ($p < 0.05$).

DISCUSSIONE

Indagini sperimentali e studi epidemiologici hanno contribuito a formulare l'ipotesi che vari fattori umorali e cellulari dell'ospite, sono in grado di promuovere alcune proprietà biologiche indispensabili alle cellule tumorali per completare le tappe previste dal processo di diffusione metastatica. A questo proposito, una particolare importanza è attribuita alla capacità delle cellule infiammatorie del microambiente tumorale e delle stesse cellule neoplastiche, di secernere citochine infiammatorie, fattori di crescita e di esprimere i corrispondenti recettori. Le cellule infiammatorie maggiormente rappresentate nel contesto di un tumore sono i cosiddetti Macrofagi Associati al Tumore ed è ormai accettato che essi possono promuovere la crescita tumorale (Mantovani *et al.*, 2002; Balkwill e Mantovani, 2001).

La prima parte del mio studio si è focalizzata sulla valutazione dell'espressione di alcune attività enzimatiche dei TAMs, cruciali nei processi di progressione neoplastica. E' noto, infatti, che le stesse cellule tumorali possono sfruttare a proprio vantaggio alcune proprietà biologiche dei TAMs, quali la secrezione di proteasi, fattori di crescita, fattori angiogenetici e mediatori lipidici capaci di inibire la risposta immunitaria dell'ospite, per poter progredire nelle varie fasi della cascata metastatica.

In primo luogo è stata indagata l'espressione della ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) e dell'attività arginasi. E' noto che i macrofagi possono utilizzare la L-arginina per sintetizzare ossido nitrico (NO) mediante l'attività iNOS o L-ornitina con l'attività arginasi. L'NO può contribuire all'azione tumoricida dei macrofagi, le poliamine che derivano dalla L-ornitina sono nutrienti essenziali per la crescita delle cellule tumorali. Quindi, le attività iNOS e arginasi possono risultare critiche per la progressione tumorale (Chang *et al.*, 2001).

Sono state condotte indagini immunoistochimiche su sezioni istologiche di melanomi umani a vario grado di malignità. Nelle fasi di crescita radiale il melanoma cresce in modo superficiale all'interno dello strato epidermico e degli strati dermici più esterni. La crescita può assumere una componente verticale, ed il tumore si estende agli strati dermici più profondi. Le nostre indagini hanno permesso di constatare una maggiore presenza di TAMs esprimenti iNOS nei melanomi a crescita radiale rispetto a melanomi in fase più avanzata. Non sono state trovate modificazioni significative

dell'espressione di arginasi nei TAMs dei melanomi analizzati. Questi risultati fanno ritenere che l'espressione di iNOS nei TAMs si associ ad un momento fondamentale nella storia naturale dei melanomi: la transizione da melanomi a crescita radiale a melanomi francamente invasivi. Nei tumori a crescita radiale, la percentuale di TAMs esprimenti arginasi era inferiore a quella esprimente iNOS. E' possibile che l'attività arginasica sia inibita all'interno della massa tumorale, come accade nei tumori della mammella e del colon (Park *et al.*, 1991). E' stato inoltre osservato che melanomi primitivi ulcerati presentavano una maggiore quantità di macrofagi esprimenti iNOS rispetto ai melanomi non ulcerati. Questo risultato non sorprende in quanto è noto che i macrofagi tendono ad accumularsi in grande quantità nei tessuti ischemici ed ipossici (Lewis e Murdoch, 2005) e che l'attività di iNOS può essere stimolata da citochine infiammatorie, e la necrosi è un forte induttore della risposta infiammatoria.

Sono stati condotti esperimenti *in vitro* capaci di riprodurre in condizioni ben controllate le relazioni che le cellule neoplastiche stabiliscono con i macrofagi in una massa tumorale. Il modello sperimentale utilizzato si basava sulla coltura di cellule tumorali su monostrati di macrofagi peritoneali murini singenici attivati *in vivo* con tioglicollato. Macrofagi attivati *in vivo* con tioglicollato riproducono, secondo un classico schema di classificazione dello stato di attivazione dei macrofagi, proposto da Adams e Hamilton (1984), lo stato di macrofago infiammatorio. Infatti i macrofagi attivati *in vivo* con tioglicollato rilasciano elevate quantità di TNF- α dopo stimolazione con IFN- γ /LPS. Il contatto tra macrofagi e cellule di melanoma F10-M3 stimolava nei macrofagi l'aumento dell'espressione di RNAm per iNOS, mentre i livelli di espressione dell'RNAm per arginasi non variavano. L'induzione di iNOS da parte delle cellule di melanoma era provocata in modo specifico dalle cellule tumorali, in quanto non era osservabile con cellule normali come i fibroblasti. La determinazione di NO ha mostrato che l'NO prodotto nelle co-culture di macrofagi e cellule tumorali in presenza di IFN- γ e LPS era in quantità superiore rispetto a quella rilasciata nei terreni di coltura di macrofagi coltivati in assenza delle cellule tumorali. In particolare, in presenza di una piccola quantità di LPS, l'IFN- γ era un potente induttore dell'NO prodotto dai macrofagi co-coltivati con cellule tumorali. Questi risultati indicano che le cellule di melanoma murino stimolano nei macrofagi una maggiore espressione di iNOS e questo effetto si associa ad un aumento della sintesi di NO soltanto in presenza di IFN- γ /LPS.

E' possibile che livelli particolarmente elevati di NO possano essere rilasciati dai TAMs se stimolati da linfociti attivati o da cellule *natural killer*, capaci di rilasciare nel microambiente IFN- γ . Un ridotto contenuto in linfociti infiltranti il tumore o un loro ridotto stato di attivazione potrebbero essere responsabili della secrezione da parte dei TAMs di modiche quantità di NO utili a stimolare una attività angiogenetica favorente la crescita neoplastica (Joshi *et al.*, 1996). D'altra parte la possibilità di indurre nei TAMs la capacità di secernere alti livelli di NO può rappresentare un ausilio alla immuno-terapia dei melanomi.

Successivamente, ho affrontato la valutazione dell'espressione di COX-2 nei TAMs. I metaboliti dell'acido arachidonico, prodotti attraverso la via ciclossigenasica (prostaglandine), rappresentano ulteriori mediatori infiammatori prodotti dai TAMs di particolare rilevanza biologica in vari aspetti della crescita neoplastica (Fidler, 2003). Un esempio è offerto dalla prostaglandina E₂ prodotta dall'attività di COX-2, capace di promuovere sia l'angiogenesi (Funk, 2001) sia la sfuggita delle cellule tumorali dal controllo da parte del sistema immunitario (Calder, 2001; Young, 1994).

L'espressione di COX-2 nei TAMs è stata valutata su sezioni istologiche di melanomi a vario grado di malignità. Questo studio ha rivelato che i TAMs di melanomi *in situ* e a crescita radiale esprimevano elevati livelli di COX-2 ed erano localizzati prevalentemente sul fronte invasivo del tumore. L'espressione di COX-2 tendeva a diminuire nei TAMs dei melanomi in stadio più avanzato e dei melanomi metastatici. L'analisi immunostochimica ha mostrato, inoltre, che i livelli di espressione di COX-2 nelle cellule tumorali non variavano con il progredire del grado di malignità della lesione.

Esperimenti *in vitro* hanno consentito di osservare che macrofagi co-coltivati con cellule tumorali con diverso potenziale metastatico esprimevano maggiori livelli di COX-2. Questo effetto sembrava essere mediato in modo specifico dalle cellule tumorali in quanto non era provocato da cellule normali come i fibroblasti. Questi risultati suggeriscono che l'attività COX-2 dei TAMs può rappresentare un marcatore di progressione tumorale e che le stesse cellule di melanoma possono stimolare la COX-2 nei macrofagi con cui vengono in contatto. L'importanza di questo fenomeno è indicata dalla grande presenza di TAMs esprimenti COX-2 nel fronte invasivo dei

melanomi primitivi, dove le interazioni tra macrofagi e cellule tumorali sono maggiori (Condeelis e Segall, 2003).

