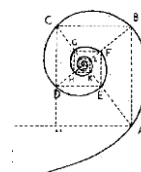




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXVIII

Anno Accademico 2014/2015

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

MED/36

**Studio non invasivo del ruolo di Cellule Staminali Mesenchimali nella progressione di
modelli di carcinoma mammario**

Dottorando : Cecilia DICEGLIE

Matricola N°R10242

TUTORE :Dott.ssa Luisa OTTOBRINI

DIRETTORE DEL DOTTORATO: Ch.mo Prof. Mario CLERICI

Sommario

RIASSUNTO	1
INTRODUZIONE.....	6
1. MICROAMBIENTE TUMORALE.....	7
1.1 LE COMPONENTI DEL MICROAMBIENTE TUMORALE.....	8
2. MSC.....	13
2.1 Rigenerazione tissutale.....	14
2.2 Immunomodulazione delle MSCs.....	15
2.3 MSCs nella veicolazione di terapie mirate.....	17
3. MSC e tumore mammario	18
1. IN VIVO IMAGING	20
6.1 Imaging ottico	25
SCOPO DEL LAVORO	31
MATERIALI E METODI	33
STUDI <i>IN VITRO</i>	34
1.1. Linee Cellulari e Reagenti	34
1.2 Migrazione	34
1.3 Infezione cellule tumorali	35
1.4 Preparazione del farmaco per gli studi <i>in vitro</i>	36
1.5 Co-culture cellulari.....	36
1.6 Conta cellulare.....	37
1.7 Valutazione dell'espressione dei geni reporter.....	37
1.8 Saggio di vitalità cellulare in fluorescenza.....	38
1.9 Saggio di attività delle Caspasi3/7	39
1.10 Real Time PCR.....	39
STUDI <i>IN VIVO</i>	40
2.1 L'Imaging <i>in vivo</i>	40
2.2 Studi animali	50
STUDI <i>EX VIVO</i>	51
3.1 Immunoistochimica (IHC)	51

ANALISI STATISTICHE	51
RISULTATI E DISCUSSIONE	52
1. <i>IN VITRO</i>	53
1.1 Migrazione	53
1.2 Preparazione dei modelli cellulari	54
1.3 Co-culture	54
1.4 Effetto dose-risposta MET-1/oATP	58
2 <i>IN VIVO</i>	60
2.1 EMT6.....	60
2.2 MET-1.....	62
2.3 SUM-159	67
CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE.....	75
BIBLIOGRAFIA	77

SOMMARIO DELLE IMMAGINI

Fig.1 Tumore nei primi stadi di sviluppo e stimolato dal microambiente tumorale per la formazione di metastasi. [Korkaya H et al. 2015]	8
Tabella 1 Componenti cellulari del microambiente tumorale	8
Fig. 2 Pathway estrinseco ed intrinseco che mediano la comunicazione tra cellule tumorali e cellule del sistema immunitario. [Cit Mantovani et al. 2008]	10
Fig. 3 Cellule mesenchimali staminali richiamate da midollo e da tessuto adiposo in sede tumorale [Cit et al. 2008]... ..	12
Fig. 4 MSCs: caratteristiche biologiche e applicazioni cliniche.	14
Fig. 5 Effetto immuno-modulatorio delle MSCs [Bernardo et al 2009].....	17
Fig. 6: Tecniche di imaging in vivo applicate in studi preclinici, esempi illustrative delle varietà di immagini prodotte dai diversi sistemi (A) microPET, (B) microCT, (C) microSPECT, (D) imaging di Fluorescenza, (E) microMRI, (F) Imaging di Bioluminescenza.....	21
Fig.7: Rappresentazione schematica delle strategie di imaging diretto e indiretto: a) marcatura diretta, b) marcatura indiretta.	23
Fig.8: Imaging della proliferazione cellulare che si mantiene di generazione in generazione.....	24
Fig. 9: Imaging ottico, analisi di fluorescenza (FL) e bioluminescenza (BL)	26
Fig. 10: Processo di BLI imaging e immagine dell'IVIS Spectrum CT in grado di leggere le reazioni di BLI	27
Fig. 11 a) esempio di transwell da 24 pozzetti; b) disegno schematico che illustra la struttura di un pozzetto della transwell.	36
Fig. 12 Illustrazione schematica del substrato fluorescente della proteasi utilizzato per il CellTiter-Fluor TM CellViability Assay.	38
Fig. 13 illustrazione schematica della bioluminescenza indotta dal clivaggio del substrato delle caspasi 3/7 nel Caspase Glo 3/7 test (Promega).....	39
Tab.2 Sequenze dei primers utilizzate per le Real Time PCR.....	40

Fig. 14 – Sistema di imaging IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer). Lo strumento è costituito da una camera oscura al cui interno è posto il sensore CCD e il sistema dei filtri in grado di rilevare l'emissione di fotoni dall'oggetto in esame.	41
Fig 15. Inizializzazione dello strumento	42
Fig 16: Impostazione dei criteri di scelta dell'acquisizione delle immagini	44
Tabella 3. Dimesione dei campi di vista (FOV)	44
Fig. 17: esempi di acquisizione in bioluminescenza o fluorescenza	45
Fig.18: Modifica dei parametri dell'immagine	46
Fig. 19. Immagine schematica del parametro di steradian	48
Fig. 20 Impostazione della ROI per la quantificazione del segnale.	48
Fig. 21. Tabella dei valori di quantificazione del segnale	49
Fig.22 Caricamento di immagini diverse come gruppo.	49
Fig.23. Modifica di una scala colore per un gruppo.	50
Fig.24. Schema sperimentale utilizzato per gli studi in vivo.	51
Fig.25 Test di migrazione delle MSCs dopo esposizione a terreno condizionato da cellule controllo e tumorali. Le capacità migratorie delle MSCs aumentano significativamente ($p<0.01$) se esposte a terreno condizionato dalle tre linee di tumore mammario.	53
Fig.26 Co-culture MET-1/MET-1+U87/MET-1+MSCs a) Acquisizione alla CCD camera delle piastre di co-cultura; b) quantificazione dell'immagine in bioluminescenza: la presenza di MSCs aumenta significativamente l'espressione della luciferasi e il numero di cellule tumorali presenti in coltura ($***p<0.001$).	55
Fig.27 Co-culture delle linee tumorali EMT-6, MET-1 e SUM 159 in assenza/presenza di oATP e-o MSCs; a) colture in transwell24 per 48h. La presenza di MSCs aumenta la proliferazione delle cellule tumorali, il trattamento congiunto con oATP riduce questo effetto. b) vitalità cellulare misurata mediante saggio con Trypan blue; si conferma il dato visualizzato dalle colture: l'incremento del numero di cellule in presenza di MSCs viene arrestato dalla presenza dell'inibitore. ($*p<0.05$; $**p<0.01$, $***p<0.001$ vs CTR; $###p<0.001$ MSCs+oATP vs MSCs).	56

Fig.28 Cocolture EMT6, MET-1 e SUMa) Acquisizione alla CCD camera di Colture cellulari in presenza o assenza del trattamento (oATP, MSCs o oATP+MSCs) in tutti i casi la fluorescenza (EMT6) e la bioluminescenza (MET e SUM159) viene indotta dalla presenza di mesenchimali e questo effetto viene inibito se le cellule vengono esposte a cotrattamento. b) quantificazioni del segnale BLI/FLI ottenuto alla CCD camera; c) le tre linee cellulari sono state lisate e le valutazioni biochimiche dell'espressione del gene fluorescente o bioluminescente mostrano gli stessi risultati ottenuti mediante CCD camera. (* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$ vs CTR; ### $p<0.001$ MSCs+oATP vs MSCs)	58
Fig.29 Valutazione dose risposta oATP sulle MET-1 a) Numero di cellule vitali in assenza di trattamento, a dosi progressivamente più elevate (500 nM, 100-300 μ M), la linea tratteggiata indica il numero di cellule controllo al giorno del trattamento; b) acquisizione alla CCD camera e relativa quantificazione di cellule controllo o in presenza di diverse dosi di trattamento; c) analisi biochimica dell'espressione della luciferasi nei lisati cellulari, normalizzata per il contenuto proteico della linea; d) saggio di vitalità cellulare in fluorescenza, a dosi più elevate dell'oATP non si osserva aumento della morte cellulare; e) saggio in bioluminescenza dell'attività delle caspasi 3/7, aumentando la concentrazione dell'inibitore si abbassa l'attività delle caspasi.	59
Fig.30 Acquisizioni FLI tumori EMT-6 dal giorno 0 all'espanto; a) Schema sperimentale dell'iniezione ortotopica di cellule tumorali EMT6 e successive acquisizioni alla CCD camera; b) immagini in fluorescenza dei due gruppi sperimentali (controllo e MSCs) al giorno 7-18-25 e 32; c) grafico per l'intensità di fluorescenza dei due gruppi nel tempo, fino al giorno dell'espanto del tumore. Il segnale è paragonabile fino al 18°giorno, dal 22° si osserva un aumento significativo della fluorescenza nel gruppo MSCs (** $p<0.01$ MSCs vs CTR).	61
Fig.31 Grafico della media dei pesi dei tumori all'espanto, il peso dei tumori nel gruppo MSCs è significativamente superiore rispetto ai tumori del gruppo controllo (* $p<0.05$).	62
Fig.32 Schema sperimentale in vivo MET1-luc.	63
Fig.33 BLI di tumori MET-1 nel tempo, acquisizioni e quantificazioni del segnale a) acquisizioni in bioluminescenza alla CCD camera dei quattro gruppi sperimentali al giorno 5,7,10,17,26 e 33; b) analisi del segnale bioluminescente nel tempo per i quattro gruppi sperimentali, la crescita del tumore è paragonabile, nei quattro gruppi, fino al giorno 10, dal giorno 17 i tumori del gruppo MSCs mostrano un segnale significativamente più elevato dei controlli (** $p<0.01$ MSCs vs CTR), mentre i tumori del gruppo MSCs+oATP riducono significativamente il loro segnale avvicinandosi al controllo (## $p<0.01$ MSCs+oATP vs MSCs)	64
Fig.34 Tumori all'espanto, giorno 33 a) Immagini dei tumori il giorno dell'espanto; b) media peso dei tumori all'espanto, il peso medio dei tumori nel gruppo MSCs è significativamente superiore alla media dei pesi nel gruppo CTR (* $p<0.05$), il trattamento con oATP riduce il peso dei tumori trattati con MSCs fino a riportarli al peso dei controlli (# $p<0.05$ MSCs+oATPvs MSC)	65

Fig.35 a) Immunoistochimica: marcatura effettuata per ki67 e CD31 per i tumori espantati dei quattro gruppi sperimentali;	66
Fig.36 Schema sperimentale in vivo per l'inoculo di cellule SUM159-luc.	67
fig.37 Acquisizioni BLI tumori SUM159 dal giorno 6 all'espanto a) immagini di bioluminescenza alla CCD camera dei tumori dei quattro gruppi sperimentali al giorno 6-10-36-44-59 e 66; b) grafico delle quantificazioni del segnale di bioluminescenza per i quattro gruppi nel tempo. Al giorno 66 la media del segnale del gruppo MSCs è significativamente maggiore rispetto al controllo (* $p < 0.05$ MSCs vs CTR) e la media del segnale del gruppo MSCs+oATP è significativamente differente rispetto al gruppo MSCs (## $p < 0.01$ MSCs+oATP vs MSCs).....	69
Fig.38 Tumori all'espanto, giorno 66; a) fotografie dei tumori il giorno dell'espanto; b) grafico che mostra la media del peso dei tumori all'espanto: La media dei pesi dei tumori MSCs è superiore alla media dei pesi del gruppo controllo (* $p < 0.05$); il trattamento con oATP riduce significativamente il peso dei tumori (* $p < 0.05$); il trattamento con oATP in presenza di MSCs causa una riduzione dei pesi dei tumori sia rispetto al controllo (* $p < 0.05$) che rispetto al gruppo MSCs (# $p < 0.05$).....	70
Fig.39 Immunoistochimica: marcatura effettuata per ki67 e CD31 per i tumori espantati dei quattro gruppi sperimentali.	71
Fig.40 Immagine schematica del meccanismo d'azione proposto, attraverso cui le MSCs stimolano la proliferazione delle cellule neoplastiche: il rilascio di TGF- β stimola la produzione e secrezione di ATP che attiva il P2X7, si instaura un feedback positivo per l'espressione del recettore che stimola le cellule tumorali verso la sopravvivenza.....	72
Fig.41 Real time su cellule tumorali per la valutazione dell'espressione di VEGF e P2X7; a) real time per la linea tumorale MET-1; b) real time per la linea cellulare SUM 159. La presenza delle MSCs in coltura stimola l'espressione dei geni VEGF e P2X7; il trattamento con oATP riduce l'espressione dei due geni anche se quando il trattamento viene effettuato in presenza di MSCs.	73

RIASSUNTO

SOMMARIO

Introduzione:

Le Cellule Mesenchimali Staminali (MSCs) sono definite come una popolazione eterogenea di cellule stromali staminali e possono essere isolate da molti tessuti adulti come il midollo osseo o il tessuto adiposo. E' stato dimostrato che, nelle fasi iniziali di sviluppo di un tumore, vengono richiamate nella regione della lesione attraverso un meccanismo di *homing* e diventano così parte integrante del TME. Recentemente, numerosi studi hanno mostrato come le MSCs giochino un importante ruolo nella progressione tumorale. Infatti possono stimolarne la progressione e la mobilitazione rilasciando citochine che agiscono sulle CSCs, soprattutto nel tumore mammario. Tuttavia, resta ancora poco chiaro il meccanismo molecolare attraverso cui le MSCs promuovono l'angiogenesi, la metastatizzazione e la progressione del tumore. Recentemente è stata posta attenzione sul ruolo del recettore purinergico P2X7 nella stimolazione della crescita e della metastatizzazione tumorale. E', infatti, stato proposto che l'attivazione del recettore, mediata dal rilascio di ATP a sua volta stimolata dal TGF- β , sia responsabile dell'induzione della migrazione nelle cellule tumorali. E' stato inoltre descritto come la crescita di tumori over-esprimenti il gene P2X7 siano down-regolati dall'utilizzo di oATP. Lo scopo del presente studio è porre in luce l'effettivo coinvolgimento delle MSCs nello sviluppo tumorale e valutare un possibile *pathway* attraverso cui avviene la comunicazione tra queste e le cellule tumorali.

Materiali e Metodi:

Tecniche di imaging ottico *in vivo* e *in vitro* sono state utilizzate al fine di valutare l'influenza delle MSCs sulla progressione tumorale. Due linee di tumore mammario di origine murina (EMT6 e MET-1) e una linea di origine umana (SUM159) sono state infettate con un costrutto lentivirale per l'espressione di un gene reporter (*mCherry* o *Luciferasi*). Queste cellule sono state utilizzate per studi *in vitro* e *in vivo*. Sono state effettuate co-culture tra queste linee cellulari e le MSCs, incubate per 48h in assenza o presenza dell'inibitore dei recettori purinergici oATP (100 μ M). Al termine del trattamento è stata valutata la vitalità cellulare (conta con trypan blue), l'espressione del gene reporter tramite il sistema di imaging con CCD camera e lettura al luminometro/fluorimetro dei lisati cellulari. Con le tre linee tumorali sono stati generati tre diversi modelli ortotopici murini di tumore mammario attraverso l'inoculo delle cellule nel grasso intramammario degli animali. Gli animali sono stati iniettati con MSCs e trattati o meno con oATP. Sono stati effettuati studi longitudinali tramite acquisizioni di BLI/FLI sui gruppi sperimentali generati. Al termine dell'esperimento, gli animali sono stati sacrificati e i tumori espianati per le indagini *ex vivo*.

Risultati:

Le MSCs aumentano significativamente la capacità migratoria se esposte a terreni condizionati dalle linee tumorali in esame. La valutazione degli effetti della presenza di MSCs è stata condotta su co-culture *in vitro* di cellule tumorali e MSCs. I risultati ottenuti mostrano, per tutte le tre le linee tumorali, un aumento della proliferazione delle cellule neoplastiche indotto dalla presenza di

MSCs: il numero di cellule cresce significativamente, così come il segnale in BLI/FLI ottenuto dopo acquisizioni con la CCD camera e l'intensità del segnale data dai lisati cellulari. Il trattamento delle co-culture con oATP inibisce la proliferazione indotta dalle MSCs sulle linee tumorali. Le stesse linee tumorali sono state utilizzate per gli studi *in vivo*. I modelli ortotopici di tumore mammario mostrano un aumento delle dimensioni e della velocità di crescita nei tumori dei gruppi trattati con MSCs. Anche *in vivo* il trattamento con oATP arresta la crescita tumorale promossa dalle cellule mesenchimali. Tale effetto risulta particolarmente evidente nei modelli ottenuti con cellule tumorali umane (SUM159) in topi atimici. L'effetto dell'inibitore sottolinea come vi sia una stretta correlazione tra l'induzione della proliferazione mediata dalle MSCs, e l'inibizione del recettore P2X7.

Conclusioni:

I dati precedentemente descritti sottolineano come le MSCs isolate da tessuto adiposo abbiano un ruolo fortemente stimolatorio sulla crescita di tumori mammari. L'effetto diretto sulle popolazioni tumorali viene inibito dall'utilizzo di oATP. Sono in corso studi atti a valutare il coinvolgimento del *pathway* di P2X7 nella stimolazione generata dalle MSCs. Infatti una delle citochine più secrete nel TME è il TGF- β . Negli stadi tardivi della progressione tumorale, questa citochina ha un'importante funzione pro-tumorale e sembra che stimoli la migrazione e la metastatizzazione di queste cellule attivando anche il recettore P2X7. Le MSCs, che nel TME rilasciano proprio TGF- β , potrebbero stimolare la proliferazione delle cellule tumorali attivando proprio questo recettore tramite TGF- β . Tale meccanismo dovrà essere studiato in maniera approfondita dato il contributo osservato delle MSCs nella progressione tumorale e in quanto tale meccanismo potrebbe costituire un nuovo bersaglio terapeutico.

ABSTRACT

Introduction:

Mesenchymal stem cells (MSCs) are defined as a heterogeneous population of stromal stem cells and can be isolated from many adult tissues like bone marrow or adipose tissue. Many studies have shown that MSCs play a key role in tumour progression. MSCs recruited in tumour sites can stimulate tumour cell progression and mobilization, especially in breast cancer. However it is still unclear the molecular mechanism used by MSCs to promote angiogenesis, metastasis and tumour progression. Recently, studies demonstrated that P2X7 purinergic receptor plays a key role in stimulating tumour cell mobilization and metastatization. In fact, they have proposed that TGF- β stimulation promotes ATP release from cancer cells that stimulates P2X7 receptor activation. This activation stimulates neoplastic cells migration and then promoting tumour metastatization. Moreover, tumour cells that over-express P2X7 receptor grow faster than other cells and *in vivo* generate larger tumours. In these animals, the use of oATP (a P2X7 inhibitor) reduces tumour dimensions.

The aim of this study is to confirm MSCs role in tumour progression and to clarify the involvement of P2X7 receptor as a key mediator of MSC-mediated induction of tumor growth.

Mat & met:

We used *in vitro* and *in vivo* optical imaging to study the influence of MSCs in tumour progression. Murine (EMT-6 and MET-1 cell lines) and human (SUM159) mammary carcinoma cells were infected with a lentiviral construct expressing mCherry or Luciferase as a constitutive reporter gene. These cells were used for *in vitro* and *in vivo* studies. Tumour cells were cultured in the presence or absence of MSCs for 48h with or without an inhibitor: oATP (100 μ M). In *in vitro* studies cell viability was monitored by Trypan blue exclusion test, and by reporter gene activity. To perform *in vivo* studies, tumor cells (EMT-6, MET-1 and SUM159) were injected into mammary fat pad of nude mice. mCherry or Luciferase activity was used to assess tumour growth over time by whole body optical imaging. MSC injection and the treatment with the inhibitors started after tumour establishment, and the longitudinal imaging was further performed twice a week. At the endpoint, tumors were explanted and tumour weight and volume were evaluated for each experimental group.

Results:

In vitro studies showed that MSC migration ability significantly increases after treatment with tumour conditioned culture medium. Moreover, tumor cells proliferation was increased by MSCs co-culture as demonstrated by cell count and by reporter photon emission observed by optical imaging and biochemical analysis in cell lysates. This effect was prevented by treatment with the inhibitor oATP. *In vivo* data confirmed *in vitro* observations, in fact, a significant increase of tumour dimension at the endpoint was detected in animals injected with MSCs. The evaluation of tumour growth by optical imaging of reporter activity over time, demonstrated that the presence of MSCs

significantly stimulated the proliferation of mammary carcinoma cells whereas the treatment with oATP prevented this phenomenon. These results were validated by *ex vivo* analysis. In comparison to control group, tumour weight and volume were higher in the MSC treated group, while they were similar to controls for the inhibitor treated ones. The inhibitory effect of oATP underlines a key role of P2X7 receptor in tumor growth and a correlation between MSCs tumour stimulation and P2X7 activity.

Conclusions:

These data demonstrated the capability of stem cells to stimulate the rate of breast cancer growth. These preliminary studies pave the way for the understanding of the molecular mechanism of MSC-mediated induction of tumor cell proliferation, proposing the involvement of the purinergic receptor pathway. In the TME, mesenchymal cells release a large amount of TGF- β that could support tumour progression and metastatization by indirectly activating P2X7 receptors. In this scenario, the recruitment of endogenous MSCs to tumour sites acquires important implications. In fact, it could be useful to understand the rate of endogenous MSC migration to tumour sites to evaluate if an inhibition of MSC-tumor cross talk or MSC-mediated immunomodulation could help in increasing anti-neoplastic treatment efficacy.

INTRODUZIONE

1. MICROAMBIENTE TUMORALE

I tumori sono strutture complesse in grado di interagire con cellule e strutture circostanti e creare una fitta rete di organizzazione strutturale in grado di promuovere la progressione e il sostegno del tumore stesso. Intorno al tumore si stabilisce una gerarchia cellulare precisa, che provvede al suo sostentamento. La struttura dei tumori può infatti essere considerata al pari di quella di un organo in cui diversi tipi cellulari interagiscono tra loro al fine di promuovere la crescita del tumore e la sua metastatizzazione. Il microambiente all'interno del quale si sviluppa e cresce il tumore partecipa dunque attivamente alla sua progressione (fig.1).

Come in molti organi, anche nei tumori la presenza di cellule staminali tumorali (*Cancer Stem Cells*, CSCs), in grado di auto-rinnovarsi illimitatamente e di differenziare in diverse tipologie cellulari, sembra essere di vitale importanza per il sostegno delle cellule tumorali. Numerose recenti evidenze mostrano come le CSCs siano responsabili di una fitta rete di comunicazione con le cellule che costituiscono il microambiente tumorale e che vengono reclutate nelle vicinanze del tumore, attraverso un sofisticato meccanismo che comprende la produzione e il rilascio di citochine e fattori di crescita da entrambe le parti¹.

Oltre alla comunicazione tra cellule di diversa tipologia che risiedono nel microambiente tumorale, è stato descritto² ma non ancora del tutto chiarito, un meccanismo molecolare attraverso cui diversi tipi cellulari vengono reclutati in sede tumorale andando così a generare la componente cellulare del TME costituita principalmente da cellule immunitarie, cellule epiteliali e Cellule Mesenchimali Staminali (MSCs).

È stato descritto, ad esempio, come le CSCs rilascino il *colony stimulating factor-1* (CFS-1) reclutando così i macrofagi nella sede della lesione primaria e stimolando il rilascio del fattore di crescita epidermico (EGF) da parte dei macrofagi stessi importante nella formazione di neovasi che sostengono il trofismo del tumore.³ Inoltre, l'instaurarsi dell'ipossia all'interno del tumore stimola, tra gli altri, la trascrizione e la produzione del fattore di crescita placentale (PGF) il quale a sua volta promuove l'*homing* delle MSCs in sede tumorale e la produzione di numerose chemochine tra cui CXCL10 e CCL5 che agendo sui rispettivi recettori sulle CSCs, promuovendo e sostenendo la crescita tumorale stimolandone la motilità, l'invasività e la metastatizzazione^{1,2}.

Il continuo rilascio di fattori di crescita e citochine tra cellule tumorali e del microambiente tumorale garantisce l'instaurarsi di un *feedback* positivo che stimola la progressione del tumore e la sua metastatizzazione, alla luce di queste delicate interazioni risulta chiaro il ruolo cruciale costituito dalle componenti del TME per la formazione e il sostegno del tumore.²

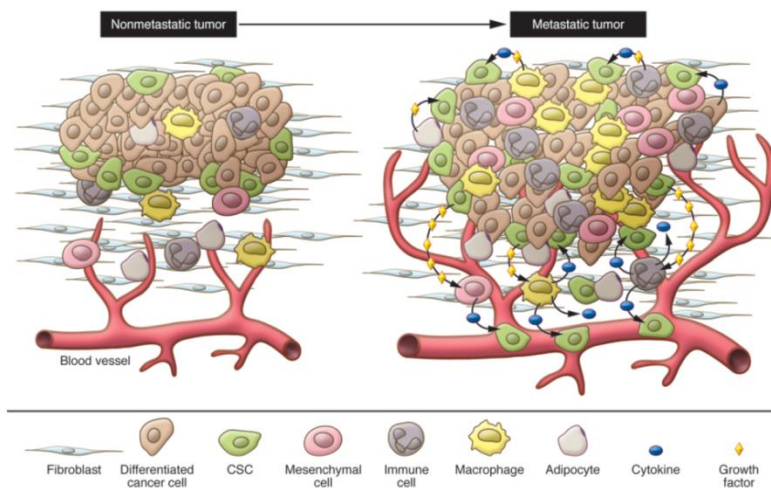


Fig.1 Tumore nei primi stadi di sviluppo e stimolato dal microambiente tumorale per la formazione di metastasi. [Korkaya H et al. 2015]

1.1 LE COMPONENTI DEL MICROAMBIENTE TUMORALE

Il TME può essere suddiviso in diverse componenti: una chimica costituita principalmente dalla Pressione Parziale di Ossigeno (PO_2) e da piccole molecole e metaboliti e una componente cellulare, che include cellule tumorali, cellule stromali e della matrice extracellulare. Tra queste, le cellule della componente stromale sono: le cellule vascolari endoteliali (ECs) e periciti, le cellule linfatiche, i fibroblasti, i miofibroblasti e vari tipi cellulari derivati dalle cellule del sistema immunitario come macrofagi, neutrofili, mastociti e le MDSCs⁴ (che costituiscono la componente del sistema immunitario che interagisce con il tumore) e le MSCs² (Tab.1).

Cellule del TME
Cellule del sistema immunitario
Cellule Mesenchimali Staminali
Fibroblasti associati al tumore
Cellule endoteliali

Tabella 1 Componenti cellulari del microambiente tumorale

Componente immunitaria del TME

I mediatori e gli effettori del sistema immunitario sono costituenti importanti del TME. Cellule infiammatorie, chemochine e citochine sono state identificate nel microambiente tumorale di ogni tipo di tumore in modelli animali⁵. Già nel 1863 Virchow postulò l'idea che l'origine dei tumori fosse in siti di infiammazione cronica, basandosi sull'osservazione che alcune classi di irritanti, insieme al danno tissutale, possono causare un aumento della proliferazione cellulare.⁶ Per meglio comprendere il ruolo dell'infiammazione nell'evoluzione dei tumori è importante capire come essa contribuisca ai processi fisiologici e patologici. Infatti, non tutti i processi infiammatori cronici, come ad esempio potrebbe essere la psoriasi, sono necessariamente associati ad un incremento del rischio di insorgenza di tumori. Tuttavia, in altri casi, la presenza di cellule infiammatorie identificate nei pressi del tumore è spesso associata a prognosi infauste. E' dunque importante capire come risulti finemente regolato il bilancio tra ruolo anti e pro tumorale nelle cellule del sistema immunitario.⁷ Se da un lato le cellule del sistema immunitario sono in grado di riconoscere e attivare una risposta di soppressione nei confronti delle cellule neoplastiche tanto da poter essere potenzialmente utilizzate in terapie antitumorali, come nel caso delle immunoterapie, dall'altro possono essere attivate in senso inverso per il sostegno del tumore stesso.⁸

I tumori e l'infiammazione risultano essere connessi attraverso due *pathway* diversi: intrinseco ed estrinseco⁹. Il primo è attivato da eventi genetici che causano la trasformazione cellulare e l'inizio della neoplasia. Le cellule trasformate producono e rilasciano mediatori infiammatori che a loro volta generano attorno al tumore un microambiente infiammatorio. Il *pathway* estrinseco riguarda invece condizioni infiammatorie che aumentano il rischio di sviluppare tumori in determinati siti anatomici come prostata o colon. I due *pathway* risultano nell'attivazione di fattori trascrizionali come NF- κ B o HIF-1 α nelle cellule tumorali determinando un aumento della trascrizione e produzione di citochine e chemochine importanti nel reclutare nel sito di lesione tumorale varie tipologie di cellule leucocitarie (macrofagi, mastociti, neutrofili eosinofili) (Fig.2).⁷

Durante lo sviluppo tumorale numerose tipologie cellulari dell'immunità innata e adattativa vengono reclutati, attraverso mediatori dell'infiammazione, al sito di lesione. Alcune di esse inibiscono lo sviluppo della lesione attivando una risposta citotossica verso le cellule neoplastiche, altre invece ne sostengono la crescita. In particolare, i linfociti T citotossici in risposta alla presentazione di antigeni tumorali da parte di cellule presentanti l'antigene (APC) o cellule dendritiche (DC), rilasciano enzimi litici e perforine in grado di lisare le cellule tumorali. Le cellule Natural Killer (NK) vengono attratte nel sito tumorale e sono in grado di richiamare macrofagi o danneggiare direttamente la membrana delle cellule bersaglio. Le NK riconoscono inoltre cellule che non presentano una quantità sufficiente di molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) da attivare una risposta specifica citotossica o espongono una loro forma alterata, uno stato tipico di alcune forme tumorali¹⁰. Nel microambiente tumorale intervengono anche i linfociti T *helper*

(Th): linfociti in grado di riconoscere antigeni tumorali, attivare la maturazione e l'attivazione delle APC e attivare i linfociti T citotossici. Un'ulteriore componente immunitaria del TME è costituita dai linfociti T regolatori (Treg) che hanno la funzione di sopprimere le risposte autoimmuni e sono in grado di attenuare la risposta immunitaria verso il tumore.¹¹

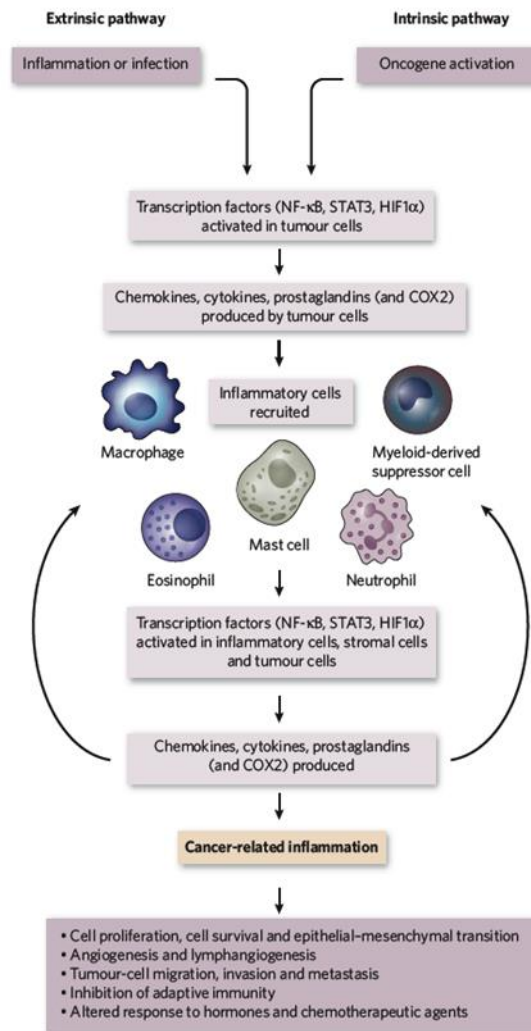


Figura 1 Pathway estrinseco ed intrinseco che mediano la comunicazione tra cellule tumorali e cellule del sistema immunitario. [Mantovani et al. 2008]

Uno dei tipi cellulari leucocitari attivati e richiamati dalle cellule tumorali sono i Macrofagi Associati al Tumore (TAMs). I macrofagi si distinguono in due sotto-popolazioni diverse: M1 ed M2, i primi hanno un ruolo pro-infiammatorio e di fagocitosi. Gli altri hanno un ruolo opposto, sono associati ad una elevata espressione di IL-10 e una down-regolazione delle molecole del complesso

maggior di istocompatibilità di tipo II (MHC-II) e IL-12, provvedono, inoltre, ad inibire i macrofagi di tipo M1 e a produrre importanti fattori implicati nella riparazione del tessuto danneggiato.¹²

Perché l'infiltrato leucocitario giunga nella sede della lesione tumorale primaria è necessaria una stimolazione dell'angiogenesi. Infatti, il fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGF), prodotto e rilasciato dalle stesse cellule tumorali, è un potente fattore chemotattico per i monociti che vengono così richiamati nella sede del tumore primario e nelle nicchie metastatiche.

Componente epiteliale-vasale del TME

L'angiogenesi e il processo di formazione di nuovi vasi svolgono un ruolo cruciale per il sostegno, la crescita tumorale e la sua metastatizzazione.

I precursori endoteliali sono attratti nella sede del tumore primario da citochine rilasciate dalle CSCs, differenziano quindi in cellule endoteliali e, interagendo direttamente con le cellule tumorali, svolgono un ruolo primario nella generazione dei nuovi vasi attorno al tumore. Le cellule endoteliali a loro volta, rilasciano citochine in grado di regolare direttamente le CSCs mantenendone attivo l'autorinnovamento e sostenendo la metastatizzazione del tumore.¹³

All'interno del tumore in crescita, in seguito alla de-regolazione della proliferazione delle cellule neoplastiche, si vengono a formare delle porzioni più ipossiche, in cui la percentuale di ossigeno decresce fortemente. La riduzione di ossigeno dovrebbe costituire un fattore limitante per le cellule in attiva proliferazione e metabolicamente attive, tuttavia le cellule tumorali superano questo ostacolo modulando l'espressione genica e l'attività di fattori inducibili dall'ipossia (per esempio HIF-1). Infatti, in seguito all'instaurarsi dello stato ipossico la subunità α del fattore trascrizionale HIF-1, la cui degradazione viene regolata dalla percentuale di ossigeno presente (HIF-1 α), non viene degradata per via proteosomale e risulta più stabile. HIF-1 α è così in grado di migrare fino al nucleo e dimerizzare con la subunità costitutivamente espressa, HIF1- β . Nella sua forma attiva dimerizzata, il fattore trascrizionale lega le sequenze *Hypoxia Responsive Elements (HRE)* presenti sui promotori di specifici geni attivandone la trascrizione. HIF-1 regola la trascrizione di molteplici geni coinvolti in diversi pathway molecolari fortemente implicati nella crescita e metastatizzazione tumorale. Fra tutti, VEGF è uno dei fattori regolati da HIF e attore principale della neo-angiogenesi. La formazione di nuovi vasi è importante per le cellule tumorali per l'apporto di nutrienti e ossigeno che supportano la crescita tumorale e il processo di metastatizzazione. VEGF costituisce il primo fattore pro-angiogenico e quindi insieme al suo recettore si è affermato come principale target di terapie antiangiogeniche.^{1, 2}

MSCs nel TME

Un'altra delle componenti cellulari presenti nel microambiente tumorale è costituita dalle MSCs. Queste cellule vengono richiamate in sede tumorale dall'azione delle CSCs che rilasciano citochine circolanti in grado di stimolare l'*homing* di questa popolazione cellulare verso il tumore². Vengono richiamate al tumore sia le MSCs derivanti dal midollo osseo che quelle derivanti dal tessuto adiposo (Fig.3). Entrambe queste popolazioni contribuiscono a creare parte del microambiente associato al tumore.¹⁴ Sono molti i fattori implicati nella migrazione delle cellule mesenchimali: citochine, chemochine, fattori di crescita e altre molecole. Il primo passo per la migrazione di questa popolazione cellulare consiste nell'extravasazione: le cellule devono aderire all'endotelio vascolare, permeare al suo interno per poi migrare verso il tumore. In questa fase intervengono numerose citochine. Nei tessuti tumorali sono stati riscontrati alti livelli del fattore di necrosi tumorale- α (TNF- α)¹⁵, citochina in grado di up-regolare l'espressione di *vascular cellular adhesion molecule-1* (VCAM-1) sulle cellule mesenchimali attivandone l'adesione alle cellule endoteliali. Un effetto simile viene descritto per IL-1 β e INF- γ . Inoltre, le MSCs esprimono il recettore per l'IL-6 altamente espressa dalle cellule tumorali. L'IL-6 ha un duplice effetto da un lato richiama le MSCs in sede tumorale, dall'altro determina l'aumento di espressione di CXCL6-5 e 7 coinvolte nel richiamo di cellule immunitarie, nell'induzione della mitosi e dell'angiogenesi¹. Le cellule tumorali esprimono inoltre alti livelli di alcune chemochine come stromal cell derived factor-1 (SDF-1) e CXCR-4 anch'esse implicate nella chemo-attrazione delle MSCs. Importanti nella migrazione delle cellule staminali sono anche fattori di crescita e fattori trascrizionali tra cui un ruolo cruciale viene svolto da HIF-1 α , fattore trascrizionale largamente espresso dalle cellule tumorali nelle regioni ipossiche².

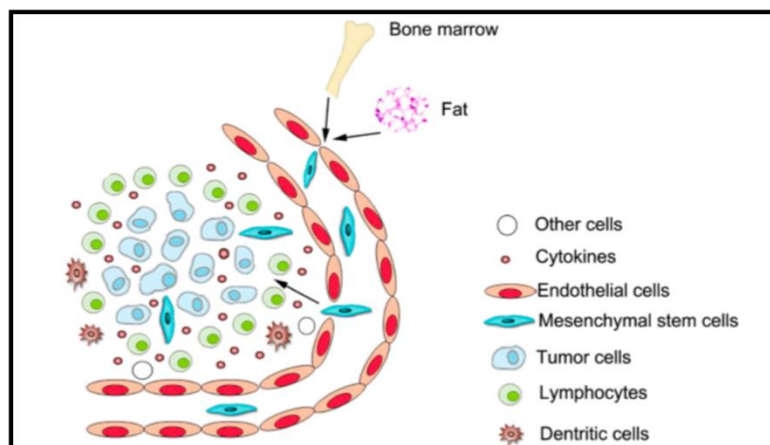


Fig. 3 Cellule mesenchimali staminali richiamate da midollo e da tessuto adiposo in sede tumorale [Sun et al. 2014]

In associazione ai tumori sono state identificate due tipologie diverse di cellule mesenchimali con ruoli opposti: in grado di promuovere o inibire la progressione delle cellule tumorali⁵. A determinare lo *switch* tra un tipo cellulare e l'altro, sembra giocare un ruolo importante il gradiente di citochine che si viene a formare nel TME.

Il tumore in crescita determina una forte infiammazione del tessuto circostante, un alto livello di citochine pro-infiammatorie rilasciate nel microambiente tumorale richiama al sito tumorale le cellule mesenchimali in grado di promuovere la crescita tumorale attirando a loro volta cellule e fattori che inibiscono la risposta immunitaria verso il tumore.

Un ruolo importante nel contesto della promozione tumorale sostenuta delle MSCs, viene svolto da TGF- β altamente espresso da queste cellule. L'incremento dei livelli di TGF- β nella sede tumorale può attivare o inibire la proliferazione delle cellule neoplastiche¹⁶ a seconda dello stadio di sviluppo del tumore. Infatti, negli stadi iniziali, TGF- β è in grado di stimolare la risposta proinfiammatoria ai danni delle cellule tumorali. Tuttavia, negli stadi tardivi, l'aumento delle concentrazioni di TGF- β stimola un processo noto come Transizione Epitelio Mesenchima (EMT) in cui le cellule immobili epiteliali, attorno al tumore, modificano la loro morfologia diventando cellule altamente mobili in grado di dare inizio al processo di metastatizzazione. TGF- β agisce anche su cellule del Sistema immunitario inibendo la proliferazione di NK e linfociti T e bloccando l'attività di linfociti citotossici riducendo la trascrizione dei geni codificanti enzimi chiave per la loro risposta.^{17,18}

Un recente studio del 2011 mostra un importante *network* di citochine che media l'interazione tra le MSCs e le cellule tumorali che rilasciano IL-6. Questa interagisce con il corrispondente recettore espresso dalle cellule mesenchimali che, in risposta alla stimolazione di IL-6, rilasciano CXCL7 che a sua volta induce la secrezione di una serie di citochine dalle cellule tumorali incluse IL-6, IL8, CXCL6 e 5. Tutte queste citochine stimolano l'autorinnovamento della popolazione di cellule staminali tumorali. Inoltre l'aumento di IL-6 circolante agisce sulle MSCs generando un feedback positivo per il rilascio di CXCL7.¹⁹

2. MSC

Le Cellule Mesenchimali Staminali sono definite come una popolazione eterogenea di cellule stromali con caratteristiche di autorinnovamento e multipotenza, cioè in grado di differenziare in molteplici *lineages* cellulari²⁰. Riserva di questa popolazione cellulare sono molti tessuti adulti tra cui il midollo osseo o il tessuto adiposo²¹. Nel midollo osseo la frequenza di cellule staminali è stata stimata tra lo 0.001 e lo 0.01%. Tuttavia, la percentuale di queste cellule diminuisce drasticamente con l'avanzare dell'età passando quindi da 1/100000 cellule mesenchimali nel midollo di un bambino a 1/10000000 cellule in un adulto di 80 anni²². Ad oggi molteplici sforzi sono

stati fatti al fine di studiare e meglio conoscere le potenzialità di questa promettente popolazione cellulare. Sono infatti note le notevoli potenzialità di queste cellule in molteplici ambiti (Fig.4)²³. Primo fra tutti la rigenerazione tissutale, è infatti noto che tali cellule siano in grado di differenziare in numerosi tipi cellulari permettendo la riparazione di danni e lesioni tissutali. Le notevoli caratteristiche immunomodulatorie di queste cellule consentono di attenuare le risposte infiammatorie in tessuti danneggiati per lasciar spazio alla rigenerazione del danno. In fine la capacità di essere richiamate in siti lesionati o infiammati consente di ipotizzare un loro utilizzo per la veicolazione di farmaci e specifiche molecole direttamente nella regione di interesse.

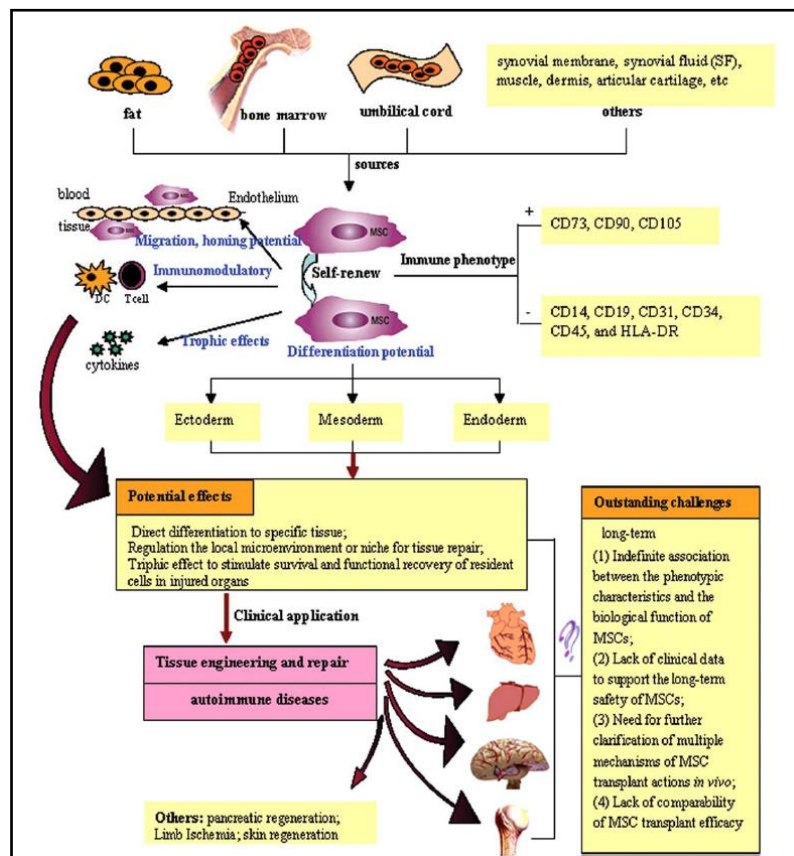


Fig. 4 MSCs: caratteristiche biologiche e applicazioni cliniche.[Yi-Ling Si et al 2011]

2.1 Rigenerazione tissutale

Un ruolo particolarmente delicato viene svolto dalle MSCs nella rigenerazione tissutale²². Molti sforzi in ambito scientifico sono stati condotti nello studio delle implicazioni di queste cellule nei processi rigenerativi. Una delle caratteristiche principali delle MSCs riguarda la capacità di differenziare in molteplici *lineages* cellulari: tessuto osseo, cartilagine, muscolare e tessuto adiposo^{24,25}. Questa caratteristica, riproducibile *in vitro* attraverso l'utilizzo di terreni di coltura

specifici e arricchiti con citochine e fattori di crescita tali da indirizzare il differenziamento in un senso o nell'altro, risulta essere importante e può essere sfruttata in varie tipologie di lesioni tissutali. Ad esempio questo potenziale rigenerativo è stato ampiamente studiato per quel che riguarda l'infarto miocardico acuto (AMI) in cui è stata valutata la capacità delle MSCs di differenziare in cardiomiociti irreversibilmente compromessi in questa patologia. Numerosi studi hanno dimostrato l'elevato potenziale terapeutico del trapianto di cellule mesenchimali in grado non solo di differenziare in cellule muscolari cardiache e cellule endoteliali vascolari²⁶⁻²⁷, ma di mobilitare numerosi fattori come SDF-1, VEGF, angiopoietina-1 che stimolano il processo rigenerativo²⁸⁻²⁹.