Un elevato numero di TAMs esprimenti COX-2 è stato osservato in lesioni pre-maligne come le displasie gastriche e cervicali (Blanke e Masferrer, 2003) ed i polipi coloretali (Eberhart *et al.*, 1994). Inoltre, il coinvolgimento di COX-2 nella trasformazione maligna è sostenuta dal fatto che l'uso di inibitori di COX-2 prevengono lo sviluppo di tumori mammari in ratti trattati con 7,12-dimetilbenzantracene (Abou-Issa *et al.*, 2001) e riducono la comparsa di adenomi coloretali in pazienti con poliposi familiari (Arber *et al.*, 2006). L'espressione di COX-2 nei TAMs può costituire un nuovo bersaglio della terapia dei melanomi.

Dopo aver valutato la presenza di attività enzimatiche quali iNOS, arginasi e COX-2 nei macrofagi associati al tumore, è stata indagata l'espressione di alcune attività proteasiche in macrofagi infiammatori murini co-coltivati con cellule tumorali singeniche. Lo scopo era di verificare in che misura il contatto con le cellule tumorali influenzava nei macrofagi attività proteasiche implicate nella invasività tumorale. E' ben noto il coinvolgimento delle metalloproteinasi MMP-9 e MMP-2 e del sistema serino-proteasico rappresentato dall'attivatore del plasminogeno di tipo urochinasico (uPA) ed il suo recettore (uPAR) nella promozione di un fenotipo metastatico (Sidenius e Blasi, 2003; Del Rosso *et al.*, 2002; Egeblad e Werb, 2002; Mignatti e Rifkin, 2000; Andreasen *et al.*, 1997). Entrambe le famiglie di proteasi sono marcatori della progressione dei melanomi. Un elevato livello di uPA/uPAR e delle MMPs caratterizza i melanomi metastatici (Hofmann *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 1999; De Vries *et al.*, 1994). Inoltre, oligonucleotidi antisenso per uPAR inibiscono la capacità invasiva e la diffusione metastatica in una linea cellulare isolata da un melanoma dell'uomo (D'Alessio *et al.*, 2004), mentre l'inibizione dell'espressione di MMP con approcci genetici (Itho *et al.*, 1999) o farmacologici (Bjorklund *et al.*, 2004) blocca l'invasività di cellule di melanoma murino.

I risultati ottenuti dalle mie ricerche indicano che il contatto tra macrofagi e cellule tumorali promuove nei macrofagi l'aumento di espressione di uPAR e di MMP-9. L'espressione di uPAR e di MMP-9 nei macrofagi stimolati dal contatto con le cellule di melanoma F10-M3 non era mediata da un fattore solubile rilasciato dalle cellule tumorali e poteva essere considerato un fenomeno specifico, in quanto

fibroblasti normali non avevano la stessa capacità. Parallelamente, è stato osservato che le cellule F10-M3 acquisivano una maggiore capacità invasiva attraverso Matrigel quando venivano fatte migrare in terreni condizionati da co-culture di macrofagi e cellule tumorali. Questo effetto veniva abolito dalla presenza di anticorpi anti-MMP-9 nei terreni di migrazione, ma non veniva abolito dalla presenza di anticorpi anti-uPAR addizionati ai terreni di co-cultura di macrofagi e cellule tumorali. Gli anticorpi anti-uPAR aggiunti ai terreni di co-cultura di cellule tumorali e macrofagi dovevano avere il compito di bloccare l'attivazione di MMP-9. Anticorpi anti-uPAR nei terreni di co-cultura abolivano l'aumento di espressione di ERK 1/2 che si verificava nel macrofago a contatto con le cellule tumorali. Quindi, l'aumento di invasività di cellule F10-M3 esposte al terreno condizionato da co-culture di macrofagi e cellule tumorali dipendeva dall'MMP-9 macrofagico. Inoltre, l'attivazione di MMP-9 nel modello indagato non dipendeva dal sistema uPA/uPAR, ma da altre attività proteasiche secrete dai macrofagi e/o dalle cellule tumorali. Infatti, l'invasività delle cellule tumorali non veniva stimolata dal terreno condizionato da macrofagi co-cultivati con cellule F10-M3 nel quale era presente un cocktail di inibitori di tipo aspartico-, cisteino- e serino-proteasici. L'importanza delle metalloproteinasi prodotte dallo stroma tumorale nella progressione del melanoma è confermato dalla osservazione che l'inoculo di cellule di melanoma B16 nella vena di animali incapaci di produrre MMP-9 e MMP-2, porta ad una riduzione significativa delle colonie metastatiche polmonari rispetto a quelle riscontrate in animali capaci di esprimere MMPs (Itoh *et al.*, 1999). Questi risultati suggeriscono che le cellule di melanoma possono sfruttare numerosi meccanismi invasivi innescati a livello del microambiente tumorale.

L'importanza dei TAMs nei meccanismi di diffusione metastatica è stata dimostrata da un'ampia letteratura scientifica e da alcune osservazioni riportate dal gruppo di ricerca presso il quale ho svolto la mia attività di ricerca. È stato osservato che l'attività pro-metastatica caratteristica di macrofagi attivati *in vivo* con *Corynebacterium parvum*, BCG, *Lysteria monocitogenes*, dipendeva dall'azione combinata dell'IFN- γ e del TNF- α (Calorini *et al.*, 2002). Inoltre, è stato dimostrato che cellule F10-M3 stimulate con IFN- γ /TNF- α , a basse dosi, aumentavano il loro potenziale metastatico e la loro capacità invasiva, e a queste modificazioni si associava un aumento del recettore di tipo I per TNF- α (Bianchini *et al.*, 2006). Infine, ho

partecipato ad osservare che cellule F10-M3 esposte all'azione di IL-1 β , IL-6 e TNF- α , in seguito a pre-trattamento con basse dosi di IFN- γ , aumentavano il loro potenziale metastatico. Ricorderò che i maggiori produttori delle citochine presenti nel microambiente tumorali sono i TAMs. Torisu e collaboratori (2000) hanno osservato che lo sviluppo di melanomi maligni dell'uomo si associa ad una progressiva infiltrazione di TAMs e ad aumentati livelli di TNF- α e IL-1 α nel siero.

L'IL-1 contribuisce a stimolare attraverso il suo recettore la secrezione di collagenasi in cellule tumorali di diversa origine (Dabbous *et al.*, 1995). L'IL-6 aumenta, in maniera dose-dipendente, la formazione di colonie metastatiche originate da cellule di carcinoma del colon dell'uomo (Schneider *et al.*, 2000). Inoltre, nei pazienti con melanomi metastatici è stata osservata una minore sopravvivenza correlata con alti livelli di IL-6 nel siero (Guida *et al.*, 2006). L'interazione tra il TNF- α ed il suo recettore potenzia nelle cellule tumorali la motilità (Rosen *et al.*, 1991) e la secrezione di proteasi utili per l'invasività locale (Dabbous *et al.*, 1995). Alcune citochine stimolano l'espressione in cellule di melanoma di recettori integrinici indispensabili per l'adesione a substrati di cellule endoteliali (Mortarini *et al.*, 1991).