Inoltre, numerosi lavori hanno focalizzato l'attenzione sul potenziale rigenerativo delle MSCs in ambito di patologie e lesioni neuronali. In questo caso, più che la loro capacità di differenziare in tipi cellulari neuronali, è stato dimostrato il loro elevato effetto trofico. Infatti, la capacità di secernere fattori neurotrofici, fattori di crescita neuronale (NGF), fattori angiogenici e vascolari (angiopoietina-1 o VEGF) e fattori di immuno-modulazione potrebbe stimolare la sopravvivenza e il differenziamento neuronale, potrebbe inoltre stimolare la formazione di nuovi vasi consentendo la migrazione di cellule staminali neurali endogene in grado di provvedere alla riparazione della lesione tissutale³⁰.

Un'ulteriore applicazione proposta per l'utilizzo di queste cellule staminali riguarda la riparazione dei danni retinici dovuti a processi degenerativi progressivi (come la retinopatia e la maculopatia senile). Recenti studi hanno valutato la capacità delle MSCs derivate da midollo osseo o da tessuto adiposo di rigenerare l'epitelio retinico danneggiato³¹⁻³².

Le MSCs sono inoltre state ampiamente utilizzate nella rigenerazione di danni scheletrici come ad esempio nel caso di danni ossei³³, cartilaginei³⁴ o a livello della colonna vertebrale³⁵.

2.2 Immunomodulazione delle MSCs

Le MCSs mostrano capacità immuno-modulatorie uniche, descritte da numerosi studi compiuti sia *in vivo* che *in vitro*. Questo effetto viene esplicato sui numerosi tipi cellulari che compongono il sistema immunitario. Le MSCs giocano un duplice ruolo nel processo di riparazione di un danno tissutale, intervenendo sul processo infiammatorio iper-stimolato andando ad attenuarlo, e creando intorno alla lesione un ambiente ricettivo per la riparazione del danno²⁸.

Le MSCs modulano la risposta infiammatoria down-regolando le citochine pro-infiammatorie e up-regolando la produzione di fattori anti-infiammatori. E' stato riportato che le MSCs, dopo opportuna stimolazione, incrementano la produzione e il rilascio di alcune citochine, tra tutte soprattutto IL-6 e il TGF- β ^{36,37}. Entrambi questi fattori sono in grado di regolare cellule pro-infiammatorie Th (Casiraghi 2008), prevenendo la risposta delle cellule Th1 .

Non sono ancora del tutto noti i meccanismi attraverso cui le MSCs sono in grado di agire su diverse popolazioni cellulari dell'immunità. In primo luogo possono inibire la proliferazione dei linfociti T e soprattutto il loro effetto citolitico. E' stato, infatti, osservato che la soppressione cellulare esercitata dalle MSCs sui linfociti T attivati è generata dal rilascio di fattori antiproliferativi come TGF- β , del fattore di crescita epatocitario (HGF), di ossido nitrico, prostaglandine o indoleamina 2,3 diossigenasi e dal contatto cellula-cellula. I linfociti T inibiti dalle cellule mesenchimali, non vengono condotti verso l'apoptosi ma viene bloccata la loro capacità di dividersi prevenendo così la risposta antigene-specifica.¹⁶

Le MSCs inoltre sono in grado di inibire il differenziamento, la maturazione e la funzionalità delle cellule dendritiche che non riuscendo a maturare in APC, perdono la capacità di attivare i linfociti T. Infatti, le MSCs modulano la risposta immunitaria attraverso l'inibizione del differenziamento monocitario in cellule dendritiche mature in grado di presentare l'antigene e svolgere il loro ruolo nell'attivazione dei linfociti T. Esperimenti di cocoltura tra MSCs e monociti immaturi determinano un aumento della concentrazione di IL-6 e IL-10 nel terreno di coltura³⁸ e l'inibizione del processo di differenziamento dei monociti. A seguito dell'esposizione ad elevate concentrazioni di IL-10, i monociti a loro volta sono in grado di produrre e secernere questa interleuchina. Una caratteristica dei macrofagi associati al tumore di tipo M2 è proprio quella di secernere IL-10 e rispondere al suo stimolo. Quindi, l'aumento di concentrazione di IL-10 potrebbe determinare lo switch dei macrofagi in M2³⁹. E' stato inoltre descritto come altri due fattori secreti dalle MSCs siano importanti nei processi di immunomodulazione: PGE2⁴⁰ e HLA-G⁴¹. Il primo, stimolato dalla presenza di IL-6, sostiene l'inibizione del differenziamento monocitario, mentre il secondo fattore, regolato dalle concentrazioni di IL-10, è implicato nell' immunosoppressione ai danni di NK.

Le MSCs sono anche in grado di inibire la proliferazione e l'azione di linfociti B attivati e di NK stimulate dalla presenza di IL-2, mentre promuovono la formazione di Treg. (Fig.5)

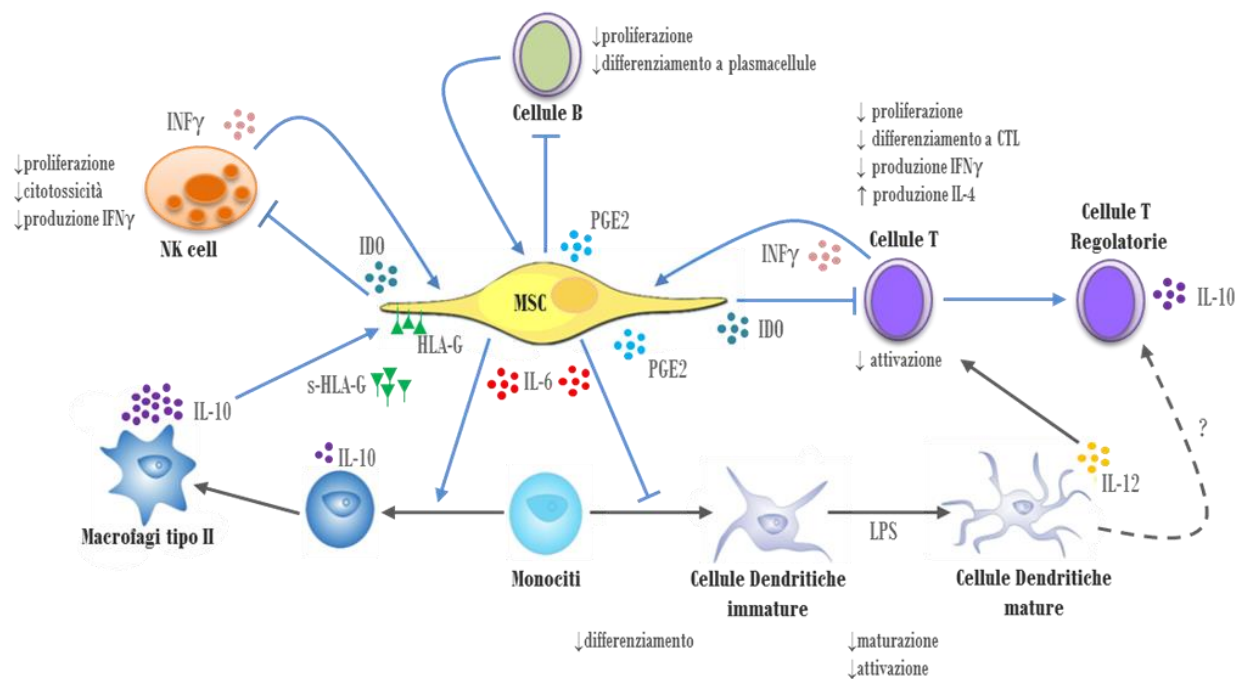


Fig. 5 Effetto immuno-modulatorio delle MSCs [Bernardo et al 2009]

2.3 MSCs nella veicolazione di terapie mirate

Le MSCs vengono richiamate nella regione di sviluppo tumorale attraverso il meccanismo di *homing*, mediante il rilascio di un gradiente di chemochine che attrae queste cellule staminali^{42, 43, 44}. Ad oggi non sono del tutto note le ragioni di tale richiamo che potrebbe essere dovuto proprio al forte effetto immunomodulatorio svolto dalle MSCs. Numerosi sforzi sono stati compiuti dai ricercatori al fine di sfruttare questa caratteristica cellulare per *targettare* le cellule tumorali e sviluppare nuove terapie mirate contro queste ultime.

In diversi modelli sperimentali tumorali come gliomi, sarcomi, carcinomi ovarici e mammari, è stata osservata una migrazione di cellule MSCs in sede tumorale⁴⁵. Grazie a questa naturale caratteristica, queste cellule sono state considerate come ideali veicoli terapeutici per il trasporto di farmaci antitumorali. La capacità delle MSCs di essere richiamate in sedi proinfiammatorie e tumorali è stata utilizzata con successo per veicolare virus oncolitici in modelli murini di tumori mammari⁴⁶, gliomi⁴⁷ o tumori alle ovaie⁴⁸. Tuttavia, è necessario considerare che le MSCs costituiscono cellule vitali e non un veicolo inerte. Questo comporta che l'interazione con cellule particolari come le CSCs potrebbe influenzare il ruolo delle MSCs, inibendo la riuscita del processo terapeutico. L'utilizzo di MSCs per il trattamento di patologie umane comporta l'insorgenza di numerose problematiche, prima fra tutte l'instabilità genetica che potrebbe causare una trasformazione in senso maligno di queste cellule. Inoltre la trasformazione *in vitro* delle MSCs

aumenta di per sé il loro potenziale oncogenico. Per questa ragione è stato proposto l'utilizzo delle microparticelle derivate dalle MSCs nel trattamento mirato verso alcune patologie. E' stato precedentemente descritto come le MSCs giunte nel microambiente tumorale, siano in grado di rilasciare fattori di crescita e citochine e utilizzarli per comunicare con altri tipi cellulari. Un ruolo chiave nel rilascio di questi fattori viene svolto da vescicole o microparticelle secrete dalle MSCs. Le microparticelle derivate dalle MSCs hanno un diametro tra 0.1 e 1 μm e la loro composizione non è ancora del tutto chiarita. La loro formazione viene promossa da numerosi processi come l'ipossia o uno stato di *starvation* cellulare indotto dall'assenza di siero in coltura.⁴⁹ Le MP-MSCs sono di origine endosomale e la loro membrana è costituita da un doppio strato fosfolipidico che consente di proteggere il loro contenuto dalla degradazione enzimatica. Al loro interno vi sono diverse proteine (segnali di trasduzione, recettori, proteine del citoscheletro), lipidi e acidi nucleici (mRNA, microRNA e DNA). Recenti studi propongono le microparticelle come meccanismo aggiuntivo di comunicazione cellula-cellula poiché le vescicole hanno la capacità di trasferire il loro contenuto alle cellule con cui entrano in contatto. E' quindi possibile che le MSCs trasferiscano le citochine, i fattori di crescita, le proteine o gli acidi nucleici proprio attraverso queste MPs. Proprio a questo proposito le MPs sono state proposte come nuovo potenziale *tool* terapeutico. E' stato riportato che l'isolamento e la conservazione delle vescicole di derivazione mesenchimale, a basse temperature può essere protratta per mesi senza che vengano alterate le capacità migratorie e di trasferimento del materiale di interesse. Inoltre, *in vitro*, le MPs sono in grado di arrestare il ciclo cellulare, indurre necrosi e apoptosi in molteplici linee cellulari tumorali⁵⁰. Quindi, una volta isolate, queste vescicole possono essere utilizzate per il trattamento mirato *in vivo* di carcinomi di vario genere. E' tuttavia noto un ulteriore effetto delle MP-MSCs: sono infatti, in grado di sostenere la crescita del carcinoma gastrico attraverso un effetto pro-angiogenico, stimolando le cellule tumorali a esprimere VEGF⁵¹.

3. MSC e tumore mammario

Il tumore al seno è il tumore più diffuso nel sesso femminile e rappresenta il 29% di tutti i tumori che colpiscono le donne.

E' oggi ampiamente riconosciuto come l'interazione delle cellule cancerogene con il TME, composto da fibroblasti associati al tumore, cellule endoteliali, adipociti e cellule immunitarie sia il meccanismo più importante per la progressione tumorale. E' stato ampiamente descritto come le MSCs vengano richiamate al sito di sviluppo tumorale divenendo parte del microambiente e promuovendo la sua metastatizzazione^{1,2}.

Numerosi studi hanno focalizzato l'attenzione sulla migrazione delle cellule mesenchimali al carcinoma mammario. Nei tumori mammari è stato descritto come una delle prime proteine

coinvolte nel richiamo delle MSCs sia la Proteina-1 chemoattraente dei monociti (MCP-1), identificata nel terreno di coltura delle MDA-MB-231⁵²⁻⁵³. Inoltre Lin e colleghi utilizzando colonne cromatografiche basate sull'eparina, sono stati in grado di individuare altri fattori responsabili della chemoattrazione nei confronti delle MSCs nelle lesioni tumorali: la ciclofilina B e il fattore di crescita derivato da epatoma (HDGF). Purificando e isolando queste molecole, è stata osservata la migrazione di cellule mesenchimali verso il gradiente creato.

In uno studio del 2013 Ke e colleghi descrivono come *in vivo* le MSCs iniettate nel grasso intramammario insieme alle cellule di tumore mammario 4T1, siano responsabili di un incremento significativo della crescita tumorale. Inoltre *in vitro*, la cocoltura di questi due tipi cellulari, mostra una up-regolazione dell'espressione di molteplici geni coinvolti nella progressione tumorale. Sembra che, a seguito del contatto con le MSCs, le 4T1 acquisiscano caratteristiche di CSC rendendo il tumore più aggressivo⁵⁴. Nonostante numerose evidenze suggeriscano delicate implicazioni tra il richiamo delle MSCs al tumore e le stesse cellule neoplastiche, non è ancora stato definito il meccanismo molecolare attraverso cui avviene tale interazione. Come precedentemente descritto, le MSCs presenti nel TME rilasciano numerose citochine in grado di stimolare le CSCs del tumore mammario e sostenere la sua proliferazione, uno dei fattori maggiormente espressi da queste cellule è il TGF- β . Particolarmente interessante, TGF- β ha un ruolo controverso e duplice nello sviluppo tumorale. Infatti, se nelle prime fasi dello sviluppo tumorale questo fattore di crescita inibisce la proliferazione cellulare, in un secondo momento risulta implicato nell'angiogenesi, nella capacità di stimolare la migrazione cellulare e nella formazione di metastasi. Questi processi hanno luogo a partire dal meccanismo di transizione epitelio mesenchima (EMT) stimolato proprio dal TGF- β : un meccanismo attraverso il quale le cellule epiteliali immobili vengono stimulate a differenziare in cellule dalla morfologia fibroblastoide altamente mobili e costituisce il primo passo del tumore verso la sua metastatizzazione. TGF- β prodotto e secreto dalle cellule, lega il suo recettore e attiva, nella cellula, il pathway di Smad. Infatti, a seguito dell'azione di TGF- β vengono attivati Smad 2/3 che legano Smad4 e permettono la sua traslocazione al nucleo dove può attivare la trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione cellulare. Inoltre, molto importante è la repressione della produzione di E-caderina (che permette l'adesione tra cellule e mantiene la morfologia delle cellule epiteliali). Questi fenomeni concorrono alla stimolazione della EMT rendendo il tumore più prolifico e stimolandone la metastatizzazione^{55,56}.

In uno studio del 2012 Takai e colleghi descrivono come l'aumento delle concentrazioni di TGF- β stimoli, inoltre, l'esocitosi di ATP da cellule di tumore polmonare. L'ATP posizionandosi al proprio sito di legame presente sul recettore P2X7, ne stimola l'attività. L'inibizione del recettore mediante l'utilizzo di un siRNA determina una notevole riduzione della migrazione delle cellule tumorali ingegnerizzate a supporto dell'idea che la motilità cellulare delle cellule tumorali sia fortemente influenzata dall'attività del recettore purinergico⁵⁷. L'attivazione del recettore stimola la cellula a

continuare a produrre ATP instaurando un meccanismo di feedback positivo tra il rilascio di ATP endogeno e stimolazione di P2X7.

I recettori purinergici sono recettori di membrana in grado di legare diversi nucleotidi extracellulari. In particolare, i recettori P2 sono prevalentemente attivati dal legame con l'ATP. I recettori P2 vengono suddivisi in due sottofamiglie: P2X e P2Y⁵⁸. I recettori P2X sono recettori ionotropici costituiti da una porzione transmembrana e una regione extracellulare ricca di residui di cisteina contenente la regione di legame per l'ATP. I recettori P2X sono suddivisi in 7 sottogruppi (P2X1-7) e sono formati da subunità aggregate che originano il canale ionico transmembrana.

Il recettore P2X7 ha due caratteristici stadi di apertura: può formare un canale ionico del diametro di 0.8 nm che permette il passaggio di cationi (Ca^{2+} , K^+ , Na^+) e piccole molecole, oppure può formare un poro di membrana molto più ampio (4nm) che consente il passaggio di molecole di più alto peso molecolare come ad esempio la colina, il propidio o l'etidio bromuro⁵⁹.

Il P2X7 viene espresso da svariate tipologie cellulari (neuroni, cellule della microglia, fibroblasti e cellule endoteliali) ma viene altamente espresso sulla membrana di cellule del sistema immunitario (linfociti, cellule dendritiche, monociti).

Il recettore P2X7 utilizza l'ATP come agonista e una prolungata esposizione a questo nucleotide comporta la formazione del poro di membrana che permette il passaggio di molecole ad elevato peso molecolare.

Questo recettore purinergico sembra essere altamente coinvolto nella proliferazione e apoptosi cellulare a seconda della fase del ciclo cellulare in cui avviene la stimolazione del recettore⁶⁰. Le cellule ingegnerizzate per l'espressione del P2X7 sono in grado di sopravvivere e proliferare anche in assenza di siero caratteristica tipica delle cellule tumorali. Un recente studio di Adinolfi et al⁶¹ mostra come cellule tumorali che overesprimono P2X7 formano, *in vivo*, tumori di maggiori dimensioni rispetto ai tumori controllo. L'utilizzo di un inibitore dei recettori purinergici: il periodato-ossidato ATP (oATP) determina la riduzione della dimensione dei tumori amplificati dalla presenza del P2X7 esogeno. L'oATP modifica covalentemente il sito di legame per l'ATP presente sui recettori, inibendo quindi la loro funzione⁶². È stato dimostrato come il trattamento con oATP riduca la risposta pro-infiammatoria regolata dal P2X7. Un trattamento prolungato con l'oATP determina un'attenuazione dell'85% dell'attività dei recettori purinergici.

1. IN VIVO IMAGING

L'imaging *in vivo* costituisce una disciplina in rapida ascesa nella ricerca biomedica poiché in grado di estendere le osservazioni fatte *in vitro* e a livelli microscopici a evidenze visualizzabili *in vivo* in soggetti viventi, in un ambito macroscopico.

Questa disciplina include sia l'imaging molecolare che cellulare e può essere definita come l'imaging ripetitivo, non invasivo, in organismi viventi, che consente la caratterizzazione e la

quantificazione dei processi biologici e cellulari, sia a livello cellulare che sub-cellulare⁶³. È un campo multidisciplinare, in cui le immagini prodotte possono riflettere vie cellulari e molecolari e i meccanismi *in vivo* generati da una malattia, nel contesto di ambienti reali fisiologicamente attivi.

Il termine "*imaging molecolare*" implica la convergenza di molteplici tecniche di *image-capture*: biologia cellulare di base / biologia molecolare, chimica, medicina, farmacologia, fisica medica, biomatematica, e bioinformatica in un nuovo paradigma di imaging. L'imaging molecolare sta diventando un campo di ricerca consolidato, basato sull'uso di tecniche non invasive già utilizzate per studi clinici come la tomografia ad emissione di positroni (PET), la tomografia ad emissione di singolo fotone (SPECT), la risonanza magnetica (MRI), la tomografia computerizzata (CT), e gli ultrasuoni (US) e l'uso di altre procedure inizialmente impiegate per saggi *in vitro*, compresi metodi quali la risonanza magnetica nucleare (NMR), la bioluminescenza (BL) e la fluorescenza (FL) (Fig.6)⁶⁴. Ogni approccio ha i suoi vantaggi e svantaggi. MRI, CT, e l'ecografia producono principalmente immagini anatomiche di strutture del corpo, mentre la PET e la SPECT possono produrre un'immagine di processi fisiologici.

Alcune di queste tecniche utilizzate in clinica (PET / SPET, MRI, CT, US), sono state ri-adattate per l'utilizzo con modelli animali pre-clinici, aumentando la loro sensibilità e la risoluzione al fine di studiare organismi più piccoli. Anche altri approcci, generalmente utilizzati *in vitro* (BL, FL), sono stati adattati per essere utilizzati con i piccoli animali, tuttavia, limitazioni di tipo fisico ne ostacolano l'utilizzo per studi clinici.

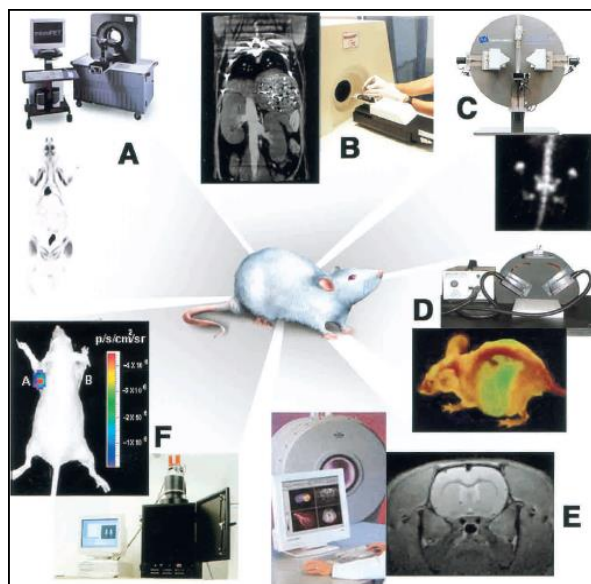


Fig. 6: Tecniche di imaging *in vivo* applicate in studi preclinici, esempi illustrative delle varietà di immagini prodotte dai diversi sistemi (A) microPET, (B) microCT, (C) microSPECT, (D) imaging di Fluorescenza, (E) microMRI, (F) Imaging di Bioluminescenza.

Tutte queste tecnologie si differenziano tra loro per diversi aspetti: risoluzione spaziale e temporale, l'energia e la profondità di penetrazione della radiazione usata per la produzione delle immagini, bisogno / disponibilità di mezzi di contrasto, la soglia di rilevamento. Le tecnologie differiscono anche per il tipo di informazioni, anatomica o funzionale, che forniscono. Quindi, ogni metodo deve essere usato considerando una diversa efficienza, in relazione all'applicazione. Il progresso dell'imaging molecolare e cellulare comporta lo sviluppo di due aree: quella relativa alle tecnologie di rilevazione e l'altra relativa alle strategie in materia di marcatura cellulare (mezzi di contrasto, traccianti e geni reporter o sonde) ⁶⁵[100]. Sono stati descritti diversi approcci di imaging molecolare ma tutti possono essere suddivisi in tre categorie⁶⁶:

1. **Imaging diretto:** è il risultato di sonde molecolari che si localizzano al target, direttamente e con un singolo passaggio. L'entità di questa localizzazione (intensità dell'immagine) riguarda direttamente l'interazione con il bersaglio, e ciascuna sonda molecolare è specifica per un determinato bersaglio.
2. **Imaging indiretto:** si basa sull'espressione di geni reporter. Le cellule o gli animali sono ingegnerizzati per esprimere un gene reporter che codifica per una proteina reporter, la cui espressione è facilmente rilevabile e quantificabile attraverso le tecniche di imaging, immunoistochimica e saggi enzimatici. L'espressione del reporter è indotta a seguito del verificarsi di un evento specifico molecolare in oggetto di studio. Una volta che la proteina reporter è espressa, una sonda molecolare (un substrato o un ligando) specifico per questa proteina (un enzima o recettore) viene utilizzato per l'immagine. I geni reporter possono codificare sia per proteine intracellulari (cioè luciferasi) che per proteine associate alla membrana (cioè D2R, che è un recettore della dopamina) o per altre proteine (enzimi, recettori di membrana o trasportatori di membrana).
3. **L'imaging funzionale o del microambiente tissutale:** è anche chiamato 'fisiologico', 'metabolico' o imaging 'surrogato'. Le strategie di imaging funzionale riflettono effetti a valle dell'espressione di uno o più geni endogeni e/o l'attivazione/inibizione delle vie molecolari coinvolte nel metabolismo, al fine di descrivere le condizioni fisiologiche o dei tessuti patologici.

La maggior parte delle applicazioni di imaging molecolare più note, utilizzano il principio di imaging diretto, soprattutto grazie alla nota tecnologia associata allo sviluppo delle sonde e grazie alla possibilità di utilizzare tali sonde in medicina nucleare clinica. Tuttavia, lo sviluppo di nuovi traccianti specifici per nuovi obiettivi è un processo lungo e costoso che coinvolge chimici, fisici e

biologi. Proprio per questi motivi è stato proposto l'uso di sistemi che sfruttano i geni reporter. Nuovi approcci sono stati proposti relativamente all'imaging cellulare in cui vengono utilizzate e marcate specifiche popolazioni cellulari poi iniettate in sistemi animali modello, al fine di studiarne la distribuzione, la localizzazione, la sopravvivenza, la proliferazione e la loro funzione nell'organismo. Le cellule possono essere marcate con due procedure diverse (Fig.7).

- Una procedura **diretta** che consiste nella marcatura delle cellule *in vitro* con una sonda in grado di legare la membrana cellulare o di inserirsi in strutture intracellulari prima che vengano iniettate nei sistemi *in vivo*. In particolare, la popolazione campione deve essere raccolta (1), marcata *ex vivo* con una molecola radiomarcata, particelle paramagnetiche o una sonda fluorescente (2) e re-iniettata *in vivo* (3). Dopo la re-infusione della popolazione cellulare marcata le strategie di imaging ne consentono la visualizzazione della distribuzione e del comportamento all'interno del soggetto che ha beneficiato della reiniezione (4).
- La procedura indiretta consiste nella modificazione genetica della popolazione di cellule in studio mediante l'inserimento di geni reporter, la cui espressione consente di monitorare le cellule attraverso l'uso di specifiche sonde reporter. In questo caso le cellule sono raccolte (1) e ingegnerizzate *ex vivo* (2) con un gene reporter esogeno codificante per una proteina reporter. Solo dopo re-infusione della popolazione cellulare ingegnerizzata (3) e la somministrazione del substrato del reporter (4), la distribuzione, il comportamento delle cellule può essere visualizzate nel soggetto ricevente mediante tecniche di imaging (5). La trascrizione e la traduzione del gene reporter portano alla produzione di un prodotto, che può legarsi o intrappolare una sonda reporter all'interno della cellula.

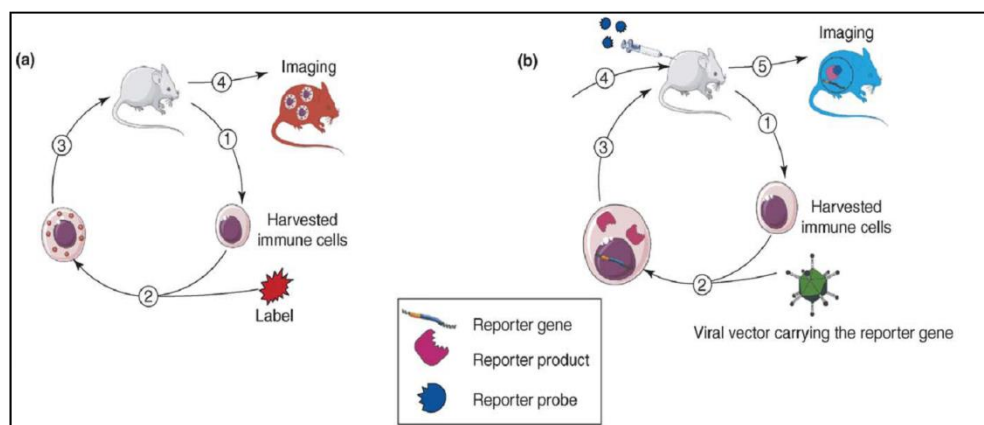


Fig.7: Rappresentazione schematica delle strategie di imaging diretto e indiretto: a) marcatura diretta, b) marcatura indiretta.

Protocolli di marcatura diretta e indiretta mostrano vantaggi e svantaggi e possono essere utilizzati preferenzialmente per diversi tipi di cellule. I vantaggi della marcatura diretta consistono nella semplicità dei protocolli di marcatura rispetto alla difficoltà dei protocolli che servono per ingegnerizzare le cellule e la disponibilità di più sonde già approvate in clinica per la marcatura delle cellule. Tuttavia, questa tecnica non consente il monitoraggio delle cellule marcate per lungo tempo in quanto le replicazioni cellulari determinano la progressiva perdita del segnale nel tempo. Inoltre, questa tecnica non consente il monitoraggio della vitalità cellulare poiché la marcatura non è specifica per caratteristiche funzionali di particolari tipi cellulari e, a seguito della morte della popolazione marcata, la sonda può essere trasferita ad altre popolazioni cellulari generando un *refuso di imaging*.

Il maggior vantaggio della marcatura indiretta consiste nell'avere non solo una popolazione cellulare marcata ma anche la sua progenie. Infatti la marcatura viene ereditata dalla progenie cellulare e l'intensità del segnale non decade nel tempo, in questo modo è possibile seguire il destino delle cellule marcate nel tempo, *in vivo* (Fig.8). Le procedure di marcatura indiretta comprendono la modificazione genetica stabile delle cellule, al fine di monitorare nel tempo sia il destino delle cellule marcate che quello della loro progenie. La somministrazione del substrato consentirà l'emissione di un segnale specifico per la popolazione cellulare vivente poiché l'espressione del gene reporter è proporzionale alla popolazione marcata in grado di esprimere il gene reporter, quindi vivente. Il substrato potrà essere somministrato ripetutamente e, ad ogni somministrazione, il segnale ottenuto sarà proporzionale al tasso di vitalità cellulare. Tuttavia, l'uso di vettori virali per l'espressione dei geni reporter e le metodiche di ingegneria genetica utilizzate per la manipolazione cellulare, costituiscono il limite più importante della marcatura indiretta per il suo utilizzo in clinica.

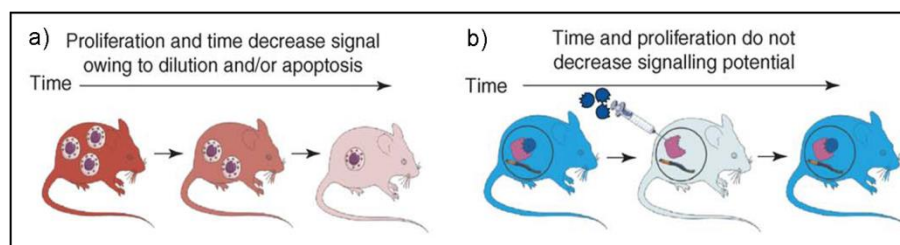


Fig.8: Imaging della proliferazione cellulare che si mantiene di generazione in generazione

L'imaging molecolare in soggetti viventi offre numerosi vantaggi rispetto alle tradizionali metodiche di ricerca di biologia cellulare *in vitro*. Sebbene gli studi *in vitro* nel campo della ricerca biologica di base sono stati, e rimangono, un pilastro per la definizione di percorsi di espressione biochimici e

genetici, questo approccio ha avuto meno successo nel decifrare i contributi delle proteine rispetto all'intero organismo vivente considerando che il contributo di processi fisiologici non riproducibili *in vitro* possono alterare l'effetto inizialmente ottenuto e previsto *in vitro*^{67, 68}.

L'imaging molecolare consente la valutazione sia temporale che spaziale dei processi biologici in un soggetto vivente. Tale visualizzazione delle funzioni biologiche e degli eventi molecolari, nell'intero soggetto vivente, permette di ottenere una visione più realistica delle dinamiche che coinvolgono reti biologiche complesse e sistemi biologici completi rispetto ad analisi olistiche *in vitro*.

Queste tecniche, in particolare negli studi oncologici, consentono la determinazione non invasiva del carico tumorale nel tempo nei singoli animali. Ogni animale sarà quindi seguito individualmente nell'arco di un tempo stabilito, trasformando così il gruppo di modelli animali in un gruppo sperimentale che può essere confrontato direttamente e parallelamente con i gruppi di trattamento. Questo approccio permette di ridurre il numero di animali necessari per ogni esperimento (secondo il principio delle *3R* (*Refine, Reduce, Replace*: migliorare, ridurre, sostituire) e fornisce informazioni sulle varie fasi di sviluppo del tumore. Inoltre consente di aumentare la potenza statistica degli studi longitudinali, e diminuire i costi sperimentali.

6.1 Imaging ottico

Le tecniche di imaging ottico rivelano fotoni a diverse lunghezze d'onda (in intervalli del visibile e dell'infrarosso), derivanti da eventi di BL e FL, utilizzando telecamere ad alta sensibilità (raffreddate) *charge-coupled device* (CCD) che costituiscono la componente critica degli interi sistemi di acquisizione. I progressi nello sviluppo di queste camere hanno notevolmente aumentato la loro sensibilità, e questo ha aumentato la loro utilità in un alto numero di applicazioni. Le CCD camera funzionano convertendo fotoni luminosi, a lunghezze d'onda tra 400 e 1000 nm, che colpiscono la CCD con una energia di solo 2-3 eV, in elettroni. Una CCD camera contiene semiconduttori collegati in modo che l'uscita di uno funge da ingresso del successivo. In questo modo, un modello di carica elettrica, corrispondente all'intensità di fotoni, viene letto dalla CCD in un registro di uscita ed eventualmente amplificata mediante la digitalizzazione. L'energia termica accumulata nella CCD risulta in un costante rilascio di elettroni (definito "corrente di buio") che provocano la formazione del rumore di fondo. Questo è drasticamente ridotto grazie al raffreddamento della camera, infatti la "corrente di buio" diminuisce di 10 volte ogni volta che la temperatura della camera si abbassa di 20°C. Quando la temperatura assoluta viene raffreddata fino a raggiungere -90°C la sensibilità della camera è massima, il rumore di fondo viene ridotto al minimo e la sensibilità del segnale bioluminescenza è massimo (Fig 9). In acquisizioni 2D, l'immagine luminescente derivata è un'immagine a colori sovrapposta a quella fotografica in scala di grigi del piccolo animale, la sovrapposizione delle due immagini viene realizzata grazie all'utilizzo del software di analisi di immagine⁶⁹.

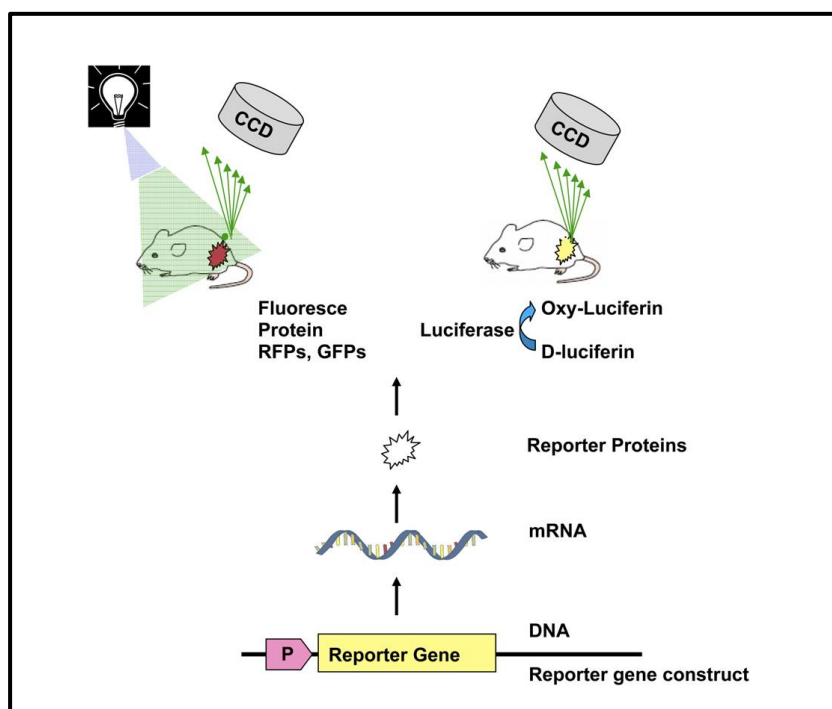


Fig. 9: Imaging ottico, analisi di fluorescenza (FL) e bioluminescenza (BL)

I sistemi di imaging ottico come la fluorescenza (FLI) o l'imaging di bioluminescenza (BLI) risultano essere più economici, convenienti e più semplici da utilizzare rispetto ad altre modalità di imaging. Un altro vantaggio, soprattutto per la BLI, riguarda la sua elevata sensibilità, infatti questa metodologia è in grado di rilevare segnali derivati anche da bassi livelli di espressione genica poiché nessuno sfondo bioluminescente può essere trovato negli organismi di solito acquisiti (topi). Diversi geni reporter e costrutti, che sono stati utilizzati anche *in vitro*, sono disponibili per verificare le stesse ipotesi biologiche in modelli animali viventi.

6.1.1 Imaging BLI

La BLI si basa sull'uso di geni reporter codificanti enzimi capaci di produrre emissione di fotoni in presenza di specifici substrati e cofattori, nella lunghezza d'onda di 485-613 nm. Gli enzimi reporter più utilizzati sono le *luciferasi*. A seguito dell'iniezione di un substrato, in presenza di specifici cofattori (ad esempio Mg^{2+} , ossigeno, ATP, etc.), il substrato viene ossidato con produzione di fotoni. Ad oggi sono disponibili diversi tipi di luciferasi con il loro substrato. La famiglia di enzimi luciferasi, presenti in alcuni batteri, crostacei marini, pesci e insetti, consiste di proteine che generano luce visibile dopo l'ossidazione di un substrato specifico e in presenza di ossigeno e, di solito, adenosina trifosfato (ATP) come fonte di energia. Durante queste reazioni, parte dell'energia chimica viene rilasciato come luce visibile. In particolare, la bioluminescenza

della luciferasi della lucciola è basata sulla conversione del substrato luciferina in *oxyluciferina* attraverso un processo ATP-dipendente in grado di produrre una emissione luminosa (Fig.10).

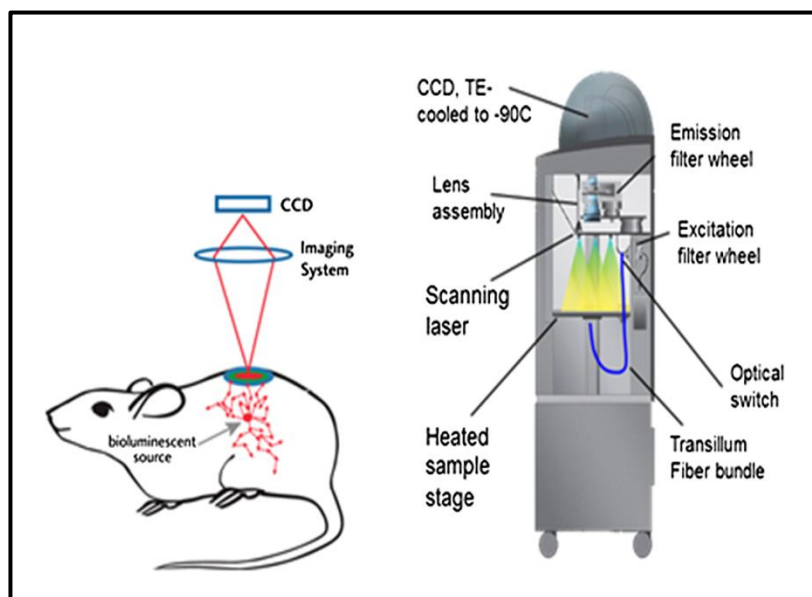


Fig. 10: Processo di BLI imaging e immagine dell'IVIS Spectrum CT in grado di leggere le reazioni di BLI

La luciferasi più utilizzata nell'imaging molecolare è quella di lucciola (*Photinus pyralis*) e il suo substrato, D-luciferina. La *Firefly*-luciferasi catalizza la trasformazione del suo substrato D-luciferina in ossi-luciferina in un processo ossigeno e ATP-dipendente, causando l'emissione di fotoni con lunghezza d'onda che ha il suo picco a 560 nm, e una vasta emissione di fotoni che si estende oltre 600 nm, caratterizzato da una sufficiente penetranza in piccoli tessuti animali. È importante sottolineare che il substrato luciferina non è immunogenico e, una volta iniettato o i.v. o i.p., diffonde in pochi minuti in tutto il corpo animale e viene rapidamente assorbito dalle cellule. Anche altri tipi di luciferasi, provenienti da altri organismi, sono state utilizzate per studi di imaging *in vivo* (*Renilla luciferasi*, *luciferasi Pyrophorus plagiophthalmus* e *Gaussia luciferasi*). Tuttavia, sia le luciferasi di *Renilla* che *Gaussia* emettono luce nel blu, che è altamente attenuata nel tessuto vivo. Inoltre, il loro substrato, la *coelenterazina*, viene trasportato dal trasportatore PGP e interagisce efficacemente con anioni superossido e perossidonitrato nelle reazioni di produzione di luce, complicando quindi le applicazioni delle luciferasi di *Renilla* e *Gaussia* *in vivo* ⁷⁰[105]. La BLI è una metodologia di imaging ampiamente utilizzata in biologia molecolare per l'indagine di pathway molecolari *in vitro* o per lo studio di interazioni proteina-proteina, ma può essere anche ampiamente utilizzato per l'imaging non invasivo e in tempo reale in piccoli animali *in vivo*. È stato dimostrato che la BLI può essere utilizzata per monitorare le cellule ovunque nel corpo (compresi potenziali siti delicati come il cervello) dopo la somministrazione intraperitoneale di una dose saturante di luciferina.

La BLI è una metodologia di semplice esecuzione e risulta spesso molto più sensibile rispetto alle altre tecniche di imaging non invasivo. Inoltre, la reazione di bioluminescenza è ATP-dipendente, e quindi solo le cellule metabolicamente attive possono contribuire alla generazione di bioluminescenza, e come tale, il segnale è derivato solo dalle cellule viventi, questo significa che ad esempio nei tumori solo le cellule tumorali viventi produrranno il segnale di bioluminescenza, mentre le aree necrotiche o le cellule in apoptosi non genereranno alcun segnale. La BLI risulta essere anche più sensibile della FLI poiché non necessita di una sorgente di eccitazione esterna e non induce segnali auto-fluorescenti. Viene eseguita in compartimenti assolutamente bui, che evitano l'interferenza della luce di fondo, questo aumenta la sensibilità e rende la misurazione più affidabile anche per piccole lesioni. Inoltre, contrariamente a quanto accade in fluorescenza, soltanto la luce emessa prodotta in BLI deve viaggiare attraverso gli strati di tessuto, in questo modo si verifica un'attenuazione del segnale dovuto alle componenti dei tessuti ma ad un livello accettabile.

La maggiore limitazione all'uso di reporter bioluminescenti è che i fotoni di bassa energia emessi sono parzialmente assorbiti e dispersi nel volume del tessuto che incontrano nel loro percorso dal sito di emissione al sistema rivelatore. È stato calcolato che circa il 90% del segnale BLI viene attenuato per centimetro della profondità del tessuto. Così, la quantità di fotoni rilevati può non essere proporzionale all'espressione del reporter o può essere insufficiente per visualizzare l'attività enzimatica presente negli organi più interni degli animali di laboratorio più comuni, tra cui topi⁷¹. Tuttavia, la luciferasi di lucciola possiede un ampio spettro di emissione con una importante componente sopra 600 nm, a questa lunghezza d'onda emoglobina e melanina (quenchers di luce primaria nei tessuti degli organismi viventi) assorbono relativamente poca luce, per questa ragione questo reporter viene ampiamente utilizzato nei protocolli di BLI *in vivo*.

Altri aspetti negativi della BLI sono la bassa risoluzione spaziale e la necessità di modificare geneticamente le cellule per l'espressione della luciferasi, questo rende impossibile traslare direttamente i dati ottenuti da studi su piccoli animali in clinica. Per quanto riguarda gli studi oncologici, la sensibilità della BLI dipende da vari fattori, quali i livelli di espressione di luciferasi nelle cellule tumorali, il sito di impianto del tumore, l'ossigenazione e la vitalità dei tumori, e la sensibilità e le impostazioni della camera (soprattutto l'unione di pixel che determina il rapporto segnale-rumore). È stato dimostrato che la sensibilità dipende dalla localizzazione e dalla densità cellulare. Quando i tumori sono massicci e situati più superficialmente, la sensibilità è più alta, quando le cellule tumorali sono diffusamente presenti e più in profondità, la sensibilità diminuisce. Nonostante la semplicità di impiego, i bassi costi e i brevi tempi di acquisizione, la BLI dipende dai tempi di biodistribuzione del substrato, inoltre non fornisce dati completamente quantitativi e in genere gli strumenti producono immagini planari che causano qualche incertezza per quanto riguarda l'esatta posizione del segnale. Ad oggi tuttavia sono stati sviluppati nuovi sistemi di

acquisizione che permettono di generare immagini 3D sovrapponendo il segnale bioluminescente con immagini anatomiche CT.

In sintesi, la BLI è un potente strumento non invasivo per la valutazione longitudinale del carico tumorale nei piccoli animali da laboratorio. La BLI è di facile esecuzione, e permette di raggiungere un'eccellente sensibilità rispetto alle altre modalità di imaging non invasive. Inoltre la BLI consente di effettuare studi longitudinali che forniscono informazioni sul corso di sviluppo del tumore nei sistemi modello, questo può portare ad evidenziare differenze significative tra i gruppi sperimentali anche utilizzando un numero relativamente piccolo di animali per gruppo di studio. Anche se la BLI non fornisce informazioni sulla morfologia e / o modelli di crescita di tumori singoli o interazioni tra cellule tumorali e tessuto ospite, un approccio combinato di BLI e FLI, CT, ultrasuoni o risonanza magnetica, possono superare questa limitazione.