Per poter svolgere la loro azione le citochine devono legarsi al proprio recettore e solo in seguito a questa interazione si innescano meccanismi di segnalazione molecolare che si esplicano alla fine con un effetto biologico. Per valutare se l'espressione dei recettori per alcune citochine era associata al fenotipo metastatico delle cellule tumorali, sono state utilizzate cellule di melanoma murino F10-M3 che rappresentano un modello particolarmente adatto alle indagini previste dall'argomento di ricerca, in quanto sono capaci di acquisire un fenotipo metastatico in seguito a vari trattamenti. I risultati ottenuti hanno indicato che anche l'esposizione delle cellule F10-M3 ad alte dosi di IFN- γ era in grado di aumentare la loro capacità di colonizzazione polmonare e la loro capacità invasiva su substrati ricoperti di Matrigel. Il fenotipo invasivo/metastatico che ne risultava, esprimeva maggiori livelli di IL-1 β R1, IL-6R α e TNF- α Rp55 rispetto alle cellule non stimulate. L'azione dell'IFN- γ dipendeva dal suo legame con un recettore specifico che appartiene alla famiglia dei recettori citochinici di classe II (o degli IFNs). L'interazione della citochina con il suo recettore determina il legame di due subunità R1 e due subunità R2 e l'attivazione del pathway di trasduzione che prevede l'attivazione di JAK1, JAK2, STAT1 e STAT3 (Pestka *et al.*, 1997;

Greenlund *et al.*, 1993). Il blocco della via di segnalazione JAK-dipendente dell'IFN- γ , con l'uso di JAK Inhibitor I, che è un inibitore di JAK1, inibiva l'aumento dei recettori citochinici e dell'invasività delle cellule F10-M3 mediati dall' IFN- γ .

L'espressione di recettori per citochine infiammatorie potrebbe rappresentare un momento cruciale nella storia naturale dei tumori, in quanto fornirebbe alla cellula neoplastica vantaggi utili alla sua progressione. Questo è in accordo con studi condotti su melanomi a vario grado di progressione che mostrano che la malignità delle lesioni si associa ad un aumento dei livelli di espressione dei recettori per IL-1 β e IL-6 (Moretti *et al.*, 1999). Al fine di valutare il ruolo dei recettori citochinici nel processo di disseminazione metastatica, cellule F10-M3 trattate con JAK Inhibitor I, che presentavano un blocco dell'espressione di RNA messaggero per i recettori dell'IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β e IFN- γ , sono state inoculate in animali trattati con ciclofosfamide. La ciclofosfamide è un noto inibitore dell'attività delle cellule *Natural Killer* (NK) (Hanna e Fidler, 1980) ed è stato utilizzato per permettere alle cellule F10-M3, che hanno un basso potenziale metastatico, di formare un notevole numero di colonie sia nel polmone sia nel fegato. Da questa indagine è emerso che il blocco dell'espressione dell'RNAm per la gran parte dei recettori citochinici non modificava la capacità di colonizzare il polmone ma si associava ad una riduzione della colonizzazione epatica. Questo risultato suggerisce che l'espressione di recettori per determinate citochine infiammatorie influenza la capacità delle cellule di melanoma di metastatizzare in organi specifici. E' possibile, infatti, che il polmone rappresenti per le cellule di melanoma inoculate endovena un organo "filtro" e la sua colonizzazione sia indipendente da meccanismi di organo-tropismo. Il fegato, invece, rappresenta per le cellule di melanoma un organo bersaglio dove attecchire solo dopo aver attraversato il filtro polmonare ed aver guadagnato il circolo arterioso. Vidal-Vanaclocha e collaboratori (1994; 1996) hanno dimostrato che l'IL-1 β secreta da cellule endoteliali sinusoidali promuove la colonizzazione epatica delle cellule di melanoma B16. Questi dati indicano che l'IL-1 ha un ruolo importante nella formazione di metastasi epatiche. Nel complesso questi risultati mostrano che l'interazione tra IL-1 β , IL-6, TNF- α e i loro recettori stimola la colonizzazione delle cellule di melanoma murino F10-M3 in organi specifici, in particolare nel fegato. In considerazione dell'importanza delle citochine infiammatorie e dei loro recettori nello sviluppo di un fenotipo invasivo e metastatico,

conoscere il profilo di espressione dei recettori per citochine infiammatorie nei melanomi dell'uomo potrebbe essere utile per identificare melanomi a rischio di progressione verso un fenotipo più aggressivo.

Sempre allo scopo di individuare i possibili meccanismi con cui il microambiente tumorale partecipa alla progressione neoplastica, ho dedicato la mia attività di ricerca allo studio dell'effetto dell'ipossia sulla espressione dei fattori VEGF-A e -C, e sullo sviluppo di un fenotipo tumorale invasivo. L'ipossia è una condizione che si verifica frequentemente nei tumori solidi. E' noto, infatti, che l'irrorazione dei tumori solidi non sia affatto regolare e alcune zone della massa tumorale, che risiedono al di là del limite di diffusione dell'ossigeno, sono esposte ad una riduzione della pressione parziale di ossigeno (Thomlinson e Gray, 1955). Sebbene una ridotta pressione parziale di ossigeno possa danneggiare le cellule tumorali fino ad indurre la loro morte, l'ipossia può stimolare in cellule tumorali particolarmente resistenti l'espressione di geni coinvolti in meccanismi di adattamento che hanno poi un ruolo importante nella progressione neoplastica (Vaupel, 2004). Le cellule tumorali capaci di adattarsi e sopravvivere in condizioni di ipossia estrema, costituiranno il clone cellulare che potrà acquisire una malignità clinica capace di portare a morte l'ospite. Numerosi studi sono stati condotti al fine di comprendere i meccanismi che regolano l'angiogenesi tumorale e l'espressione del fattore angiogenetico VEGF-A, il fattore di crescita maggiormente coinvolto in questo processo. Meno noto è il processo della linfangiogenesi tumorale, tantoché solo recentemente è stata abbandonata l'idea che il sistema linfatico partecipi passivamente alla diffusione delle cellule tumorali (Pepper, 2001). La scoperta di marcatori specifici per i vasi linfatici ha stimolato l'interesse per la loro origine e per i fattori che stimolano la formazione di nuovi vasi linfatici (Skobe *et al.*, 2001). Il ruolo cruciale che i vasi linfatici presenti nella massa tumorale svolgono nella disseminazione metastatica, è dimostrato dal fatto che la maggior parte dei melanomi cutanei maligni, come molti altri tumori dell'uomo, metastatizza in primo luogo ai linfonodi sentinella (Dadras *et al.*, 2003; Stacker *et al.*, 2002). Nei tumori solidi, i vasi linfatici sono presenti soprattutto alla periferia della massa tumorale e drenano il fluido interstiziale ai linfonodi, comprese le cellule tumorali (Massi *et al.*, 2006; Alitalo e Carmeliet, 2002). Se le cellule tumorali riescono a sfuggire alla risposta immunitaria intra-linfonodale, possono crescere e poi raggiungere linfonodi distanti e il

circolo venoso tramite il dotto toracico. Una volta nel circolo ematico possono metastatizzare in organi distanti dal tumore di origine.