6.1.2 Imaging FLI

L'imaging fluorescente è basato sulla rilevazione di fotoni (lunghezza d'onda: 442-800 nm) prodotti grazie ad una fotostimolazione laser che riporta gli elettroni dallo stato eccitato allo stato fondamentale. Questi fotoni possono essere rivelati da una CCD-camera utilizzando filtri specifici per l'eccitazione e l'emissione che consentono di ridurre il rumore di fondo. In questa tecnica la diffusione del segnale nel tessuto e il suo assorbimento sono doppi rispetto a quanto avviene per le sonde bioluminescenti, la luce, infatti, deve coprire due volte la distanza dal segnale al rivelatore (attraverso le vie di eccitazione ed emissione).

Esempi di molecole fluorescenti sono proteine fluorescenti verdi, proteine fluorescente rosse, rodamina, indiocianina, ecc. Nonostante la fluorescenza sia largamente utilizzata negli studi *in vitro*, non tutte queste molecole sono utilizzabili negli studi *in vivo* a causa delle lunghezze d'onda di emissione di eccitazione che sono spesso al di sotto di 600 nm. Grazie all'introduzione di proteine fluorescenti le cui lunghezze d'onda emettono nel rosso e di sonde fluorescenti iniettabili che emettono luce nelle lunghezze d'onda vicino all'infrarosso, grazie allo sviluppo di dispositivi di rilevazione di fotoni altamente sensibili e all'introduzione della microscopia in vivo (confocale e *multiphoton*), e grazie ai progressi nella generazione algoritmi specifici per il calcolo della propagazione dei fotoni nei tessuti, è stato possibile sviluppare modalità di FLI macro- e microscopiche altamente sensibili, come ad esempio la tomografia FLI o l'imaging intra-vitale *multiphoton*.

Ci sono diversi metodi per etichettare una proteina con un *tag* fluorescente. Nel primo, il gene di interesse può essere fuso o sostituito da un gene che codifica una proteina reporter fluorescente, per esempio, un membro della famiglia della proteina fluorescente rossa (DsRED). Nel secondo, vengono utilizzati dei geni reporter che codificano per proteine quali beta-lattamasi o beta-galattosidasi, in grado di attivare una sonda specifica per una molecola con diversa fluorescenza

(questo consente di convertire un substrato non fluorescente esogeno in un derivato fluorescente , o di spostare la lunghezza d'onda di un substrato fluorescente). La maggior parte delle proteine fluorescenti viene eccitata con lunghezze d'onda nelle regioni blu e verde dello spettro visibile, dove l'assorbimento tissutale di luce è particolarmente elevato e l'auto-fluorescenza, generata da molecole endogene, provoca elevati segnali di fondo.

Nel 2004 un nuovo lavoro descriveva delle nuove proteine reporter fluorescenti sviluppate a partire da proteine già esistenti mutate. Questi nuovi geni erano in grado di emettere fotoni di lunghezza d'onda diverse, ma nello spettro rosso. Queste proteine hanno picchi massimi di emissione fino a 649 nm, ma hanno rese quantiche basse e quindi bassa luminosità che limita la loro applicazione *in vivo*⁷². Nel 2007 una proteina fluorescente con uno spettro spostato più nel rosso e più luminoso è stata descritta da Shcherbo et al⁷³. Questa proteina, chiamata Katushka, è prodotta dall'anemone di mare *Entacmaea quadricolor*. Il suo picco di eccitazione è a 588 nm e il picco di emissione è a 635 nm, entrambi poco assorbiti dai tessuti e dall'emoglobina. Nelle cellule, Katushka non forma aggregati visibili e non ha altri effetti tossici.

Vi sono, inoltre, coloranti fluorescenti in commercio utilizzati per applicazioni FLI, in grado di intercalarsi nelle membrane cellulari, come: PKH26®, VivoTag®, Alexafluor®⁷⁴, o nanoparticelle fluorescenti, come Quantum Dots⁷⁵⁻⁷⁶ che può essere interiorizzato dalle cellule tramite fagocitosi o endocitosi in presenza di specifici trasportatori. Queste molecole offrono alcuni vantaggi: le procedure di marcatura risultano più veloci e vi è una notevole riduzione dei costi senza la necessità di perturbare la genetica cellulare. Restano tuttavia invariati i limiti già descritti di questa strategia. Infatti, nonostante i notevoli progressi ottenuti per questa metodologia, l'alto grado di autofluorescenza generato nella finestra di emissione blu-verde con un conseguente basso rapporto segnale-rumore, l'elevata attenuazione e dispersione dei fotoni attraverso i tessuti e la tossicità dovuta all'uso di coloranti fluorescenti non permettono di considerare questa tecnica tra le più efficienti per lo studio *in vivo*. Tuttavia, l'imaging di proteine fluorescenti (soprattutto reporter monomerici con lunghezze d'onda spostate nel rosso) ha un vantaggio importante rispetto ad altre modalità di imaging che utilizzano geni reporter, ad esempio, non è richiesto alcun substrato, e consente una vera immagine in tempo reale. Inoltre, l'uso di reporter fluorescenti permette la localizzazione subcellulare del bersaglio mediante analisi microscopica correlata.

SCOPO DEL LAVORO

È noto che le Cellule Mesenchimali Staminali (MSCs) sono richiamate in sede neoplastica da cellule tumorali in via di sviluppo. Ad oggi resta controverso il ruolo svolto dalle MSCs all'interno del microambiente tumorale. È stato infatti proposto l'utilizzo di tali cellule sia come carrier di trattamenti anti-neoplastici sia come terapia di supporto nella rigenerazione tissutale post trattamento. Tuttavia, nonostante le notevoli potenzialità di questa popolazione cellulare non è del tutto stato chiarito il ruolo diretto giocato da tali cellule nei riguardi delle cellule tumorali. Molte evidenze suggeriscono che le MSCs abbiano un effetto pro-tumorale. Tale effetto è mediato sicuramente dalla capacità immunomodulatrice delle MSCs che riducono l'attivazione delle cellule T inibendo la maturazione di monociti in cellule in grado di presentare l'antigene. Inoltre la presenza di MSCs induce un aumento della produzione di citochine specifiche della popolazione M2 di monociti pro-tumorali che favoriscono la progressione neoplastica. Oltre a questo ruolo ben noto, è stato riportato che le MSCs, per esempio nei tumori mammari, stimolando le CSCs e giocando un ruolo di supporto trofico per le cellule tumorali ne favoriscono la proliferazione e l'aumento della motilità aumentandone il potenziale metastatico. Tuttavia, resta poco noto il meccanismo molecolare attraverso cui le MSCs comunicano con le cellule neoplastiche.

Scopo del presente lavoro di tesi è confermare e monitorare nel tempo l'influenza diretta delle MSCs su diverse linee cellulari di carcinoma mammario (murine e umane). Per tale ragione la cinetica di crescita delle diverse linee tumorali è stata valutata sia in sistemi semplici (*in vitro*) che hanno coinvolto le due popolazioni in esame (MSCs e cellule tumorali) che nell'ambito di sistemi più complessi (*in vivo*) dove il coinvolgimento di molti altri diversi fattori concorre allo sviluppo della lesione neoplastica. Inoltre, ulteriore scopo di questo progetto è stato quello di proporre e indagare un meccanismo molecolare che sia alla base della comunicazione tra MSCs e cellule tumorali basato su caratteristiche già note delle MSCs e osservazioni ottenute dopo trattamento con uno specifico inibitore.

MATERIALI E METODI

STUDI IN VITRO

1.1. Linee Cellulari e Reagenti

Colture primarie di Cellule Staminali Mesenchimali isolate da tessuto adiposo murino e umano, sono state fornite da Sanipedia s.r.l. Bresso (MI). Sono state mantenute in coltura mediante l'utilizzo di *Dulbecco's Modified Eagle Medium- Low Glucose* (DMEM-LG,) supplementato con il 10% di siero bovino fetale (FBS), penicillina/streptomicina (50IU/mL), 2mM di glutammina (tutto Euroclone).

Per gli studi *in vitro* e *in vivo* sono state utilizzate tre linee di tumore mammario, due di origine murina e una di origine umana. Le linee tumorali di origine murina sono le EMT6 e le MET-1 (ATCC), mantenute in coltura mediante l'utilizzo dei seguenti terreni di coltura: rispettivamente il *Waymounth's* (Lonza) e il *Dulbecco's Modified Eagle Medium* DMEM (Euroclone). Entrambi i terreni sono stati supplementati con il 10% di siero bovino fetale (FBS), penicillina/streptomicina (50IU/mL), 2mM di glutammina (tutto Euroclone). La linea cellulare di origine umana è la SUM-159 (Asterad), mantenuta in coltura mediante Ham's F-12 (Gibco), supplementato con il 5% di siero bovino fetale (Euroclone), HEPES 10 mM (Sigma-Aldrich), Hydrocortisone 1µg/mL (Sigma-Aldrich), Insulina 10 µg/ml (Sigma-Aldrich).

Le cellule vengono fatte crescere a 37° C in atmosfera umidificata al 5% di CO₂.

1.2 Migrazione

Le cellule sono state coltivate in P100. In caso di trattamento farmacologico si aggiunge la concentrazione di farmaco desiderato alle colture.

Al termine del trattamento, le cellule sono state sottoposte a starvation per 2 ore in terreno senza siero e si è proceduto con la valutazione della migrazione verso terreno completo o dotato di chemoattraente (per esempio EGF, o terreno condizionato).

Per la migrazione, il filtro *neuroprobe* è stato preventivamente poli-lisinato: il filtro è stato coperto con 50 mL di soluzione 0,1 mg/mL di Poli-L sciolta in acqua distillata, quindi incubato per 1h a 37°C. Al termine della poli-lisinatura, la soluzione è stata recuperata, filtrata e conservata a 4 °C (può infatti essere riutilizzata per la poli-lisinatura di un secondo filtro), mentre il filtro è stato lavato con acqua distillata, quindi lasciato asciugare. La colorazione delle cellule può esser fatta con Dil D282 alla concentrazione di 2 µM (somministrandolo prima della migrazione, in petri) oppure con Calceina 2 µM da usare al termine della migrazione direttamente sul filtro, immergendolo e lasciando in incubazione per 30' a 37°C.

La camera di chemiotassi è stata preparata come segue:

-nel comparto inferiore una MW96 è stata caricata con 410-470 μ L del terreno con il chemoattraente [i pozzetti devono avere il menisco]

-chiusa la camera di migrazione, nei pozzetti superiori sono state caricate le cellule; il numero di cellule per pozzetto consigliato è 50.000. Volume: 200 μ L per ogni well.

La migrazione viene condotta over night a 37°C.

Al termine della migrazione, il filtro è stato prelevato, e le cellule che non hanno migrato, presenti sulla superficie superiore del filtro, sono state rimosse con uno scraper. Il filtro è stato quindi lavato con PBS 1x e letto al GLOmax con filtro Optical green. Eccitazione del Dil a 525 nm; emissione a 580-640 nm. La calceina può essere letta al Tecan Infinite 500, eccitazione 480nm, emissione 510nm.

1.3 Infezione cellule tumorali

Le linee di tumore mammario murino (EMT6 e MET-1) e umano (SUM159), sono state transfettate con un vettore lentivirale al fine di ottenere cellule che esprimessero il gene reporter *mCherry* o *Luciferasi*. La linea EMT6 è stata transfettata per l'espressione dell'*mCherry*, mentre le linee MET-1 e SUM59, con il vettore per l'espressione della *Luciferasi*.

Il plasmide pCLL.PGK.Luc.WPRE contenente il gene per la luciferasi, e il plasmide pCLL.PGK.mCherry.WPRE contenente il gene per l'*mCherry*, entrambi sotto il controllo del promotore costitutivo PGK, sono stati clonati nel nostro laboratorio. Le particelle lentivirali PLW sono state prodotte attraverso transfezione transiente in cellule 293T usando la precipitazione con calcio fosfato, come descritto⁷⁷. Il terreno di transfezione (IMDM, Euroclone, supplementato con 10% FBS, Cellgrow) è stato sostituito dopo 16 ore. Il medium condizionato, contenente particelle virali è stato conservato dopo 24 e 48h dopo la sostituzione del terreno, filtrato con filtro da 0.2 μ m e congelato a -80°C. Il titolo della preparazione virale (VCN) viene stabilito attraverso infezioni nella linea cellulare Hela con diluizioni seriali del vettore. Attraverso RealTime PCR, sono state amplificate le specifiche regioni WPRE nel genoma di queste cellule, i risultati sono stati confrontati con la curva degli standard di cui sono note le concentrazioni, questo ha permesso di calcolare il VCN.

Le cellule sono, quindi, state infettate con 5 MOI del vettore PMW o PLW, l'infezione è stata mediata dall'agente transfettante polybrene (8 μ g/ml).

Successivamente all'infezione, è stata valutata l'espressione del gene reporter luciferasi attraverso lisi cellulare e analisi biochimica mediante l'uso del luminometro (GloMax Multi detection system, Promega). L'analisi sui lisati cellulari esprimenti *mCherry* è, invece, stata effettuata mediante l'utilizzo del fluorimetro.

1.4 Preparazione del farmaco per gli studi *in vitro*

L'oATP (Sigma Aldrich) è stata completamente risospesa in acqua distillata sterile e usata alla concentrazione di 100 μM , 300 μM e 500nM.

Le cellule sono state piastrate e, dopo l'adesione, sono state trattate con 100 μM di oATP. Dopo 24h è stato effettuato un secondo trattamento con l'inibitore. Le analisi di azione del farmaco sono state valutate dopo 48h dal primo trattamento.

1.5 Co-culture cellulari

Mw24

Le co-culture sono state effettuate in mw24. Il giorno 0, sono state piastrate 20000 cellule tumorali per pozzetto. Dopo l'adesione, negli stessi pozzetti sono state piastrate le linee di interesse per la co-cultura (in questo caso MSCs o U87) in rapporto 1:10 con la linea tumorale. Dopo 48h di co-cultura, sono stati effettuati i test per l'espressione del gene reporter presente solo nelle cellule tumorali.

TRANSWELL

Sono state utilizzate transwell da 24 pozzetti, con membrana trattata con polyethylene terephthalate (PET) e pori del diametro di 3 μm (CORNING).

Queste transwell sono costituite da un compartimento inferiore su cui può essere piastrata una linea cellulare e da un inserto superiore asportabile costituito da una membrana basale caratterizzata dalla presenza di micropori di 3 μm su cui può essere piastrata la seconda linea cellulare. La membrana è costituita da pori sufficientemente ampi per il passaggio di fattori e vescicole rilasciate dalle cellule ma abbastanza piccoli da impedire il passaggio delle cellule. I due compartimenti sono in comunicazione mediante i pori della membrana che consente lo scambio di nutrienti e fattori tra le due popolazioni cellulari mentre inoltre i terreni delle linee restano separati.

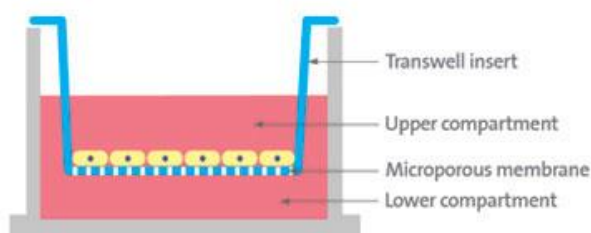


Fig. 11 a) esempio di transwell da 24 pozzetti; b) disegno schematico che illustra la struttura di un pozzetto della transwell.

Le linee tumorali sono state piastrate nel compartimento inferiore delle transwell da 24 (20000 cells per pozzetto). I supporti superiori sono stati adagiati al di sopra dei compartimenti inferiori e sono state, quindi, piastrate le MSCs in rapporto 1:10 con le cellule tumorali (2000 cells/supporto). Dopo 16 ore di incubazione le co-colture sono state trattate con oATP 100 μ M e, dopo 24h, il trattamento è stato ripetuto. Le analisi sono state effettuate a 48h dal primo trattamento: è stato asportato il supporto con le MSCs e sono stati effettuati i test sulle cellule tumorali in adesione.

1.6 Conta cellulare

La vitalità cellulare è stata valutata attraverso la conta delle cellule vitali con Trypan Blue.

Le cellule sono state piastrate in mw24 in triplicato e sottoposte a trattamento per 48h. Sono state, quindi, tripsinizzate, centrifugate e risospese in volume noto di terreno di coltura. Viene prelevato un volume noto di risospensione cellulare e diluito con uguale volume di trypan blue. Un'aliquota è stata inserita nella camera di conta e, per ciascun campione, sono state contate le cellule vitali presenti in cinque campi di conta. Dei valori ottenuti, è stata calcolata la media, moltiplicata per il fattore di diluizione e per il fattore di conversione in mL. Si ottiene, quindi, il numero di cellule vive presenti per mL di risospensione. E' stata, quindi, calcolata la media dei valori ottenuti per i triplicati.

1.7 Valutazione dell'espressione dei geni reporter

Al termine del trattamento, sono stati rimossi il supporto superiore delle transwell (contenente le MSCs) e il terreno di coltura. Dopo un lavaggio con PBS, le cellule sono state lisate usando un Buffer di lisi 1X (Promega). Successivamente alla lisi, le cellule sono state analizzate al luminometro (Glomax Multi detection system, Promega). I dati di espressione della luciferasi vengono, quindi espressi, come conte (numero di fotoni emessi).

Allo stesso modo le cellule esprimenti il gene mCherry come reporter, dopo cocoltura e trattamento, sono state lisate. In questo caso i lisati sono stati raccolti e distribuiti su pozzetti di una piastra nera, al fine di eliminare rumori di fondo nell'analisi della fluorescenza dei campioni. Dopo aver selezionato i filtri di emissione ed eccitazione (λ 590-640) la piastra viene analizzata al fluorimetro e i dati sono espressi come conte.

1.8 Saggio di vitalità cellulare in fluorescenza

Per valutare la vitalità cellulare a seguito di trattamento, è stato utilizzato il CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay (Promega). Questo è un saggio non litico che richiede l'aggiunta di un singolo reagente e che misura il numero relativo di cellule vive in coltura dopo un eventuale trattamento.

Questo test è in grado di misurare l'attività di una proteasi costitutiva e altamente conservata nelle cellule viventi. L'attività di questa proteasi è strettamente dipendente dalla vitalità cellulare ed è misurata attraverso un substrato peptidico fluorescente che permea la membrana cellulare (glycylphenylalanyl-aminofluorocoumarin; GF-AFC). Il substrato entra nelle cellule vive, in cui la membrana cellulare è intatta e viene clivato dall'attività della proteasi che genera un segnale fluorescente proporzionale al numero di cellule vitali presenti in coltura (fig 12). La proteasi diviene inattiva quando la cellula perde integrità di membrana e quindi non è più vitale.

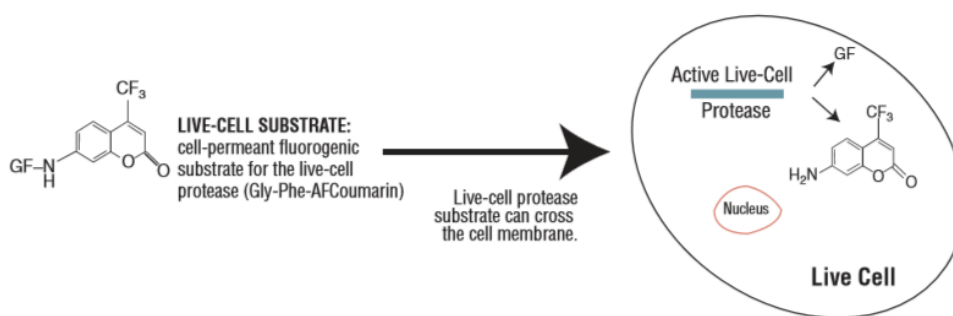


Fig. 12 Illustrazione schematica del substrato fluorescente della proteasi utilizzato per il CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay.

I reagenti del kit vengono scaldati a 37°C. La provetta contenente il substrato GF-AFC viene vortexata per garantire l'omogeneità del substrato utilizzato. Mischiando i reagenti si crea una mix all'interno della quale il substrato sarà ben disciolto.

Per ogni linea cellulare che si considera è necessario effettuare un test di sensibilità del kit. E' necessario piastrare le cellule in diluizioni seriali da 10000 fino a 0 cellule per pozzetto. Si effettua quindi il test per le diluizioni seriali in modo da determinare una curva di standard per linea cellulare entro cui inserire i campioni in analisi.

Alle cellule piastrate in mw96 nere, trattate e rimosse dall'incubatore sono stati aggiunti 100 µl di reagente del Cell Titer-Fluor. Dopo un'incubazione a 37°C di 30 minuti, le piastre sono state lette al luminometro dopo aver selezionato i filtri di emissione ed eccitazione ottimali per la lettura di

fluorescenza emessa dal substrato (Eccitazione 380-400nm/ Emissione 505 nm). I dati ottenuti sono espressi in fotoni di emissione o conte.

1.9 Saggio di attività delle Caspasi3/7

Il Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) è un saggio luminescente che misura l'attività delle caspasi 3 e 7. Queste particolari caspasi giocano un ruolo chiave nell'apoptosi delle cellule di mammifero. Il saggio utilizza, come substrato delle caspasi, una molecola luminescente, contenente la sequenza DEVD. Viene fornito un reagente contenente tale substrato, ottimizzato per l'attività delle caspasi, per l'attività della luciferasi e che effettua la lisi cellulare. Il reagente aggiunto alla coltura, determina la lisi delle cellule e il clivaggio del substrato dalle caspasi, si genera, quindi, un segnale luminescente prodotto dalla luciferasi (Fig 13).

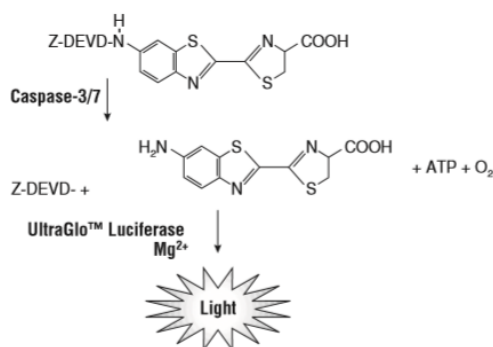


Fig. 13 illustrazione schematica della bioluminescenza indotta dal clivaggio del substrato delle caspasi 3/7 nel Caspase Glo 3/7 test (Promega).

Il segnale ottenuto sarà proporzionale alla quantità di caspasi attive nelle cellule.

Prima di utilizzare il kit si lasciano riequilibrare i reagenti e le cellule in coltura a temperatura ambiente. Sono stati aggiunti 100 µl di Caspase Glo Reagent per ogni pozzetto di una mw96. La piastra è stata agitata gentilmente per 30 secondi a 300-500 rpm e dopo un'ora di incubazione è stata misurata la luminescenza di ogni campione tramite luminometro (Glomax Multi detection system, Promega). I dati sono stati espressi come fotoni emessi (conte).