Analisi immunoistochimiche condotte su biopsie di melanomi umani invasivi hanno permesso di osservare la presenza di aree densamente popolate da macrofagi che esprimono VEGF-C, soprattutto alla periferia del tumore. Il VEGF-C è poco espresso invece nei macrofagi che si trovano all'interno della massa tumorale. Questa osservazione ben si adatta alla dimostrazione che i vasi linfatici sono presenti prevalentemente alla periferia di un tumore, mentre sono pressoché assenti all'interno della massa tumorale (Massi *et al.*, 2006; Skobe *et al.*, 2001). Schoppmann e collaboratori (2002) hanno esteso l'osservazione che l'elevata densità di vasi linfatici nello stroma peritumorale si associa all'espressione da parte dei TAMs dei fattori linfangiogenetici VEGF-C e VEGF-D, a carcinomi della cervice uterina. Le nostre indagini immunoistochimiche hanno mostrato, inoltre, che le cellule tumorali esprimevano bassi livelli di VEGF-C rispetto ai TAMs con i quali si trovavano in contatto. Poiché la periferia di un tumore solido è noto essere più vascolarizzata rispetto alle aree centrali, ipossiche e spesso necrotiche, ho preso in considerazione la possibilità che l'espressione del VEGF-C fosse regolata in modo diverso da quella del VEGF-A, notoriamente stimolato dall'ipossia. Ho trovato che in una linea di macrofagi umani l'ipossia induceva, come atteso, un aumento di espressione del fattore angiogenetico VEGF-A, mentre non modificava l'espressione del VEGF-C. Anche in cellule di melanoma dell'uomo i due fattori hanno presentato una diversa regolazione in ipossia, in quanto l'ipossia induceva un aumento del VEGF-A, mentre provocava una riduzione del VEGF-C. Anche ricerche di diversi autori confermano che la ridotta tensione di ossigeno induce l'espressione del VEGF-A (Hata *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 1995; Shweiki *et al.*, 1992) e non induce l'espressione del VEGF-C (Ikeda *et al.*, 2006; Ristimaki *et al.*, 1998; Enholm *et al.*, 1997). Il VEGF-A e -C, pur appartenendo alla stessa famiglia (VEGF) sono sottoposti a meccanismi diversi di regolazione. Questo si traduce nella formazione di vasi sanguigni nelle aree ipossiche presenti all'interno della massa tumorale, e di vasi linfatici alla periferia del tumore dove sono maggiormente presenti TAMs capaci di produrre VEGF-C. Purtroppo, l'assenza di vasi linfatici intratumorali e l'incompletezza dei vasi ematici al centro del tumore sono responsabili della formazione di una elevata pressione interstiziale che si oppone sia alla fuoriuscita di sostanze dal

circolo ematico (anche farmaci) sia al flusso sanguigno stesso. Quest'ultimo fenomeno partecipa alla formazione della necrosi centrale tipica delle masse tumorali. La presenza di vasi linfatici alla periferia del tumore è in grado di ridurre la pressione interstiziale in queste aree e può favorire quindi la fuoriuscita di macromolecole dai vasi sanguigni; allo stesso tempo però, può essere responsabile del drenaggio ai linfonodi delle cellule neoplastiche che si distaccano dal tumore di origine, e se l'ospite non attiva una risposta immunitaria capace di eliminarle, esse possono iniziare il loro percorso di diffusione metastatica. La terapia anti-tumorale mirata al blocco di VEGF-A è nota da tempo; ad essa potrebbero essere aggiunti farmaci capaci di controllare l'espressione del VEGF-C o del suo recettore VEGF-3.

E' noto, che l'ipossia determina modificazioni di varie funzioni biologiche nelle cellule. Oltre all'angiogenesi già ricordata, l'ipossia modifica il metabolismo glicolitico e l'invasività delle cellule. La gran parte di queste modificazioni dipendono dall'induzione del fattore di trascrizione HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor 1) (Semenza *et al.*, 2002; Ryan *et al.*, 1998; Maxwell *et al.*, 1997). Per questo motivo ho voluto valutare se il silenziamento della proteina HIF-1 α nelle cellule di melanoma dell'uomo A375 e Hs294T influiva sull'espressione del VEGF-A e -C. Ho trovato che a differenza del VEGF-A, il VEGF-C non è sotto il controllo di HIF-1.

La regolazione dell'espressione del VEGF-A e del VEGF-C in ipossia è stata successivamente indagata anche con l'uso un modello murino. Questo modello non solo permetteva di verificare l'effetto dell'ipossia sull'espressione dei fattori VEGF-A e VEGF-C nei macrofagi, ma consentiva anche di osservare in che modo il contatto tra macrofagi e cellule tumorali poteva modificare l'espressione dei due fattori nei due tipi cellulari. Mediante l'allestimento di co-culture di macrofagi peritoneali attivati *in vivo* con tioglicollato e cellule di melanoma murino singeniche F10-M3, mantenute in condizioni di normossia e di ipossia, è stato possibile osservare che l'ipossia induceva nei macrofagi murini l'espressione del VEGF-A, mentre invece riduceva l'espressione del VEGF-C. Inoltre, questo modello permetteva di osservare che in normossia i macrofagi in contatto con le cellule tumorali esprimevano maggiori livelli di RNAm per entrambi i fattori, VEGF-A e VEGF-C. In ipossia il contatto con le cellule tumorali non stimolava nei macrofagi l'espressione di VEGF-A forse perché già fortemente stimolato dall'ipossia, mentre invece induceva un aumento di espressione del VEGF-C. Da questi

risultati emerge che il VEGF-C non è sotto il controllo di HIF-1 ma è stimolabile nel macrofago dal contatto con le cellule neoplastiche. La regolazione di VEGF-C potrebbe passare attraverso mediatori infiammatori rilasciati dalle cellule tumorali o dagli stessi macrofagi. E' noto che citochine pro-infiammatorie quali IL-1 α , IL-1 β , TNF- α possono indurre l'espressione del fattore linfangiogenetico VEGF-C in fibroblasti umani (Ristimaki *et al.*, 1998) e in macrofagi dell'infiltrato infiammatorio presenti in patologie della cornea (Kerjaschki, 2005; Maruyama *et al.*, 2005). A questo proposito ricorderò che quando i macrofagi venivano messi in contatto con le cellule tumorali in condizioni di normossia, esprimevano maggiori livelli di IL-1 β e l'espressione del recettore dell'IL-1 β era conservato a buoni livelli. Questi risultati permettevano di ipotizzare che l'IL-1 β poteva essere coinvolta nella regolazione del VEGF-C. La stimolazione dei macrofagi con citochine esogene ha contribuito ad evidenziare che l'IL-1 β , il TNF- α , e l'LPS, potevano indurre l'espressione dell'RNAm per il VEGF-C e anche per il VEGF-A. Quindi è possibile che un meccanismo autocrino fondato sull'attività dell'IL-1 β sia responsabile dell'aumento di VEGF-C nei macrofagi a contatto con le cellule tumorali. Nel complesso questi risultati suggeriscono che la disponibilità in vasi linfatici di un tumore sia sotto il controllo di citochine infiammatorie di origine macrofagica. Il blocco delle citochine che stimolano nei TAMs l'espressione di VEGF-C potrebbe rappresentare un modo per inibire la formazione di nuovi vasi linfatici e una strategia utile al controllo disseminazione metastatica. Tuttavia, in modo esattamente opposto, potrebbe essere auspicabile favorire la linfangiogenesi all'interno dei tumori nell'intento di facilitare i trattamenti farmacologici e radioterapici.

L'ipossia in numerosi tipi cellulari stimola anche l'espressione di attività proteasiche. Graham e coll. (1998; 1999) hanno dimostrato che in cellule di carcinoma mammario l'ipossia induce un aumento di espressione di uPAR e da questo dipende l'aumento di invasività delle cellule attraverso Matrigel. Canning e coll. (2001) hanno dimostrato che in cellule di carcinoma mammario metastatico l'ipossia determina un aumento dell'attività di MMP-9 da cui dipende un aumento della capacità invasiva delle cellule. Le metalloproteinasi, in particolare la MMP-9, e il sistema di attivazione del plasminogeno di tipo urochinasico (uPA/uPAR) rivestono un ruolo fondamentale nei processi invasivi delle cellule tumorali, come più volte ricordato nel corso di questa tesi (Sternlicht e Werb, 2001; Andreasen *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 1998).

Partendo da queste osservazioni, cellule di melanoma dell'uomo a diverso grado di malignità sono state esposte ad ipossia ed è stata valutata la loro capacità di attraversare substrati rivestiti di Matrigel. Entrambe le linee cellulari esprimevano elevati livelli del fattore HIF-1 α se incubate in un ambiente con pressione parziale di ossigeno dello 0.1%. Tuttavia, solo le cellule Hs294T, derivate da una lesione metastatica, mostravano una più elevata attività invasiva. L'effetto pro-invasivo dell'ipossia su cellule Hs294T è risultato dipendere da una stimolazione della metalloproteinasi MMP-9, in quanto veniva abolito dall'Ilomastat. L'osservazione che le cellule A375 esposte ad ipossia esprimevano elevati livelli di HIF-1 α , ma non presentavano un aumento dell'attività di MMP-9 e di invasività, ha suggerito che l'invasività delle cellule Hs294T poteva dipendere da fattori diversi da HIF-1.