1.10 Real Time PCR

L'RNA totale è stato isolato dalle linee cellulari tramite uso di TRIzol (Life Technologies, MB) secondo le indicazioni. Due microgrammi dell'RNA totale estratto, sono stati retrotrascritti usando

l'High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Life Technologies), al fine di ottenere il cDNA totale della linea cellulare per le analisi del profilo di espressione genica.

La RT-PCR per le analisi di espressione genica è stata effettuata con l'utilizzo del Syber-Select Master Mix (Applied Biosystem, Life Technologies). La reazione è stata eseguita con l'Eco real time PCR (Illumina, Euroclone). Le sequenze dei primers sono state disegnate e sintetizzate dalla Eurofins Scientific. Per assicurare accuratezza, gli esperimenti sono stati ripetuti in triplicato per tre volte. L'espressione relativa dei geni in analisi è stata calcolata con il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Primers	Forward	Reverse
Human VEGF	CGAGGGCCTGGAGTGTGT	CGCATAATCTGCATGGTGATG
Mouse VEGF	AAGAAAGTGGTGCCATGGAT	CCATGAGTTCCATGCTCAGA
Human P2X7	CTGCTCTCTTGAACAGTGCCGAAA	AGTGATGGAACCAACGGTCTAGGT
Mouse P2X7	AGTTCAGGGAGGAATCATGG	CATCCGTGTTCTTGTCATCC

Tab.2 Sequenze dei primers utilizzate per le Real Time PCR

STUDI IN VIVO

2.1 L'Imaging *in vivo*

2.1.1 La strumentazione dell'imaging

La strumentazione di *imaging* utilizzata nel nostro laboratorio è il sistema IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer); questo strumento è in grado di rilevare fotoni emessi da un campione in esame (con lunghezza d'onda compresa tra i 400 e i 850 nm) in un ampio intervallo di intensità. La macchina è costituita da diversi componenti:

- il sistema di acquisizione che include la camera di alloggiamento, il sensore CCD (*Charge Coupled Device camera*), il meccanismo per il suo movimento, le lenti, i filtri di emissione ed eccitazione e la componente elettronica;
- un computer connesso alla componente elettronica della macchina attraverso interfaccia ISA;
- il software Living Image che gestisce la procedura di acquisizione, di costruzione e valutazione delle immagini.

Componenti strumentali

Il sistema d'acquisizione è costituito da diverse parti: una camera di alloggiamento, il sensore CCD, il tubo radiogeno per la generazione dei raggi X e il sistema di raffreddamento (Fig. 14).



Fig. 14 – Sistema di imaging IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer). Lo strumento è costituito da una camera oscura al cui interno è posto il sensore CCD e il sistema dei filtri in grado di rilevare l'emissione di fotoni dall'oggetto in esame.

All'interno della camera di alloggiamento è posto il sensore CCD, montato su di un meccanismo di scorrimento che permette di impostare la distanza tra il campione e il sistema di rilevazione. Frontalmente la camera presenta una porta di apertura, attraverso la quale è possibile posizionare il campione; la chiusura della porta è ottenuta con un sistema di guarnizioni con chiusura a pressione, in modo da proteggere la camera dalla luce esterna e in modo da permettere di effettuare le acquisizioni in situazione di completa oscurità, requisito fondamentale. La porta è inoltre collegata ad un sensore elettronico che tramite il *software* ne indica la corretta chiusura. All'interno della camera di alloggiamento sono presenti due luci che ne permettono l'illuminazione interna; la loro accensione è dipendente dal *software*, e nello specifico esse vengono accese quando si effettuano le foto digitali in luce diretta del campione in esame o le acquisizioni in fluorescenza.

Il sistema IVIS Spectrum CT monta una Back-thinned, back-illuminated Grade 1 CCD, di dimensioni pari a 2.7 x 2.7 cm, contenuta in una struttura sotto vuoto chiusa ermeticamente e raffreddata ad una temperatura di $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$ mediante l'azione di 8 elementi di Peltier e di un chiller di raffreddamento. Questo sensore ha la capacità di acquisire immagini con una risoluzione di 2048 x 2048 pixel, con dimensione del pixel pari a 13.5 micron e una risoluzione minima del pixel pari a 20

micron. L'efficienza quantica è maggiore dell'85% per lunghezze d'onda comprese tra 500 e 700 nm. La digitalizzazione è a 16-bit, consentendo un'ampia gamma di campionamento del segnale. Le lenti montate sulla camera hanno una magnificazione pari a 1.5x, 2.5x, 5x e 8.7x a seconda dell'apertura utilizzata. Il software include un sistema di calibrazione automatico delle lenti, per la messa a fuoco del campione alle diverse altezze del sensore. Lo strumento è dotato di 10 filtri di eccitazione (banda di 30 nm) e 18 filtri di emissione (banda di 20 nm), ed è possibile illuminare il campione sia in maniera epi (la luce proviene dall'alto, dallo stesso lato della CCD) che trans (in cui il soggetto è posto tra la luce di eccitazione e la camera). La dimensione massima del campione da visualizzare è di 23 cm x 23 cm, consentendo così l'acquisizione contemporanea di fino a 5 animali per acquisizione.

2.1.2 Acquisizione delle immagini

L'acquisizione e l'analisi delle immagini sono state effettuate mediante il software Living Image 3.2 (Perkin Elmer Life Sciences); una volta avviato il programma occorre prima di tutto inizializzare lo strumento, ovvero portare ad una temperatura di -90°C la CCD camera per limitare la presenza di rumore di fondo nelle immagini. Quando la barra della temperatura diventa verde sarà possibile procedere con le acquisizioni (Fig. 15)

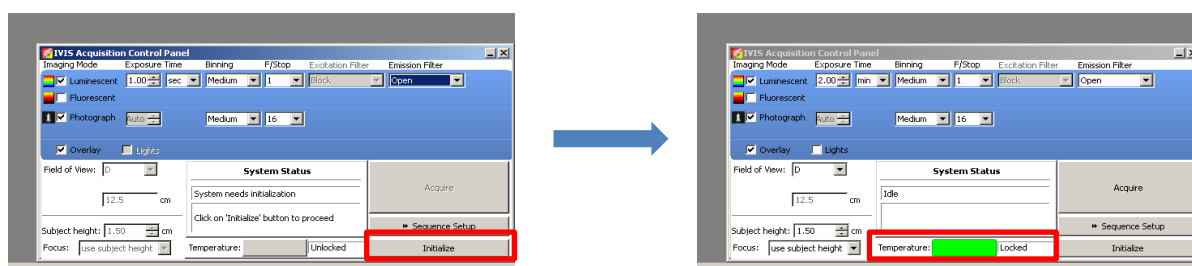


Fig 15. Inizializzazione dello strumento

La procedura qui descritta prende in esempio l'acquisizione del segnale emesso da un animale (in questo caso specifico di un tumore esprimente la luciferasi impiantato in maniera ortotopica nello striato), ma lo stesso protocollo viene applicato anche all'analisi delle cellule in piastre per colture cellulari.

A questo punto può essere impostata l'acquisizione scegliendo:

- il tipo di acquisizione che si vuole fare: bioluminescenza o fluorescenza; con questo strumento è possibile anche effettuare delle acquisizioni in 3D, sovrapponendo il segnale

ad un'immagine 3D realizzata con una tomografia computerizzata che sfrutta raggi X a bassa intensità;

- il tempo di esposizione: auto per un'analisi automatica, in cui il sistema ottimizza i parametri in modo da avere un'acquisizione il più sensibile possibile, o manuale, in cui l'operatore sceglie il tempo di esposizione. Ovviamente, aumentando il tempo di esposizione ho aumento della sensibilità.

L'opzione automatica è da preferire, in quanto il sistema setta i parametri sulla base di un raster scan che gli consente di avere un'idea della quantità di luce emessa dalla sorgente, così da scegliere il setting migliore per evitare la saturazione del segnale.

- l'apertura della lente (F/stop): il range va da f/1 a f/8. Il parametro f/1 rappresenta la massima apertura della lente, consentendo così la massima captazione di fotoni, ma ho diminuzione della risoluzione spaziale. Viceversa, f/8 rappresenta il minimo diametro di apertura della lente, con minima collezione di luce ma aumento di risoluzione spaziale;
- il binning, cioè il raggruppamento dei pixel dell'immagine: la scelta è tra small, medium o large. Con Large, che raggruppa 16 pixel vicini, ho aumento della sensibilità ma perdita di risoluzione spaziale, mentre con Small (raggruppamento di 4 pixel vicini) ho aumento della risoluzione spaziale ma perdita in sensibilità.

Il pannello di controllo mostrato in figura 16 mostra la definizione dei parametri di un'acquisizione in bioluminescenza.

Per le acquisizioni in Fluorescenza, due ulteriori parametri devono essere selezionati:

- filtro di eccitazione
- filtro di emissione

Infatti, diversamente dall'acquisizione in Bioluminescenza, in cui la camera registra tutti i fotoni di qualsiasi lunghezza d'onda (camera open), per quanto riguarda le acquisizioni in Fluorescenza si rende necessario settare anche i filtri di eccitazione e di emissione adatti, in modo da rilevare la fluorescenza emessa da uno specifico fluoroforo.

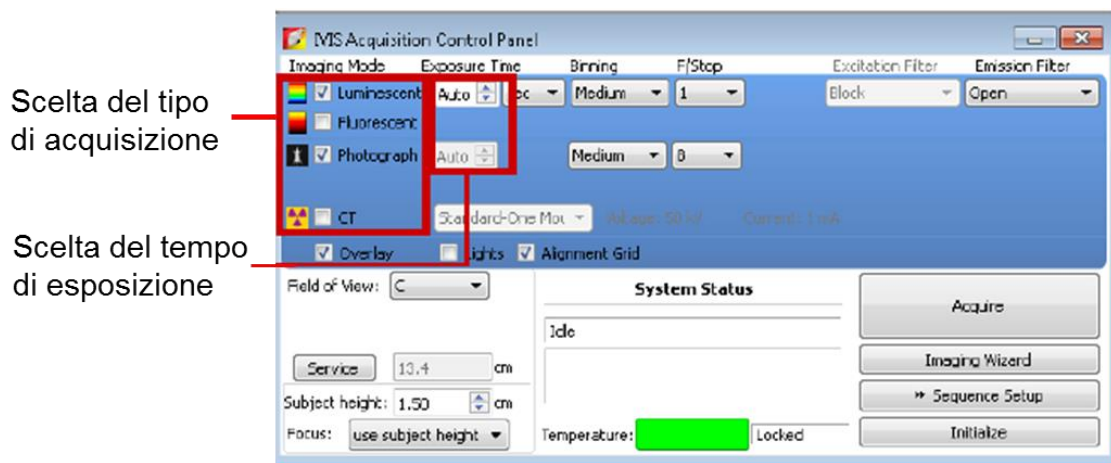


Fig 16: Impostazione dei criteri di scelta dell'acquisizione delle immagini

Un altro parametro è la scelta del campo di vista: nello strumento è possibile acquisire 4 campi di vista, delle dimensioni riportate in Tabella 3.

Field Of View	DIMENSIONI (cm)	N° ANIMALI
A	4 x 4	Piccola parte
B	6.5 x 6.5	1 topo
C	13 x 13	3 topi
D	19.5 x 19.5	5 topi

Tabella 3. Dimesione dei campi di vista (FOV)

Tutti questi parametri sono importanti perché da essi dipende la buona riuscita delle acquisizioni, e soprattutto bisogna tenerne conto per la successiva elaborazione delle immagini e della quantificazione.

Una volta impostati i vari parametri, si può procedere all'acquisizione del segnale (Fig. 17), con le procedure descritte nel paragrafo successivo.

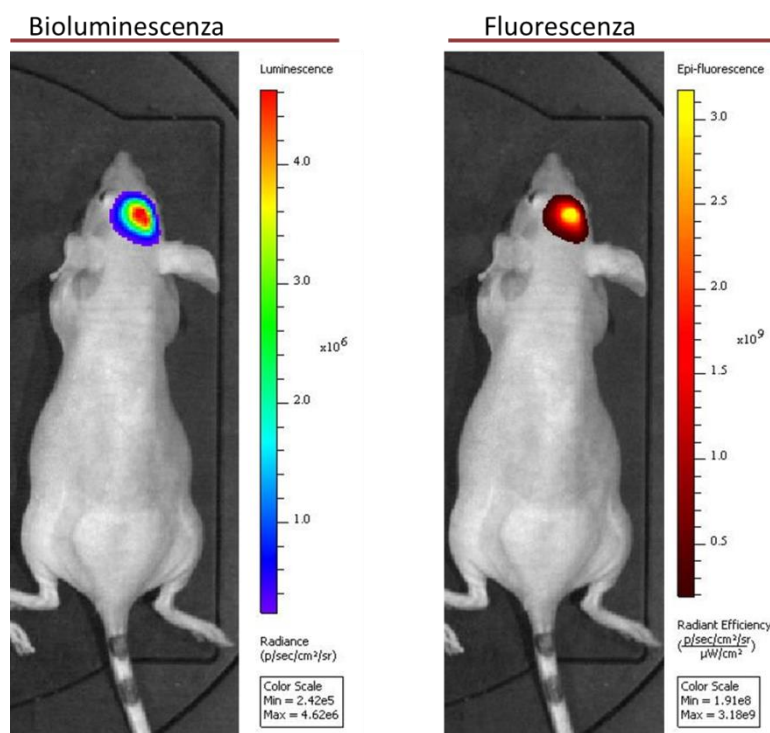


Fig. 17: esempi di acquisizione in bioluminescenza o fluorescenza

PROTOCOLLI DI ACQUISIZIONE

Per eseguire un'analisi quantitativa è necessario utilizzare un protocollo standardizzato d'acquisizione. Prima di tutto, è necessario accendere lo strumento d'acquisizione IVIS Spectrum CT, circa 10 minuti prima di compiere qualsiasi operazione e inizializzare lo strumento. Successivamente si dovrà procedere con il protocollo relativo al segnale da acquisire

Bioluminescenza

- Anestetizzare l'animale con la soluzione di anestetico (Cloralio Idrato, 4% v/v) ed attendere che il farmaco faccia effetto;
- una volta accertato che l'animale si è addormentato, procedere con la somministrazione della luciferina (50 mg/kg) per via intraperitoneale, e attendere 15 minuti per la biodistribuzione;
- sistemare l'animale all'interno del sistema d'acquisizione, centralmente rispetto al sensore CCD e chiudere lo sportello;
- procedere effettuando l'acquisizione del segnale di bioluminescenza;
- alla fine del processo d'acquisizione, aprire lo sportello dello strumento, estrarre l'animale e riporlo nella sua cassetta;
- dopo un'ora dall'intera operazione, verificare le condizioni generali dell'animale, per assicurarsi che non vi siano state complicazioni;

Fluorescenza

- anestetizzare l'animale con la soluzione di anestetico (Cloralio Idrato, 4% v/v) ed attendere che il farmaco faccia effetto;
- una volta accertato che l'animale si è addormentato, sistemare l'animale all'interno del sistema d'acquisizione, centralmente rispetto al sensore CCD e chiudere lo sportello;
- procedere effettuando l'acquisizione del segnale di fluorescenza, selezionando i filtri di eccitazione ed emissione. Per l'acquisizione del gene reporter mCherry, i filtri utilizzati sono: eccitazione=590-620 nm ed emissione=640-660 nm.
- alla fine del processo d'acquisizione, aprire lo sportello dello strumento, estrarre l'animale e riporlo nella sua cassetta;
- dopo un'ora dall'intera operazione, verificare le condizioni generali dell'animale, per assicurarsi che non vi siano state complicazioni;

2.1.3 Analisi e quantificazione dei segnali

Al termine delle acquisizioni, il segnale rilevato sarà sovrapposto ad un'immagine in scala di grigi del soggetto in esame (sia esso un animale o una piastra per colture cellulari), e sarà associato ad una scala colori specifica per quell'animale. Sarà quindi possibile modificare, attraverso il pannello strumenti, alcuni parametri al fine di ottenere una miglior rappresentazione grafica del segnale (Fig. 18): ad esempio sarà possibile modificare il minimo e il massimo della scala colore, oppure applicare dei filtri per ridurre al minimo la radiazione cosmica).

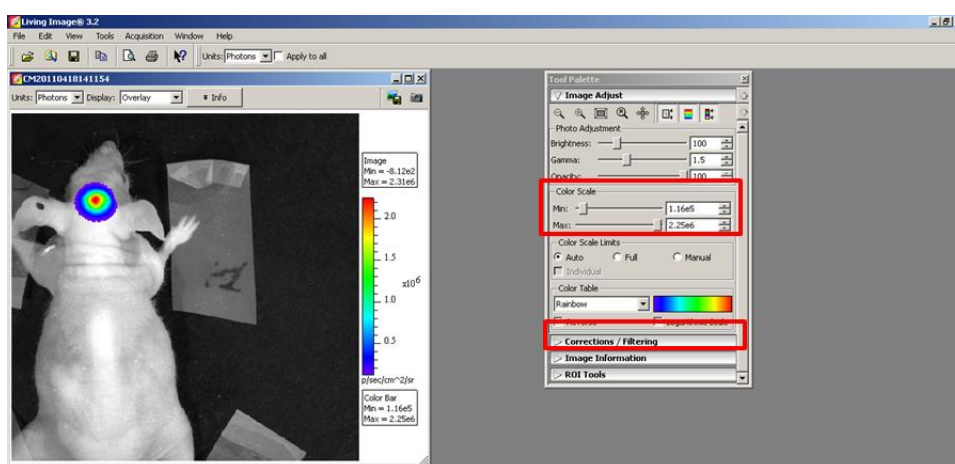


Fig.18: Modifica dei parametri dell'immagine

Un altro parametro da tenere in considerazione è l'unità di misura delle immagini. La scelta è possibile tra:

- conte: misura non calibrata dei fotoni incidenti la camera. L'unità di misura delle conte è rappresentata dal numero di fotoni. Questo tipo di unità raramente viene utilizzata, se non nei casi di segnali in cui si è certi non vi sia saturazione del segnale e che esso sia sufficientemente elevato da superare il rumore di fondo.
- radianza: misura calibrata dei fotoni emessi dal soggetto. L'unità di misura è rappresentata da: numero di fotoni/per secondo/per $\text{cm}^2/\text{steradian}$. Questa unità tiene conto di tutti i parametri dell'acquisizione e quindi può essere usata per comparare anche acquisizioni effettuate con altri settaggi; viene utilizzata per le acquisizioni in Luminescenza.
- Efficienza di radianza: misura calibrata dei fotoni emessi dal soggetto. L'unità di misura è rappresentata da: $[\text{numero di fotoni/per secondo/per cm}^2/\text{steradian}]/[\mu\text{W/cm}^2]$, e oltre a considerare tutti i parametri dell'acquisizione, tiene conto anche delle disomogeneità della luce di eccitazione nei vari punti del campo di vista. Viene utilizzata per le acquisizioni in Fluorescenza.

La possibilità di utilizzare segnali normalizzati è molto importante per poter confrontare le immagini di studi longitudinali o di esperimenti diversi, che magari avevano diversi settaggi.

Un esempio può essere rappresentato dal campo di vista (Tabella 2): il campo di vista A ha una sensibilità maggiore del campo di vista D, perché è più vicino alla camera, ma tuttavia non consente di acquisire l'intero corpo dell'animale o l'intera piastra. Di conseguenza, se devo confrontare animali o piastre da esperimenti diversi, posso normalizzare le acquisizioni usando una costante steradian. La luce emessa dalla superficie dell'oggetto in esame ha la forma di un cono tridimensionale, caratterizzato da un angolo solido: lo steradian è un'unità di quell'angolo. In generale, viene considerato tale angolo come una sfera, caratterizzata da 4π steradians, ma tuttavia la lente della CCD raccoglie la luce solo da una piccola frazione del totale di 4π steradians, ed è questa variabile che viene utilizzata per normalizzare il segnale. Tale parametro è diverso per ogni piano (campo di vista) utilizzato per l'acquisizione, perché il cono diluce emesso varia a seconda della distanza dalla camera, come si evince in Figura 19, e quindi la quantificazione del segnale deve tenere conto di questa variabile per poter confrontare segnali di acquisizioni diverse. Per lo stesso motivo è importante considerare il tempo di esposizione e il binning, perché influenzano la quantificazione della quantità di luce emessa dal campione.

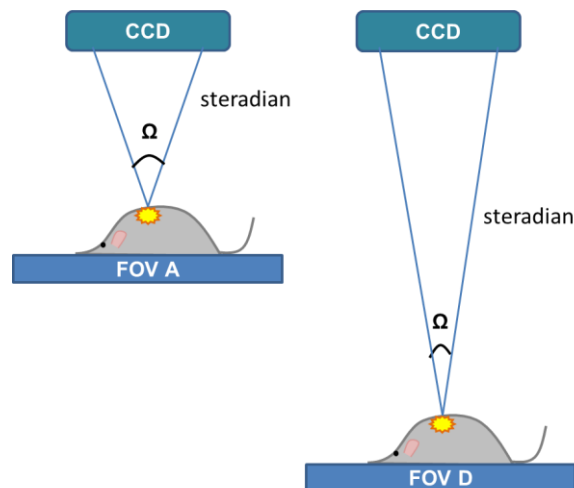


Fig. 19. Immagine schematica del parametro di steradian

Una volta effettuata la scelta dell'unità di misura, sarà possibile procedere alla quantificazione del segnale, applicando una ROI sull'immagine. La ROI è la Regione Di Interesse, cioè una regione dell'immagine digitale che circoscrive una determinata regione anatomica, ad esempio quella dove è presente il segnale di bioluminescenza. E' possibile scegliere tra differenti tipi di ROI: per la quantificazione del segnale si utilizza una ROI di misurazione, ma è possibile utilizzare anche una ROI di background, che automaticamente si andrà a sottrarre a quella di misurazione (Fig. 20). Mediante il tasto "ROI Measurements" sarà possibile visualizzare una tabella contenente i valori della quantificazione, come mostrato in Figura 21.

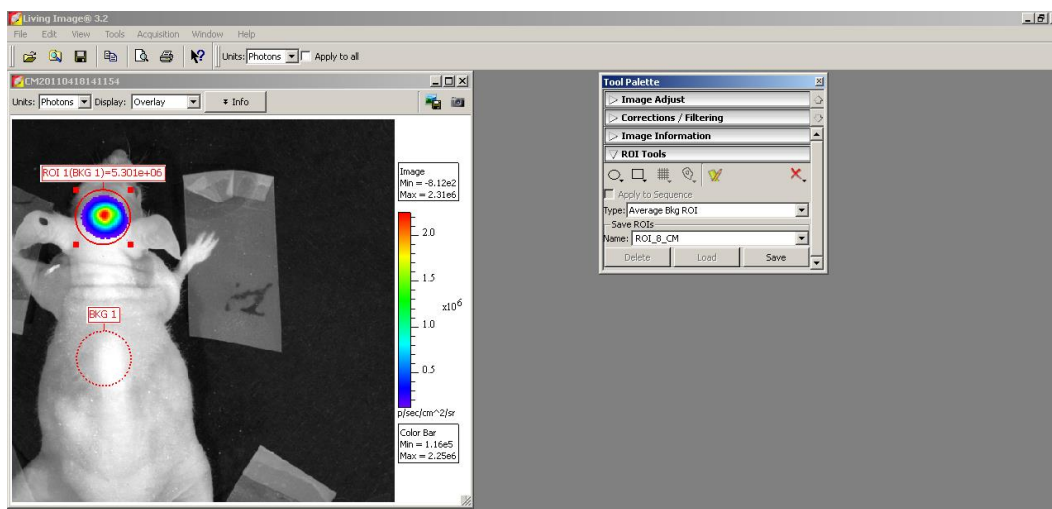


Fig. 20 Impostazione della ROI per la quantificazione del segnale.

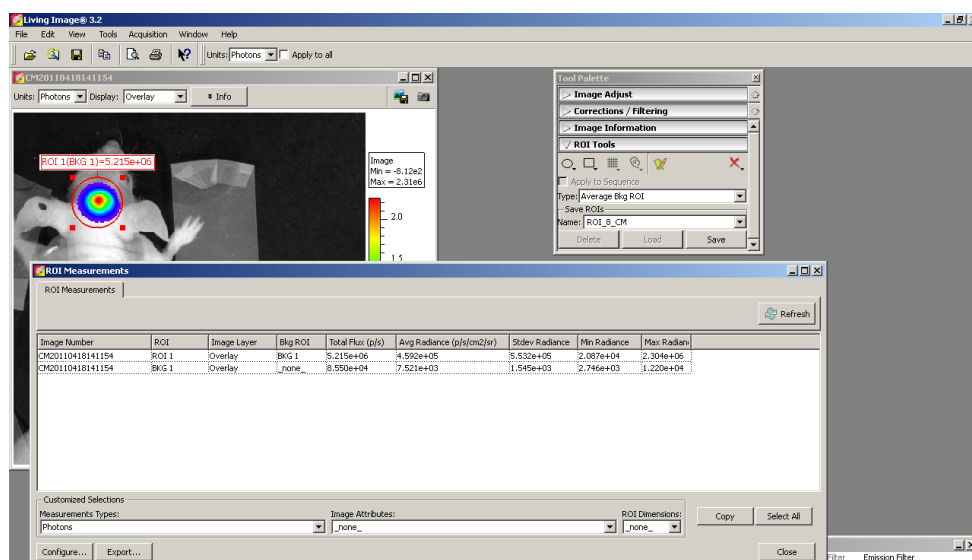


Fig. 21. Tabella dei valori di quantificazione del segnale

Per poter confrontare meglio studi longitudinali o acquisizioni di esperimenti diversi, è possibile aprire contemporaneamente tutte le immagini, in modo da poter scalare tutte le immagini con una scala di colori comune, rendendo possibile il confronto delle immagini. Questa operazione si esegue selezionando le immagini di interesse dalla griglia di ricerca delle immagini e successivamente cliccando sul comando “Load as group” (Figura 22).

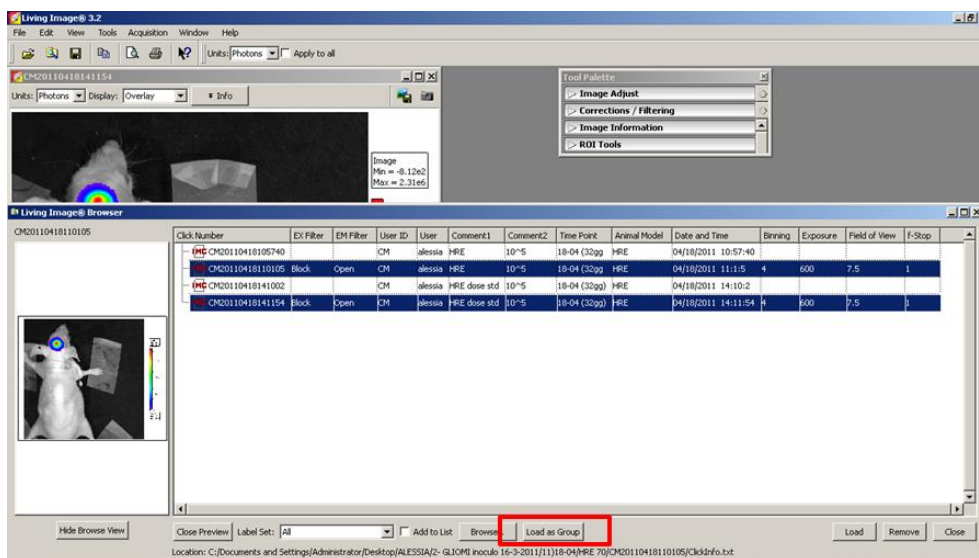


Fig.22 Caricamento di immagini diverse come gruppo.

A questo punto verranno visualizzate le immagini selezionate, ma per applicare una scala comune occorrerà verificare che non sia contrassegnata l'opzione “individual” nel pannello strumenti (Fig.

23), perché solo in questo modo i cambi della scala colore saranno applicati a tutte le immagini del gruppo, rendendole così confrontabili.

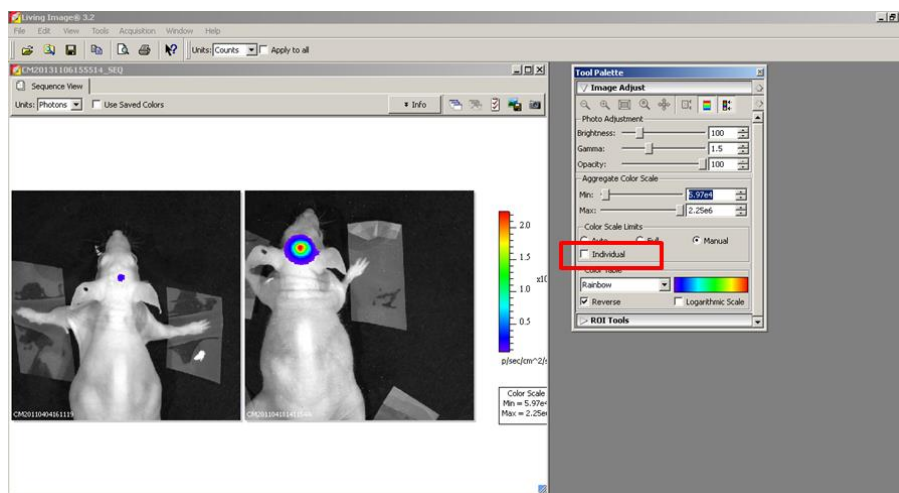


Fig.23. Modifica di una scala colore per un gruppo

2.2 Studi animali

Gli esperimenti animali sono stati effettuati secondo le linee guida per la cura e l'utilizzo degli animali da laboratorio approvate dal comitato etico dell'Università di Milano e notificate al Ministero della Salute (autorizzazione numero: 380/2015-PR).

Il modello murino ortotopico di tumore mammario è stato ottenuto attraverso l'iniezione di cellule di tumore mammario di origine murina (EMT6 e MET-1) e umana (SUM159) nel grasso intramammario degli animali. Le cellule sono state risospese in 20 μ l di PBS e iniettate in topi femmine di 7 settimane (laboratori Harlan) al giorno 0. Dopo l'iniezione l'ago viene lasciato per 2 minuti in corrispondenza del sito di iniezione per evitare la risalita capillare delle cellule lungo l'ago. Dopo 3 giorni dall'inoculo delle cellule tumorali, 3×10^5 MSCs sono state risospese in 20 μ l di PBS e iniettate sotto-cute nella zona peri-tumorale. Subito dopo l'iniezione delle MSCs è stato effettuato il primo trattamento con l'inibitore oATP. Il trattamento è stato effettuato intra-tumore per quattro volte a distanza di due giorni l'uno dall'altro.

I diversi gruppi di animali generati, sono stati monitorati attraverso BLI/FLI (IVIS Spectrum-CT; PerkinElmer Life Sciences), a diversi time point.

A partire dal giorno dell'inoculo delle cellule tumorali, sono state effettuate acquisizioni in BLI/FLI secondo il seguente schema (Fig. 24): giorno 0-3-6-8-10 e una volta a settimana fino alla conclusione dell'esperimento (giorno 33/32 nel caso dei tumori EMT6 e MET-1, giorno 66 nel caso dei tumori SUM159).

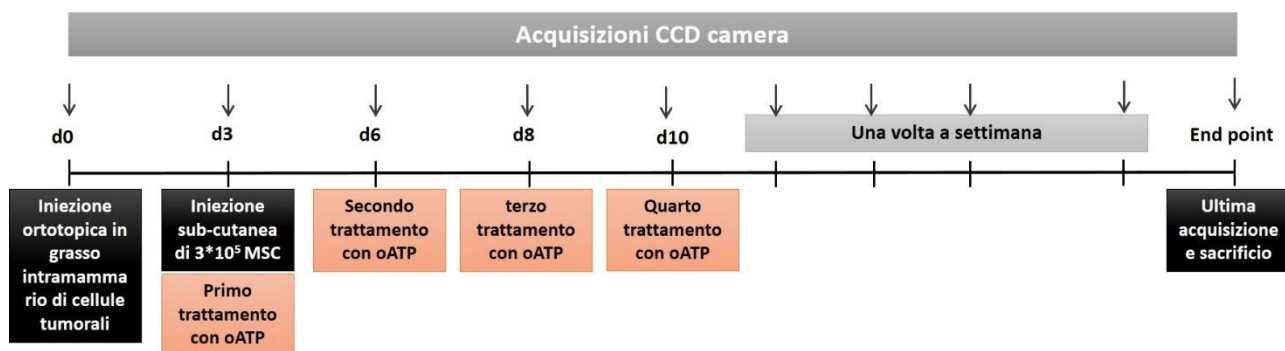


Fig.24. Schema sperimentale utilizzato per gli studi in vivo.

STUDI EX VIVO

3.1 Immunoistochimica (IHC)

Dopo l'ultima acquisizione gli animali sono stati sacrificati, il tumore è stato espantato e fissato in formalina 10% (Sigma Aldrich). Sono state effettuate sezioni longitudinali di (3 μ m) e colorate con ematossilina eosina (H&E) per la valutazione morfologica delle cellule costituenti il tumore.

Ulteriori sezioni (3 μ m) sono state utilizzate per le indagini immunoistochimiche.

Lo smascheramento dell'antigene è stato effettuato usando EDTA (pH8) o citrato (pH5) mediante l'utilizzo dell'immunocoloratore Benchmark Ultra (Ventana Medical System). Le sezioni sono, quindi, state lavate in buffer (TBS). E' stato effettuato un blocco Mouse specifico usando Rodent Block M (Biocare Medical) per 10 minuti. Dopo un veloce lavaggio in TBS sono state incubate per un'ora a temperature ambiente con i seguenti anticorpi: ki67 e CD31 (Abcam 15580; 28364). Il vetrino è stato lavato in TBS e successivamente incubato con l'anticorpo secondario Rabbit on Rodent HRP-Polymer (Biocare Medical). Le reattività sono state rivelate attraverso l'utilizzo del Sistema di detenzione Peroxidase Substrate Kit DAB (Vector) secondo le istruzioni di utilizzo.

ANALISI STATISTICHE

Gli esperimenti condotti *in vitro* e *in vivo* sono stati ripetuti almeno due volte e danno risultati riproducibili. Per gli studi condotti *in vivo* sono stati utilizzati 20 animali per linea cellulare. I dati sono stati presentati come media dei valori $\pm$ la deviazione standard. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando Prism 4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA); sono stati condotti test one-way ANOVA.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Lo studio si è svolto in fasi successive. Tre diverse linee cellulari di cui due murine e una umana sono state valutate *in vitro* e *in vivo* per quanto riguarda il loro comportamento in presenza di Cellule Staminali Mesenchimali. Come è noto, le MSCs sono in grado di migrare verso siti tumorali^{1,2,14}. Obiettivo principale di questo studio è stato quello di chiarire l'effetto diretto delle MSCs su cellule tumorali di carcinoma mammario, oltre al ben noto effetto immunomodulatorio esercitato da tali cellule sui componenti immunitari del TME³⁶⁻⁴¹.

1. IN VITRO

1.1 Migrazione

E' stata valutata *in vitro* la capacità migratoria delle MSCs dopo loro esposizione a terreni di crescita condizionati da linee cellulari tumorali, al fine di valutare l'eleggibilità delle tre linee considerate, per lo studio. Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando terreno condizionato rispettivamente da: cellule controllo, EMT6, MET-1 e SUM-159. Le MSCs esposte ai tre diversi terreni, incrementano significativamente (**p-value<0.01) le loro capacità migratorie rispetto al controllo in presenza di medium non condizionato (Fig.25).

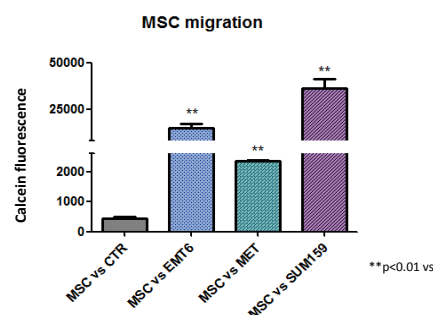


Fig.25 Test di migrazione delle MSCs dopo esposizione a terreno condizionato da cellule controllo e tumorali. Le capacità migratorie delle MSCs aumentano significativamente (**p<0.01) se esposte a terreno condizionato dalle tre linee di tumore mammario.

Tale risultato dimostra che tutte le linee tumorali considerate sono in grado di stimolare la capacità migratoria delle cellule mesenchimali permettendo di ipotizzare che tutte possano, quindi, essere utilizzate nello studio al fine di valutare l'effetto delle MSCs sulla popolazione tumorale.

1.2 Preparazione dei modelli cellulari

Per prima cosa le cellule tumorali sono state ingegnerizzate in modo da esprimere costitutivamente geni reporter: *mCherry* (EMT6) e *Luciferase* (MET-1 e SUM159). L'attività dei reporter è stata poi valutata su lisati cellulari mediante saggi biochimici. I dati hanno permesso di stabilire che l'intensità del segnale di fluorescenza e bioluminescenza fosse sufficiente per effettuare i successivi saggi *in vitro* e *in vivo* (*dati non riportati*). Le cellule tumorali ingegnerizzate sono state inoltre confrontate con le linee parentali per quanto riguarda il rate di crescita per valutare se l'ingegnerizzazione potesse aver comportato variazioni delle loro caratteristiche specifiche. I dati ottenuti non hanno mostrato differenze statisticamente significative nella cinetica di crescita delle popolazioni ingegnerizzate e parentali permettendo di proseguire la sperimentazione utilizzando esclusivamente le linee esprimenti i reporter.

1.3 Co-culture

Cellule tumorali ingegnerizzate sono state quindi utilizzate per valutare *in vitro* l'influenza delle cellule mesenchimali sulle diverse linee tumorali.

Al fine di valutare se le MSCs fossero in grado di influenzare la crescita di cellule tumorali e se il fenomeno fosse specifico, le stesse cellule tumorali MET-1 sono state coltivate in presenza di MSCs o di altre cellule controllo (linea di glioblastoma umano U87). Dopo 48h sono state effettuate acquisizioni alla CCD camera e analisi biochimiche per l'espressione del reporter. I risultati mostrano come la sola presenza di MSCs induca la stimolazione della proliferazione delle cellule tumorali mentre la co-cultura con la linea cellulare U87 di controllo non induca alcuna crescita della popolazione MET-1 esprimente il reporter (Fig.26a). Le quantificazioni alla CCD camera mostrano, infatti, come l'effetto sia significativo solo in presenza di cellule mesenchimali (Fig.26b).

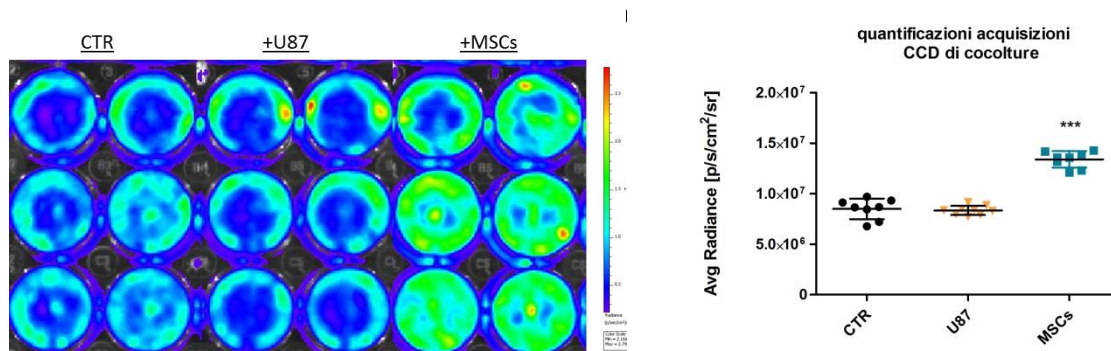


Fig.26 Co-culture MET-1/MET-1+U87/MET-1+MSCs a) Acquisizione alla CCD camera delle piastre di co-cultura; b) quantificazione dell'immagine in bioluminescenza: la presenza di MSCs aumenta significativamente l'espressione della luciferasi e il numero di cellule tumorali presenti in coltura (** $p < 0.001$).

Dati recenti hanno riportato che il recettore purinergico p2X7 riveste un ruolo importante nel processo di metastatizzazione in quanto la sua attivazione è coinvolta nell'aumento della capacità migratoria delle cellule tumorali. Tale meccanismo è stato descritto essere stimolato dal rilascio di TGF- β nel TME prodotto per lo più dalla componente mesenchimale. Sulla base di tali osservazioni, l'influenza delle MSCs sulle cellule tumorali è stata valutata in presenza o assenza dell'inibitore dei recettori purinergici (oATP)⁵⁷.

Le cellule tumorali, esprimenti i gene reporter, sono state coltivate per 48h in presenza o assenza di MSCs e/o di oATP utilizzando transwell con filtri di diametro 3 μ m, al fine di permettere il passaggio di microvescicole tra le due camere evitando il contatto diretto delle due popolazioni. L'associazione in coltura con le MSCs, mostra un incremento della crescita tumorale (fig. 27 a). La vitalità cellulare, misurata mediante conta cellulare con Trypan blue, mostra un incremento significativo di cellule tumorali vitali di 2.5 volte per le EMT6, 0.5 per le MET-1 e 3 volte per le SUM159 (fig.27b). Questi risultati dimostrano che non è necessario un contatto diretto tra le due tipologie cellulari ma che probabilmente l'effetto delle MSCs è dovuto a fattori secreti dalle MSCs stesse presenti nel medium di coltura. Il trattamento con oATP, determina, invece, una diminuzione significativa della crescita cellulare nelle linee tumorali murine, mentre, nella linea umana la riduzione non è significativa. Utilizzando il cotrattamento MSCs/oATP per 48h si osserva, nelle tre linee, una riduzione significativa del numero di cellule vitali che ritornano paragonabili al controllo (fig 27b).

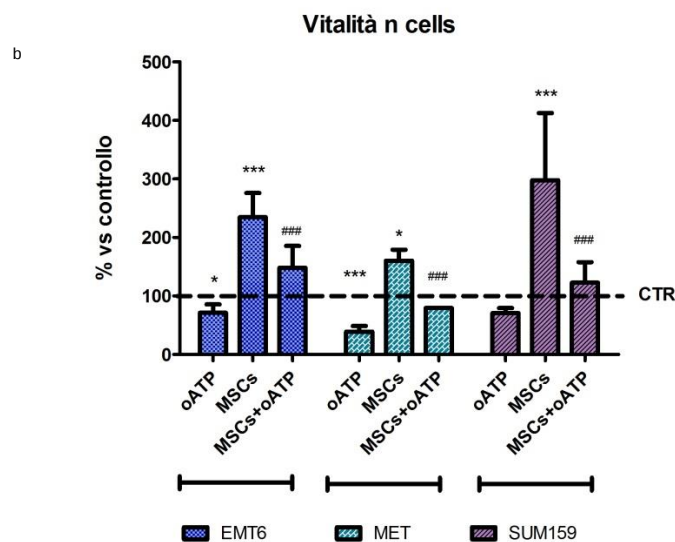
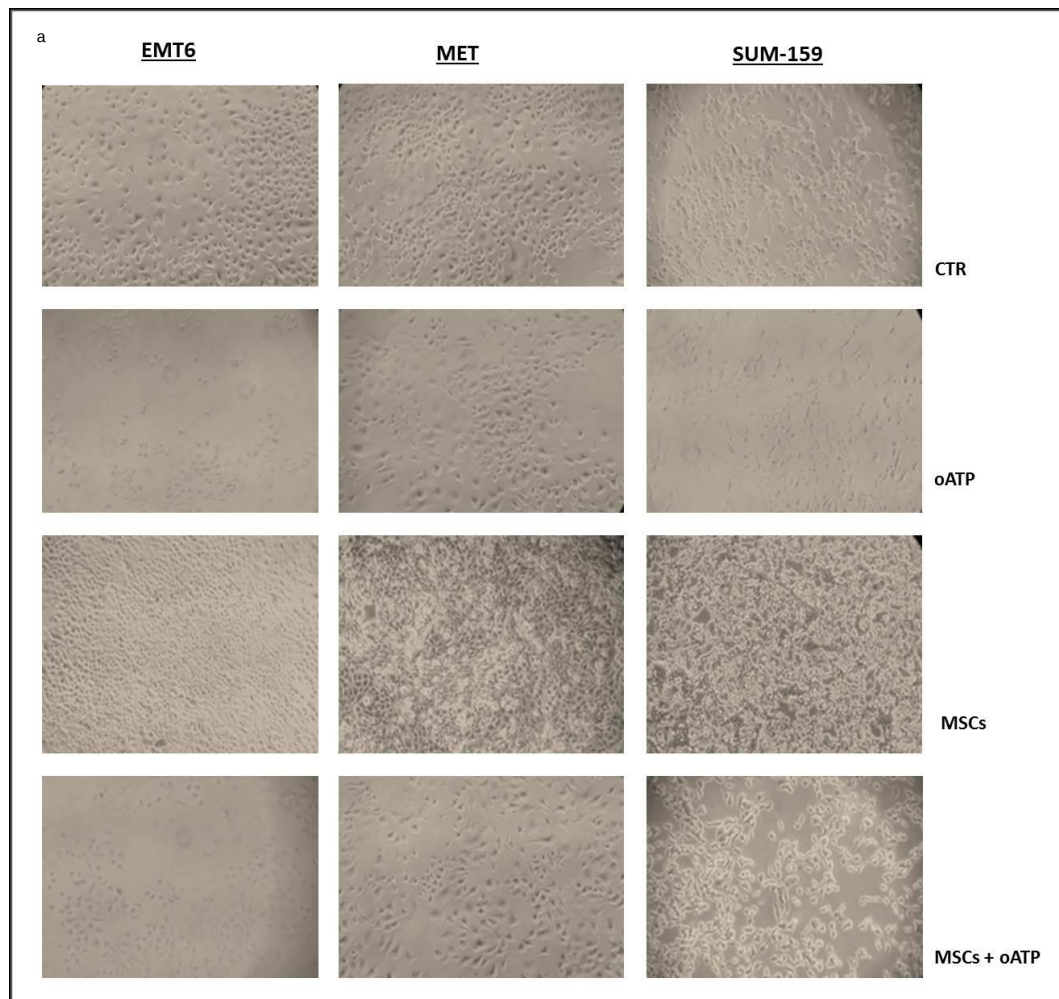