Citochine infiammatorie esogene, quali IL-1 β e TNF- α , sono risultate capaci di stimolare la produzione di MMP-9 e l'invasività attraverso Matrigel in entrambe le linee cellulari mantenute in condizioni di normossia. Questo risultato ha suggerito che la diversa espressione delle citochine IL-1 β e/o TNF- α o dei loro recettori nelle due linee cellulari esposte ad ipossia, potesse svolgere un ruolo cruciale nel determinare la loro diversa capacità di invadere substrati ricoperti di Matrigel. In effetti, in condizioni di normossia le citochine possono agire in entrambe le linee cellulari in quanto entrambe esprimono i recettori IL-1 β R1 e TNF- α Rp60, mediante i quali esplicano la loro azione. Dopo essere state esposte ad ipossia le cellule A375 mostravano una riduzione di espressione sia delle due citochine indagate sia dei loro recettori. L'effetto dell'ipossia di ridurre l'espressione genica è stata dimostrata per i geni che codificano proteine coinvolte nell'adesione cellulare e nell'ancoraggio delle cellule a proteine della matrice, come le caderine (Subarsky e Hill, 2003). La riduzione di espressione dei recettori IL-1 β R1 e TNF- α Rp60, indipendente dal fattore di trascrizione HIF-1, e la mancata espressione delle corrispondenti citochine, potevano essere responsabili della non induzione di MMP-9 e di invasività nelle cellule A375 esposte ad ipossia. Le cellule Hs294T, derivate da una lesione metastatica, continuavano ad esprimere sia le citochine IL-1 β e TNF- α sia i loro recettori anche dopo esposizione a condizioni ipossiche, anche se i loro livelli non risultavano aumentati rispetto alle cellule mantenute in normossia. L'uso di anticorpi diretti contro i recettori IL-1 β R1 e TNF- α Rp60 inibiva l'invasività indotta dall'ipossia in cellule Hs294T. Questo risultato suggerisce che l'azione delle due

citochine infiammatorie indagate è determinante nel promuovere le capacità invasive delle cellule Hs294T ipossiche. In considerazione del fatto che il microambiente tumorale è ricco di IL-1 β e TNF- α e di altre citochine pro-infiammatorie prodotte soprattutto dai TAMs (Krishnamoorthy e Honn, 2006), e che la quantità di queste citochine può aumentare nelle aree ipossiche di una massa tumorale dove spesso i TAMs si accumulano richiamati da agenti chemotattici (Knowles e Harris, 2007; Lewis et al., 2005), il blocco dei recettori per citochine pro-infiammatorie potrebbe rappresentare un modo per controllare il processo di disseminazione metastatica.

CONCLUSIONI

L'insieme dei dati raccolti durante questo periodo di lavoro, indirizzato allo studio del ruolo del microambiente tumorale nel processo di diffusione metastatica, suggeriscono che:

- 1) l'esposizione a cellule tumorali, rappresenta per la popolazione di macrofagi intratumorali uno stimolo capace di innescare attività utili alla loro progressione, come la produzione di NO, l'espressione di COX-2, l'invasività attraverso membrane basali mediata dall'attività MMP-9;
- 2) le cellule tumorali traggono vantaggio dalla presenza di citochine infiammatorie nel microambiente tumorale e la loro abilità di riprodurre colonie metastatiche negli organi secondari si associa ad un aumento di recettori citochinici, un fenomeno capace di amplificare le possibilità delle cellule tumorali di sopravvivere negli organi secondari;
- 3) la malignità delle cellule tumorali si associa ad una più elevata capacità di sfruttare alcune proprietà biologiche promosse dall'ipossia, come la produzione di fattori di crescita per cellule endoteliali vascolari e attività proteasiche coinvolte nell'invasività locale.

E' possibile, quindi, che una delle più importanti caratteristiche della malignità tumorale sia rappresentata dalla possibilità delle cellule neoplastiche di sfruttare a proprio vantaggio le diverse attività locali dell'ospite.

BIBLIOGRAFIA

- Abou-Issa HM, Alshafie GA, Seibert K *et al.* Dose-response effects of the COX-2 inhibitor, celecoxib, on the chemoprevention of mammary carcinogenesis. *Anticancer Res* 2001; 21: 3425-32.
- Adams DO, Hamilton TA. The cell biology of macrophage activation. *Ann Rev Immunol* 1984; 2:283-318.
- Aebersold DM, Burri P, Beer KT *et al.* Expression of Hypoxia inducible factor-1 alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. *Cancer Res* 2001; 61:2911-6.
- Aggarwal BB and Metha K. Determination and regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharides, cytokines, and retinoids. *Methods Enzymol* 1996; 269:166-71.
- Alitalo K, Carmeliet P. Molecular mechanism of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer cell* 2002; 1:219-27.
- Ammirati M, Rao LN, Murthy MS *et al.* Partial nephrectomy in mice with milliwatt carbon dioxide laser and its influence on experimental metastasis. *J Surg Oncol* 1989; 41:153-9.
- Andreasen PA, Kjøller L, Christensen L, Duffy MJ. The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review. *Int J Cancer* 1997; 72:1-22.
- Arber N, Eagle CJ, Spicak J RB *et al.* Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *N Engl J Med* 2006; 355:885-95.
- Augustin HG. Antiangiogenic tumour therapy: will it work? *Trends Pharmacol Sci* 1998; 19:216-22.
- Auvinen M, Paasinen A, Andersson LC, Hölttä E. Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* 1992; 360:355-8.
- Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow?. *Lancet* 2001; 357:539-45.

- Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25:409-16.
- Beatty GL, Peterson Y. IFN γ can promote tumor evasion of the immune system in vivo by down-regulating cellular levels of an endogenous tumor antigen. *J Immunol* 2000; 165:5502-8.
- Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:401-10.
- Bianchini F, D'Alessio S, Fibbi G *et al.* Cytokine-dependent invasiveness in B16 murine melanoma cells: Role of uPA system and MMP9. *Oncol Rep* 2006; 15:709-14.
- Bianchini F, Massi D, Marconi C *et al.* Expression of cyclo-oxygenase-2 in macrophages associated with cutaneous melanoma at different stages of progression. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* 2007; 83:320-8.
- Björklund M, Heikkilä P, Koivunen E. Peptide inhibition of catalytic and noncatalytic activities of matrix metalloproteinase-9 blocks tumor cell migration and invasion. *J Biol Chem* 2004; 279:29589-97.
- Blanke CD, Masferrer JL. Chemotherapy with cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of malignant disease: pre-clinical rationale and preliminary results of clinical trials. *Prog Exp Tum Res* 2003; 37:243-60.
- Boutard V, Havouis R, Fouqueray B *et al.* Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. Implications for the regulation of macrophage cytotoxicity. *J Immunol* 1995; 155:2077-84.
- Burke F, Relf M, Negus R, Balkwill F. A cytokine profile of normal and malignant ovary. *Cytokine* 1996; 8: 578-85.
- Burke B, Giannoudis A, Corke KP *et al.* Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implication for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Path* 2003; 163:1233-43.
- Calder. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids* 2001; 36:1007-24.

- Calorini L, Ruggieri S. Reduction of the metastatic potential of a RSV-transformed fibroblastic line (B77-AA6 cells) upon transplantation in essential fatty acid-deficient mice. *Invasion Metastasis* 1992; 12:233-40.
- Calorini L, Bianchini F, Mannini A *et al.* Biological properties associated with the enhanced lung-colonizing potential in a B16 murine melanoma line growth in a medium conditioned by syngenic *Corynebacterium parvum*-elicited macrophages. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 889-95.
- Calorini L, Bianchini F, Mannini A *et al.* IFN γ and TNF α account for a pro-clonogenic activity secreted by activated murine peritoneal macrophages. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19:259-64.
- Canning MT, Postovit LM, Clarke SH, Graham CH. Oxygen-mediated regulation of gelatinase and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 expression by invasive cells. *Exp Cell Res* 2001; 267:88-94.
- Cecconi O, Calorini L, Mannini A *et al.* Enhancement of lung-colonizing potential of murine tumor cell lines co-cultivated with activated macrophages. *Clin Exp Metastasis* 1997; 15: 94-101.
- Chang CI, Liao JC, Kuo L. Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity. *Cancer Res* 2001;61:1100-6.
- Chen T.R. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res* 1977; 104:255-62.
- Cochran AJ, Splig WGS, Mackie RM, Thomas CE. Post-operative depression of tumor-directed cell-mediated immunity in patients with malignant disease. *Br Medical J* 1972; 4:67-70.
- Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:921-30.
- Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002; 420:860-7.
- Creasey AA, Smith HS, Hackett AJ *et al.* Biological properties of human melanoma cells in culture. *In vitro* 1979; 15:342-50.

- D'Alessio S, Margheri F, Pucci M *et al.* Antisense oligodeoxynucleotides for urokinase-plasminogen activator receptor have anti-invasive and anti-proliferative effects in vitro and inhibit spontaneous metastases of human melanoma in mice. *Int J Cancer* 2004; 110:125-33.
- Dabbous MK, North SM, Haney L *et al.* Effects of mast cell-macrophage interactions on the production of collagenolytic enzymes by metastatic tumor cells and tumor-derived and stromal fibroblasts. *Clin Exp Metastasis* 1995; 13:33-41.
- Dadras SS, Paul T, Bertoncini J *et al.* Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival. *Am J Pathol* 2003; 162:1951-60.
- De Vries TJ, Quax PH, Denijn M *et al.* Plasminogen activators, their inhibitors, and urokinase receptor emerge in late stages of melanocytic tumor progression. *Am J Pathol* 1994; 144:70-81.
- Del Rosso M, Fibbi G, Pucci M *et al.* Multiple pathways of cell invasion are regulated by multiple families of serine proteases. *Clin Exp Metastasis* 2002; 193:193-207.
- Denkert C, Winzer KJ, Hauptmann S. Prognostic impact of cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2004; 4:428-33.
- Dingemans KP, Zeeman-Boeschoten IM, Keep RF, Das PK. Transplantation of colon carcinoma into granulation tissue induces an invasive morphotype. *Int J Cancer* 1993; 54:1010-6.
- Dranoff G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:11-22.
- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D *et al.* Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 1999; 237:97-132.
- Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A *et al.* Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107:1183-8.

- Eccles SA, Alexander P. Macrophage content in tumors in relation to metastatic spread and host immune reaction. *Nature* 1974; 250:667-9.
- Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:161-74.
- Enhelm B, Paavonen K, Ristimaki A *et al.* Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 1997; 14:2475-83.
- Fidler IJ. Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature New Biol* 1973; 242:148-9.
- Fidler IJ. Immune stimulation-inhibition of experimental cancer metastasis. *Cancer Res* 1974; 34:491-8.
- Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from pre-existing variant cells within a malignant tumor. *Science* 1977; 197:893-5.
- Fidler IJ. General consideration for studies of experimental cancer metastasis. *Methods Cancer Res* 1978; 242:148-9.
- Fidler IJ, Talmadge JE. Evidence that intravenously derived murine pulmonary melanoma metastases can originate from the expansion of a single tumor cell. *Cancer Res* 1986; 46:5167-71.
- Fidler IJ, Schroit AJ. Recognition and destruction of neoplastic cells by activated macrophages: discrimination of altered self. *Biochim Biophys Acta* 1988; 948:151-73.
- Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev* 2003; 3:1-6.
- Fisher B, Fisher ER. Experimental studies of factors influencing hepatic metastases. III. Effect of surgical trauma with special reference to liver injury. *Ann Surg* 1959; 150:731-44.
- Fisher B, Fisher ER, Feduska N. Trauma and the localization of tumor cells. *Cancer* 1967; 20:23-30.

- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:404-5.
- Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:4-6.
- Fosslien E. Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia. *Ann Clin Lab Sci* 2000; 30:3-21.
- Funk CD. Prostaglandin and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001; 294:1871-74.
- Gabizon A, Leibovich SJ, Goldman R. Contrasting effects of activated macrophages and macrophages from tumor-bearing mice tumor growth *in vivo*. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65:913-20.
- Gasic GJ, Gasic TB, Steward CC. Antimetastatic effects associated with platelet reduction. *Proc Natl Acad Sci* 1968; 61:46-52.
- Gattoni-Celli S, Calorini L, Simile MM, Ferrone S. Modulation by MHC Class I antigens of the biology of melanoma cells. Non-immunological mechanism. *Melanoma Res* 1993; 3:285-9.
- Giard DJ, Aarounson SA, Todaro GJ *et al*. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51:1417-23.
- Giraldi T, Perissin L, Zorzet S, Rapozzi V. Metastasis and neuroendocrine system in stressed mice. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 650:297-301.
- Gordon MA, Jack DL, Dockrell DH, Lee ME, Read RC. Gamma interferon enhances internalization and early nonoxidative killing of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by human macrophages and modifies cytokine responses. *Infect Immun* 2005; 73:3445-52.
- Graham CH., Fitzpatrick TE., McCrae KR. Hypoxia stimulates urokinase receptor expression through a heme protein-dependent pathway. *Blood* 1998; 91:3300-7.

- Graham CH, Forsdike J, Fitzgerald CJ, Macdonald-Goodfellow S. Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression. *Int J Cancer* 1999; 80:617-23.
- Greenlund AC, Schreiber RD, Goeddel DV, Pennica D. Interferon-gamma induces receptor dimerization in solution and on cells. *J Biol Chem* 1993; 268:18103-10.
- Guida M, Riccobon A, Biasco G *et al.* Basal level and behaviour of cytokines in a randomized outpatient trial comparing chemotherapy and biochemotherapy in metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2006; 16:317-23.
- Haddad JJ. Oxygen-sensing mechanisms and the regulation of redox-responsive transcription factors in development and pathophysiology. *Respir Res* 2002; 3:26.
- Hallermalm K, Seki K, De Geer A *et al.* Modulation of the tumor cell phenotype by IFN-gamma results in resistance of uveal melanoma cells to granule-mediated lysis by cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* 2008; 180:3766-74.
- Hanna N, Fidler IJ. Role of natural killer cells in the destruction of circulating tumor emboli. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65:801-9.
- Hashimoto I, Kodama J, Seki N *et al.* Vascular endothelial growth factor-C expression and its relationship to pelvic lymph node status in invasive cervical cancer. *Br J Cancer* 2001; 85:93-7.
- Hass R, Köhler L, Rehfeldt W *et al.* Alterations in glycosylation and lectin pattern during phorbol ester-induced differentiation of U937 cells. *Cancer Res* 1990; 50:323-7
- Hata Y, Nakagawa K, Ishibashi T *et al.* Hypoxia-induced expression of vascular endothelial growth factor by retinal glial cells promotes in vitro angiogenesis. *Virchows Arch* 1995; 426:479-86.
- Herlyn M. *Molecular and cellular biology of melanoma*. R.G. Landes, Austin, TX, 1993; 54-64.
- Hockel M, Vaupel P. Tumor Hypoxia: definitions and current clinical, biologic and molecular aspects. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:266-76.
- Hofmann UB, Westphal JR, Wass ET *et al.* Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix

- metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. *Br J Cancer* 1999; 81:774-82.
- Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol* 2000; 115:337-44.
- Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for Translational Therapeutics. *Cancer* 2007; 110:1911-28.
- Honn KV, Tang DG, Grossi I *et al.* Tumor cell-derived 12(S)-Hydroxyeicosatetraenoic acid induces microvascular endothelial cell retraction. *Cancer Res* 1994; 54:565-74.
- Hsu MY, Meier F, Herlyn M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 2002; 70:522-36.
- Hubbard NE, Erikson KL. Enhancement of metastasis from a transplantable mouse mammary tumor by dietary linoleic acid. *Cancer Res* 1987; 47:6171-5.
- Huget RP, Flad H.D, Opitz HG. Promotion of L1210 tumor growth by macrophages. *Immun-Forsch* 1978; 154:433-41.
- Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M *et al.* The regulation of vascular endothelial growth factors (VEGF-A, -C, and D) expression in the retinal pigment epithelium. *Experimental Eye Res* 2006; 83:1031-40.
- Itoh T, Tanioka M, Matsuda H *et al.* Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17:177-81.
- Janji B, Melchior C, Gouon V *et al.* Autocrine TGF- β -regulated expression of adhesion receptors and integrin-linked kinase in HT-144 melanoma cells correlates with their metastatic phenotype. *Int. J. Cancer.* 1999; 83:255-62.
- Joshi M, Strandhoy J, White WL. Nitric oxid synthase activity is up-regulated in melanoma cell lines: a potential mechanism for metastasis formation. *Melanoma Res* 1996; 6:121-6.
- Jüttner S, Wissmann C, Jöns T *et al.* Vascular endothelial growth factor-D and its receptor VEGFR-3: two novel independent prognostic markers in gastric adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2006; 24:228-40.

- Kadhim SA, Rees RC. Enhancement of tumor growth in mice: evidence for the involvement of host macrophages. *Cell Immunol* 1984; 87:258-69.
- Karpatkin S, Pearlestein E. Role of platelets in tumor cell metastasis. *Ann Internal Medicine* 1981; 95:636-41.
- Katz EB, Boylan ES. Effect of the quality of dietary fat on tumor growth and metastasis from a mouse mammary adenocarcinoma. *Nutr Cancer* 1989; 12:343-50.
- Kerjaschki D. The crucial role of macrophages in lymphangiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115:2316-19.
- Kim J, Yu W, Kovalski K, Ossowski L. Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay. *Cell* 1998; 94:353-62.
- Knowles HJ, Harris AL. Macrophages and the hypoxic tumor microenvironment. *Frontiers in Bioscience* 2007; 12:4298-314.
- Krasagakis K, Garbe C, Zouboulis CC, Orfanos CE. Growth control of melanoma cells and melanocytes by cytokines. *Recent Results Cancer Res* 1995; 139:169-82.
- Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B *et al.* Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 2003; 63:1138-43.
- Krishnamoorthy S, Honn KV. Inflammation and disease progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25:481-91.
- Kunz M, Bloss G, Gillitzer R *et al.* Hypoxia/reoxygenation induction of monocyte chemoattractant protein-1 in melanoma cells: involvement of nuclear factor-kB, stimulatory protein-1 transcription factors and mitogen-activated protein kinase pathways. *Biochem J* 2002; 366:299-306.
- Larsson SC, Kumlin M, Ingelman-Sundberg M, Wolk A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* 2004; 79:935-45.
- Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Tóth S, Falus A. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* 2000; 12:547-54.

- Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune response by TGF- β . *Annu Rev Immunol* 1998; 16:137-61.
- Lewis C, Murdoch C. Macrophage response to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol* 2005; 167:627-35.
- Liotta AL, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 2001; 411: 375-9.
- Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 1995; 77:638-43.
- Löffek S, Zigrino P, Angel P *et al.* High invasive melanoma cells induce matrix metalloproteinase-1 synthesis in fibroblasts by interleukin-1 α and basic fibroblast growth factor-mediated mechanisms. *J Invest Dermatol* 2005; 124:638-43.
- Lyden D, Hattori K, Dias S *et al.* Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Natl Med* 2001; 7:1194-201.
- Mannini A, Kerstin N, Calorini L *et al.* An enhanced apoptosis and a reduced angiogenesis are associated with the inhibition of lung colonisation in animals fed an n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diet injected with a highly metastatic murine melanoma line. *Br J Nutr* 2008; 4:1-6.
- Mantovani A, Bottazzi B, Calotta F *et al.* The origin and the function of tumor-associated macrophages. *Immunol Today* 1992; 13:265-70.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M *et al.* Macrophage polarization: Tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 2002; 23:549-55.
- Mantovani A, Schioppa T, Porta C *et al.* Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25:315-22.
- Marconi C, Bianchini F, Mannini A *et al.* Tumoral and macrophage uPAR and MMP-9 contribute to the invasiveness of B16 murine melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 2008; 25:225-31.

- Maruyama K, Ii M, Cursiefen C *et al.* Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b-positive macrophages. *The Journal of Clinical Investigation* 2005; 115:2363-72.
- Mashiba H, Matsunaga K. Inhibition and augmentation of lymphoma metastasis by adoptively transferred peritoneal macrophages in hamster. *Cancer Lett* 1986; 33:11-18.
- Massi D, Puig S, Franchi A *et al.* Tumor lymphangiogenesis is a possible predictor of sentinel lymph node status in cutaneous melanoma: a case-control study. *J Clin Pathol* 2006; 59:166-73.
- Massi D, Marconi C, Franchi A *et al.* Arginine metabolism in tumor-associated macrophages in cutaneous malignant melanoma: evidence from human and experimental tumors. *Human Pathology* 2007; 38:1516-25.
- Maxwell PH, Dachs GU, Gleadle JM *et al.* Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:8104-9.
- Mignatti P, Rifkin DB. Biology and biochemistry of proteinases in tumor invasion. *Physiol Rev* 1993; 73:161-95.
- Mignatti P, Rifkin DB. Nonenzymatic interactions between proteinases and the cell surface: novel roles in normal and malignant cell physiology. *Adv Cancer Res* 2000; 78:103-57.
- Mills CD, Shearer J, Evans R, Caldwell MD. Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer. *J Immunol* 1992; 149:2709-14.
- Moore R, Owens D, Stamp G *et al.* Tumour necrosis factor- α deficient mice are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med* 1999; 5:828-31.
- Moretti S, Pinzi C, Spallanzani A *et al.* Immunohistochemical evidence of cytokine networks during progression of melanocytic lesions. *Int J Cancer* 1999; 84:160-8.
- Mortarini R, Anichini A, Parmiani G. Heterogeneity for integrin expression and cytokine-mediated VLA modulation can influence the adhesion of human melanoma cells to extracellular matrix proteins. *Int J Cancer* 1991; 47:551-9.

- Mukai M, Shinkai K, Tateishi R *et al.* Macrophage potentiation of invasive capacity of rat ascites hepatoma cells. *Cancer Res* 1987; 47:2167-71.
- Murthy MS, Scanlon EF, Jelachich ML *et al.* Growth and metastasis of human breast cancers in athymic nude mice. *Clin Exp Metastasis* 1995; 13:3-15.
- Nakajima M, Morikawa K, Fabra A *et al.* Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:1890-8.
- Nicolson GL. Tumor cell instability, diversification, and progression to the metastatic phenotype: from oncogene to oncofetal expression. *Cancer Res* 1987; 47:1473-87.
- Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. Lysis of tumor cells by natural killer cells in mice is impeded by platelets. *Cancer Res* 1999; 59:1295-300.
- Normann SJ. Macrophage infiltration and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 1985; 4:277-91.
- Nowell PC. Mechanism of tumor progression. *Cancer Res* 1986; 46:2203-7.
- Orimo A, Gupta PB, SgROI DC *et al.* Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005; 121:335-48.
- Paget S. Distribution of secondary growth in carcinoma of the breast. *Lancet* 1889; 1:571-3.
- Park KG, Heys SD, Harris CI *et al.* Arginine metabolism in benign and malignant disease of breast and colon: evidence for possible inhibition of tumor-infiltrating macrophages. *Nutrition* 1991; 7:185-8.
- Pepper MS. Lymphangiogenesis and tumor metastasis; myth or reality? *Clin Cancer Res* 2001; 7:462-8.
- Pestka S, Kotenko SV, Muthunkumaran G *et al.* The interferon gamma (IFN-gamma) receptor paradigm for the multichain cytokine receptor. *Cytokine Growth Factor Rev* 1997; 8:189-206.
- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:71-8.

- Poste G, Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 1980; 283:139-46.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD *et al.* Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 1999; 277:C1-9.
- Radinsky R. Molecular mechanisms for organ-specific colon carcinoma metastasis. *Eur J Cancer* 1995; 31:1091-5.
- Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM *et al.* Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 1974; 33:1027-33.
- Ristimaki A, Narko K, Enholm B *et al.* Proinflammatory cytokines regulate expression of the lymphatic endothelial mitogen vascular endothelial growth factor-C. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273:8413-18.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK *et al.* Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83:4167-71.
- Robinson SC, Coussens LM. Soluble mediators of inflammation during tumor development. *Adv Cancer Res* 2005; 93:159-87.
- Rofstad EK, Danielsen T. Hypoxia-induced metastasis of human melanoma cells: Involvement of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis. *Br J Cancer* 1999; 80:1697-707.
- Rose DP, Connolly JM. Stimulation of growth of human breast cancer cell lines in culture by linoleic acid. *Biochem Biophys Res Comm* 1989; 164:277-83.
- Rosen EM, Goldberg ID, Liu D *et al.* Tumor necrosis factor stimulates epithelial tumor motility. *Cancer Res* 1991; 51:5315-21.
- Ryan HE, Lo J, Johnson RS. HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J* 1998; 17:3005-15.
- Schirrmacher V. Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies. *Adv Cancer Res* 1985; 43:1-73.
- Schoppmann SF, Birner P, Stöckl J *et al.* Tumor-Associated Macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol* 2002; 161:947-56.

- Schneider MR, Hoeflich A, Fisher JR *et al.* Interleukin-6 stimulates colonogenic growth of primary and metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Lett* 2000; 151:31-8.
- Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol* 2002; 64:993-8.
- Shih I, Herlyn M. Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J Invest Dermatol* 1993; 100:196-203.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359:843-45.
- Sidenius N, Blasi F. The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22:205-222.
- Skobe M, Hamberg LM, Hawighorst T *et al.* Concurrent induction of lymphangiogenesis, angiogenesis, and macrophage recruitment by vascular endothelial growth factor-C in melanoma. *Am J Pathol* 2001; 159:893-903.
- Stacker SA, Baldwin ME, Achen MG. The role of tumor lymphangiogenesis in metastatic spread. *Faseb J* 2002; 16:922-34.
- Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behaviour. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17:463-516.
- Su JL, Yen CJ, Chen PS *et al.* The role of the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* 2007; 96:541-5.
- Subarsky P, Hill RP. The hypoxic tumour microenvironment and metastatic progression. *Clin Exp Met* 2003; 20:237-50.
- Sun B, Zhang S, Zhang D *et al.* Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 2006; 16:693-8.
- Sun WH, Kreisle RA, Phillips AW, Ershler WB. In vivo and in vitro characteristic of interleukin-6-transfected B16 melanoma cells. *Cancer Res* 1992; 52:5412-15.
- Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976; 17:565-77.

- Talmadge JE, Fidler IJ. Enhanced metastatic potential of tumor cells harvested from spontaneous metastases of heterogeneous murine tumors. *J Natl Cancer Inst* 1982; 69:975-80.
- Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65:550-63.
- Tan MH, Holyoke ED, Goldrosen MH. Murine colon adenocarcinoma: syngenic orthotopic transplantation and subsequent hepatic metastases. *J Natl Cancer Inst* 1977; 59:1537-44.
- Taniguchi K, Petersson M, Hoglund P *et al.* Interferon gamma induces lung colonization by intravenously inoculated B16 melanoma cells in parallel with enhanced expression of class I major histocompatibility complex antigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:3405-9.
- Teli A, De Gregori A, Apinella M *et al.* Transforming growth factor- β enhances adhesion of melanoma cells to the endothelium in vitro. *Int J Cancer* 1997; 72:1013-20.
- Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br J Cancer* 1955; 9:539-49.
- Tisdale MJ. Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiology* 2005; 20:340-8.
- Torisu H, Ono M, Kiryu H *et al.* Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF α and IL-1 α . *Int J Cancer* 2000; 85:182-8.
- Trikha M, Zhou Z, Timar J *et al.* Multiple roles for platelet GPIIb/IIIa and α v β 3 integrins in tumor growth, angiogenesis, and metastasis. *Cancer Res* 2002; 62:2824-33.
- van Netten JP, Ashmead BJ, Parker RL *et al.* Macrophage-tumor cell association: a factor in metastasis of breast cancer? *J Leukoc Biol* 1993; 54:360-2.
- Vaupel P. The role of hypoxia inducible factor in tumor progression. *The Oncologist* 2004; 9:10-17.
- Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res* 2000; 60:203-12.

- Vidal-Vanaclocha F, Amézaga C, Asumendi A *et al.* Interleukin-1 receptor blockade reduces the number and size of murine B16 melanoma hepatic metastasis. *Cancer Res* 1994; 54:2667-72.
- Vidal-Vanaclocha F, Alvarez A, Asumendi A *et al.* Interleukin 1 (IL-1)-dependent melanoma hepatic metastasis in vivo; increased endothelial adherence by IL-1-induced mannose receptors and growth factor production in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:198-205.
- Voronov E, Shouval DS, Krelin Y *et al.* IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Sci USA* 2003; 100: 2645-50.
- Welch DR, Schissel DJ, Howery RP, Aeed P. Tumor-elicited polymorphonuclear cells, in contrast to “normal” circulating polymorphonuclear cells, stimulated invasive and metastatic potentials of rat mammary adenocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 87:7678-82.
- Wheelock EF, Weinhold KJ, Levich J. The tumor dormant state. *Adv Cancer Res* 1981; 34:107-40.
- Whitworth PW, Pak CC, Esagro J *et al.* Macrophages and cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1990; 8:319-51.
- Wolff H, Saukkonen K, Anttila S *et al.* Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58:4997-5001.
- Yates A, Bergmann C, Van Hemmen JL *et al.* Cytokine-modulated regulation of helper T cell populations. *J Theor Biol* 2000; 206:539-60.
- Young MR. Eicosanoids and the immunology of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13:337-48.
- Zhong H, De Marzo AM, Laughner E *et al.* Overexpression of Hypoxia inducible factor-1 alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res* 1999; 59:5830-5.
- Zoller M, Heumann U, Betzler M, Stimmel H, Matzku S. Depression of non adaptive immunity after surgical stress: influence on metastatic spread. *Invasion Metastasis* 1989; 9:46-8.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare tutti coloro che mi hanno aiutata nella preparazione della mia tesi di Dottorato: il Prof. Lido Calorini, mio supervisore del Corso di Dottorato, che con generosa disponibilità mi ha guidato e sostenuto durante tutta la mia attività di ricerca; il Prof. Salvatore Ruggieri che mi ha ospitato nel suo laboratorio e mi ha arricchita con i suoi preziosi consigli; il Prof. Massimo Olivotto che mi ha ospitato nel Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali dell'Università di Firenze; la Dott.ssa Francesca Bianchini e la Dott.ssa Antonella Mannini per i loro consigli, la loro disponibilità e la loro amicizia; tutte le persone e tutti gli amici che nel corso di questi anni hanno rallegrato la mia vita di laboratorio; i miei genitori, Elena, Daniele, Miranda, Genny, Monica e Sandro che mi hanno sempre sostenuto nel corso dei miei studi condividendo con me i periodi di entusiasmo e quelli di crisi.

Ringrazio l'Ente Cassa di Risparmio di Firenze, la Fondazione Cassa di Risparmio di Lucca e l'Istituto Toscano Tumori che hanno sostenuto queste ricerche.