Fig.27 Co-culture delle linee tumorali EMT-6, MET-1 e SUM 159 in assenza/presenza di oATP e-o MSCs; a) colture in transwell24 per 48h. La presenza di MSCs aumenta la proliferazione delle cellule tumorali, il trattamento congiunto con oATP riduce questo effetto. b) vitalità cellulare misurata mediante saggio con Trypan blue; si conferma il dato visualizzato dalle colture: l'incremento del numero di cellule in presenza di MSCs viene arrestato dalla presenza dell'inibitore. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs CTR; ### $p < 0.001$ MSCs+oATP vs MSCs)

L'induzione della proliferazione da parte delle MSCs è stata inoltre, valutata in fluorescenza (per le EMT6) e bioluminescenza (MET-1 e SUM159) attraverso acquisizioni alla CCD camera delle piastre su cui sono state effettuate le cocolture e mediante analisi biochimiche dell'attività dei reporter. La quantificazione del segnale fluorescente e bioluminescente delle cellule tumorali effettuata su cellule vitali, mostra un incremento significativo quando queste vengono coltivate per 48h in presenza di MSCs (fig. 28a). Le stesse cellule sono state lisate e il segnale fluorescente e bioluminescente è stato misurato anche attraverso saggi biochimici (fig.28c). Anche in questo caso la presenza di MSCs induce un incremento significativo del segnale dimostrando l'aumento del numero di cellule vitali presenti nei pozzetti relativi alla cocoltura delle cellule tumorali con le MSCs. I risultati ottenuti mediante la quantificazione delle acquisizioni alla CCD camera e mediante analisi biochimiche evidenziano, anche in questo caso, che il trattamento congiunto MSCs e oATP determina, nelle tre linee tumorali, una riduzione significativa della spinta proliferativa generata dalla presenza delle mesenchimali (Fig 28b,c). Non sono state riscontrate differenze tra linee tumorali umane e murine rispetto alla risposta alla cocoltura con le relative MSCs, tutte le linee incrementano il tasso di proliferazione cellulare se coltivate in presenza di MSCs isolate rispettivamente da tessuto adiposo umano o murino (a seconda dell'origine delle cellule tumorali). Gli esperimenti *in vitro* effettuati utilizzando delle transwell permissive al passaggio di microvescicole, permette di ipotizzare che citochine o vescicole rilasciate dalle mesenchimali, siano in grado di indurre in modo diretto un aumento della crescita cellulare. Questo effetto viene arrestato dalla presenza di oATP che interviene, agendo sull'effetto pro-proliferativo indotto dalle MSCs inibendolo

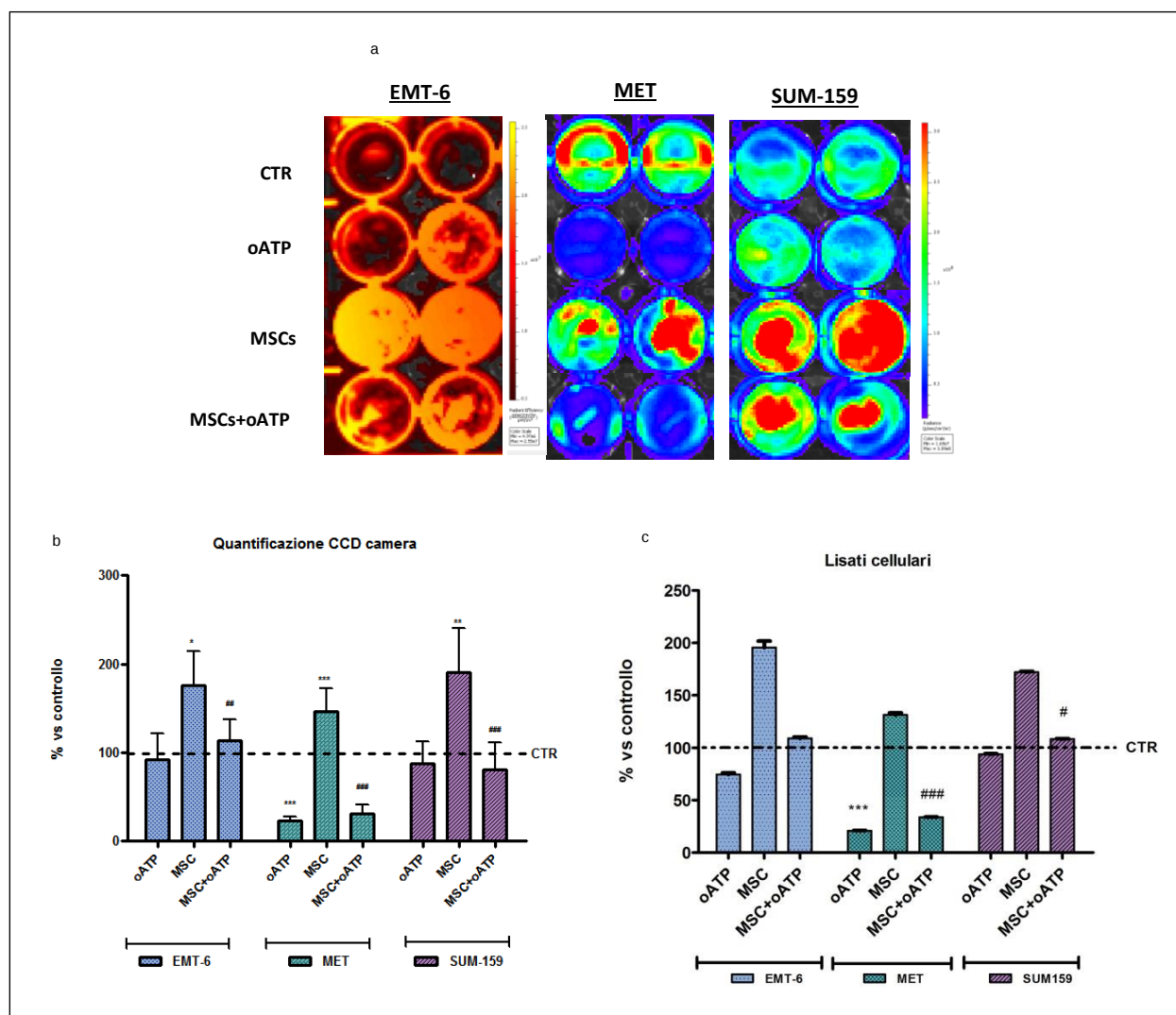


Fig.28 Coculture EMT6, MET-1 e SUMa) Acquisizione alla CCD camera di Colture cellulari in presenza o assenza del trattamento (oATP, MSCs o oATP+MSCs) in tutti i casi la fluorescenza (EMT6) e la bioluminescenza (MET e SUM159) viene indotta dalla presenza di mesenchimali e questo effetto viene inibito se le cellule vengono esposte a cotrattamento. b) quantificazioni del segnale BLI/FLI ottenuto alla CCD camera; c) le tre linee cellulari sono state lisate e le valutazioni biochimiche dell'espressione del gene fluorescente o bioluminescente mostrano gli stessi risultati ottenuti mediante CCD camera. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs CTR; ### $p < 0.001$ MSCs+oATP vs MSCs)

1.4 Effetto dose-risposta MET-1/oATP

Poiché la linea tumorale MET ha mostrato una maggiore sensibilità al trattamento con oATP rispetto alle altre due linee, è stato effettuato uno studio per valutare l'eventuale effetto citotossico dell'inibitore su questa linea a diverse concentrazioni. Sono stati effettuati saggi di vitalità cellulare attraverso la conta delle cellule vitali in coltura, acquisizioni alla CCD camera e relative quantificazioni, saggi di vitalità in fluorescenza e di attivazione delle caspasi 3/7; tutti i test sono

stati effettuati a seguito del trattamento della linea cellulare MET, per 48h, con diverse concentrazioni dell'inibitore.

La vitalità cellulare, valutata mediante conta con trypan blue, mostra un incremento della crescita cellulare a basse concentrazioni di oATP (500 nM), utilizzando, invece, concentrazioni più elevate del farmaco (100-300 μ M) la crescita si arresta. Il numero di cellule contate risulta infatti paragonabile al numero di cellule inizialmente piastrate (fig 29a). Le acquisizioni e le quantificazioni alla CCD camera mostrano il medesimo risultato: un aumento dell'espressione di luciferasi a basse concentrazioni dell'inibitore e una riduzione del segnale luminescente a più alte concentrazioni (fig.29 b), normalizzando l'espressione della luciferasi per il contenuto proteico le differenze si annullano a riprova del fatto che il cambiamento dell'intensità del segnale sia causato da un aumento/decremento del numero di cellule e non da una modulazione dell'espressione del reporter (fig. 29c).

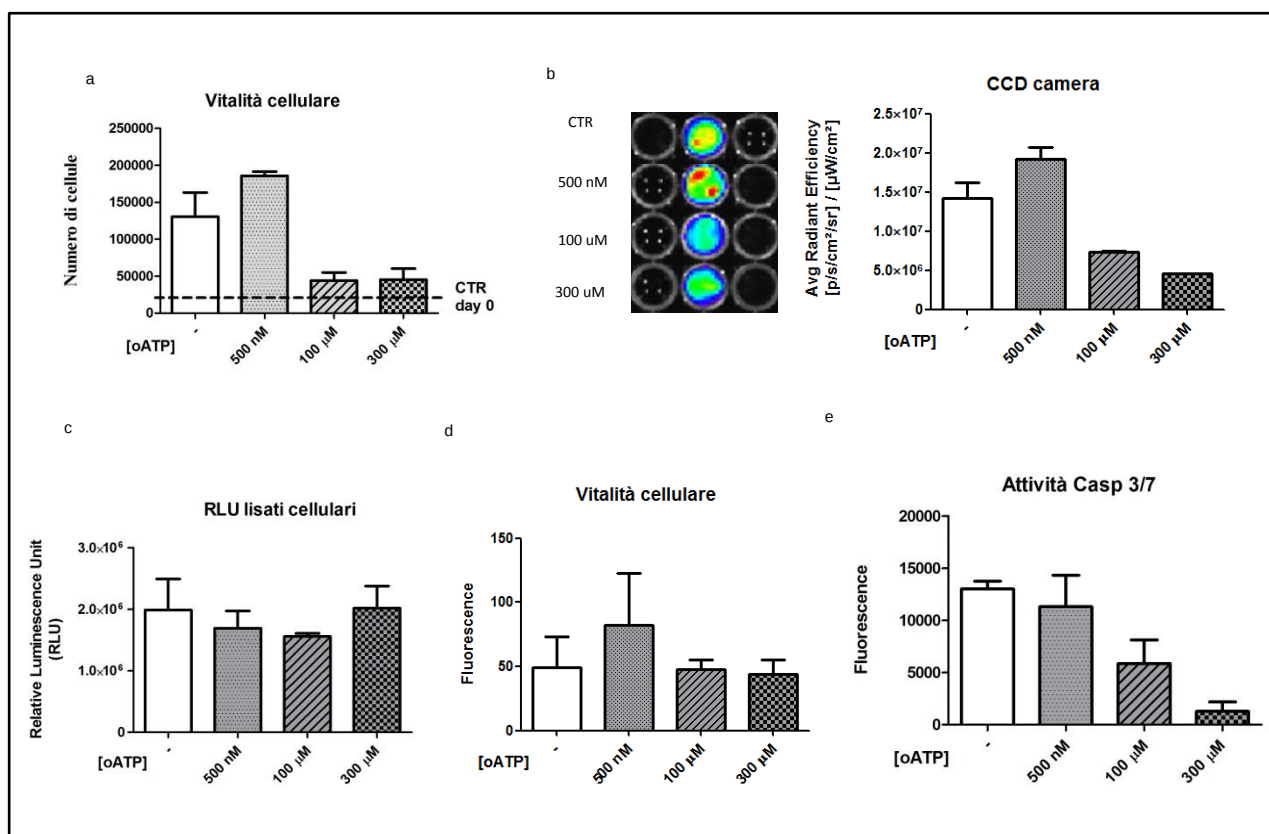


Fig.29 Valutazione dose risposta oATP sulle MET-1 a) Numero di cellule vitali in assenza di trattamento, a dosi progressivamente più elevate (500 nM, 100-300 μ M), la linea tratteggiata indica il numero di cellule controllo al giorno del trattamento; b) acquisizione alla CCD camera e relativa quantificazione di cellule controllo o in presenza di diverse dosi di trattamento; c) analisi biochimica dell'espressione della luciferasi nei lisati cellulari, normalizzata per il contenuto proteico della linea; d) saggio di vitalità cellulare in fluorescenza, a dosi più elevate dell'oATP non si osserva aumento della morte cellulare; e) saggio in bioluminescenza dell'attività delle caspasi 3/7, aumentando la concentrazione dell'inibitore si abbassa l'attività delle caspasi.

Il saggio di vitalità cellulare in fluorescenza mostra, tuttavia, come ad alte concentrazioni di oATP non vi sia induzione di mortalità cellulare quanto più probabilmente un estremo rallentamento della crescita (fig 29d), dato confermato dalla valutazione dell'attività delle caspasi che viene progressivamente ridotta aumentando la concentrazione dell'inibitore (fig 29e). Questo risultato supporta l'idea di un effetto citostatico dell'oATP sulla linea cellulare MET: le cellule non vengono indirizzate verso l'apoptosi (infatti si ha una riduzione dell'attività delle caspasi proporzionale all'aumento della concentrazione di oATP) piuttosto la loro crescita viene rallentata (la vitalità cellulare non decresce), non vi è dunque alcun effetto citotossico della molecola su questa linea tumorale.

2 IN VIVO

Il ruolo delle MSCs derivate da tessuto adiposo è stato valutato anche in un sistema più complesso come quello costituito da un modello ortotopico di carcinoma mammario ottenuto iniettando direttamente cellule tumorali all'interno del grasso mammario. In questo caso, l'utilizzo di linee murine e umane di cellule tumorali ha permesso di mettere a confronto il ruolo delle MSCs sia in topi immunodepressi sia in animali immunocompetenti analizzando il loro effetto sulla crescita del tumore.

2.1 EMT6

I primi esperimenti pilota *in vivo* sono stati effettuati utilizzando la linea di tumore mammario murino EMT6 esprimente il gene reporter fluorescente mCherry in modo costitutivo. Sono state iniettate ortotopicamente, nel grasso intramammario di topi balb/c, 2.5×10^5 cellule tumorali singeniche. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi di studio: il gruppo controllo (in cui sono state iniettate solo le cellule tumorali) e il gruppo MSCs (in cui dopo tre giorni dall'inoculo delle tumorali, sono state iniettate, sottocute, nelle adiacenze del tumore, 3×10^5 MSCs isolate da tessuto adiposo murino). Sono state, quindi, effettuate acquisizioni in fluorescenza, alla CCD camera al giorno 0 (giorno dell'inoculo delle cellule tumorali), dopo tre giorni (a seguito dell'iniezione delle MSCs) e successivamente una volta a settimana fino al sacrificio degli animali, al fine di valutare la progressione del tumore in presenza o assenza delle MSCs (fig 30 a). L'analisi delle immagini in fluorescenza mostra un andamento paragonabile della crescita del tumore nei due gruppi sperimentali fino al 18° giorno dall'inoculo delle cellule. Dal 22° giorno gli animali in cui erano state iniettate le MSCs, mostrano una maggiore crescita del tumore, la differenza diventa significativa dal 25° giorno (fig 30 b, c).

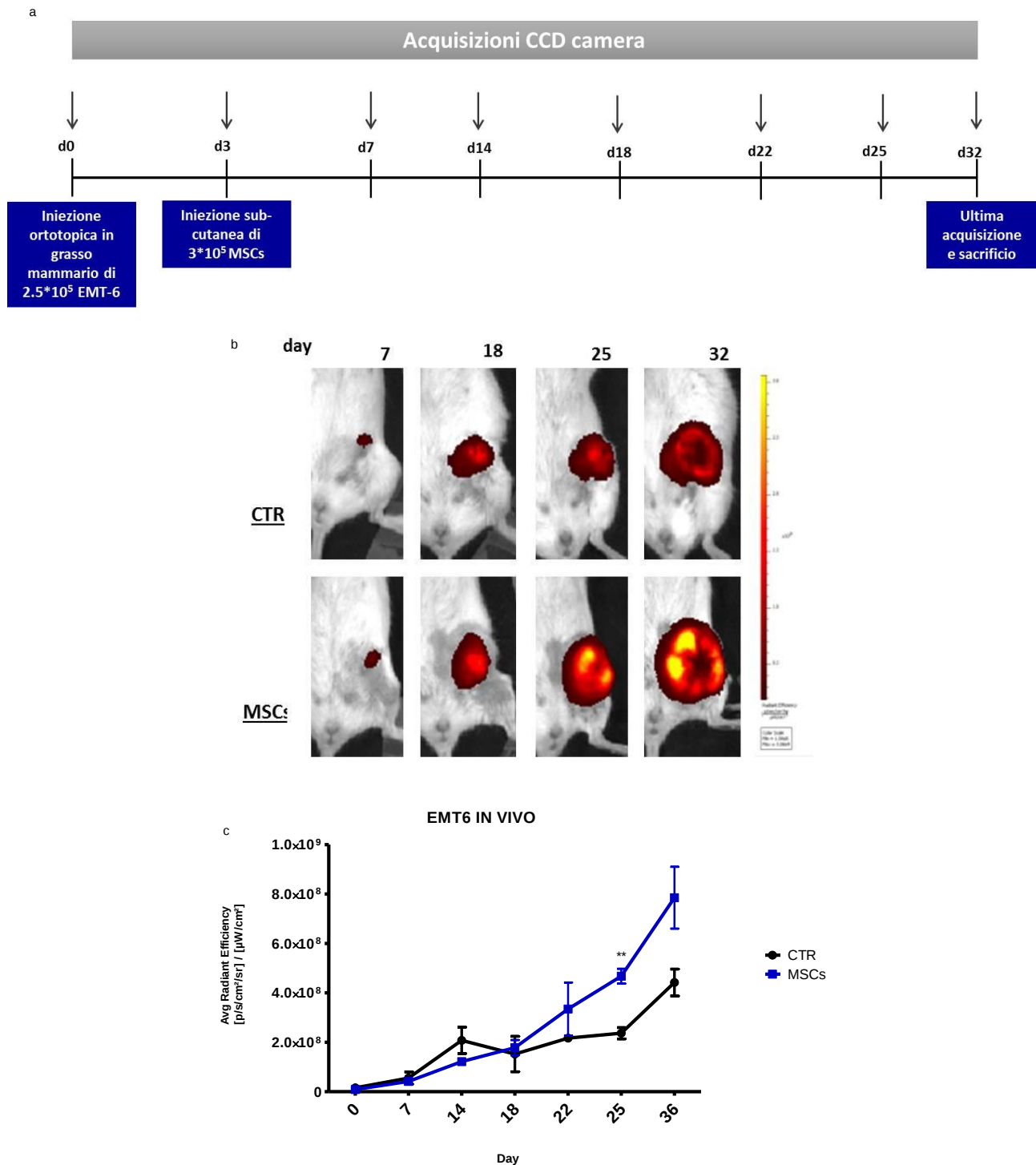


Fig.30 Acquisizioni FLI tumori EMT-6 dal giorno 0 all'espianto; a) Schema sperimentale dell'iniezione ortotopica di cellule tumorali EMT6 e successive acquisizioni alla CCD camera; b) immagini in fluorescenza dei due gruppi sperimentali (controllo e MSCs) al giorno 7-18-25 e 32; c) grafico per l'intensità di fluorescenza dei due gruppi nel tempo, fino al giorno dell'espianto del tumore. Il segnale è paragonabile fino al 18°giorno, dal 22° si osserva un aumento significativo della fluorescenza nel gruppo MSCs (** $p < 0.01$ MSCs vs CTR).

Il 32° giorno è stato effettuato il sacrificio degli animali e l'espianto dei tumori, che avevano raggiunto dimensioni eticamente non accettabili per gli animali. Al momento dell'espianto, i tumori sono stati pesati e calcolata la media dei pesi per gruppo. I tumori derivati dal gruppo di animali in cui sono state iniettate le MSCs mostrano un peso significativamente maggiore rispetto al gruppo controllo.

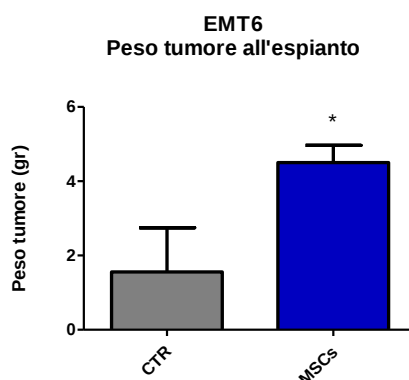


Fig.31 Grafico della media dei pesi dei tumori all'espianto, il peso dei tumori nel gruppo MSCs è significativamente superiore rispetto ai tumori del gruppo controllo (* $p < 0.05$)

Come nel caso delle colture *in vitro*, la presenza di MSCs induce un aumento della crescita cellulare. I tumori del gruppo MSCs, *in vivo*, al giorno del sacrificio, mostrano dimensioni superiori rispetto a quelle del gruppo controllo. In entrambi i gruppi sono presenti aree interne di necrosi proporzionali alla dimensione del tumore. Le regioni necrotiche sono evidenziate anche nelle immagini in fluorescenza da una riduzione del segnale in corrispondenza con l'area di necrosi.

2.2 MET-1

Lo stesso tipo di esperimento è stato svolto anche con una seconda linea di tumore mammario murino MET opportunamente ingegnerizzata per l'espressione costitutiva della luciferasi, in modo che fosse possibile anche in questo caso effettuare l'analisi di bioluminescenza in modo non-invasivo nei modelli *in vivo*. 1×10^6 cellule tumorali sono state iniettate ortotopicamente nel grasso intramammario degli animali. Dopo tre giorni, gli animali sono stati acquisiti alla CCD camera e suddivisi omogeneamente in base al segnale di bioluminescenza in quattro gruppi sperimentali: il gruppo controllo, il gruppo oATP (in cui i tumori sono stati trattati per quattro volte esclusivamente

con oATP), MSCs (in cui sono state iniettate 3×10^5 MSCs, sottocute nella zona peri tumorale) e il gruppo MSCs+oATP (in cui dopo l'iniezione sottocute delle MSCs sono stati effettuati i trattamenti con l'inibitore). Sono state, quindi, effettuate acquisizioni della bioluminescenza mediante CCD camera al giorno 0, dopo tre giorni (a seguito dell'iniezione delle MSCs e del primo trattamento con oATP), successivamente ogni due giorni prima di ogni trattamento e una volta a settimana fino al sacrificio degli animali, al fine di valutare la progressione del tumore in presenza o assenza delle MSCs e a seguito del trattamento (fig 32 a).

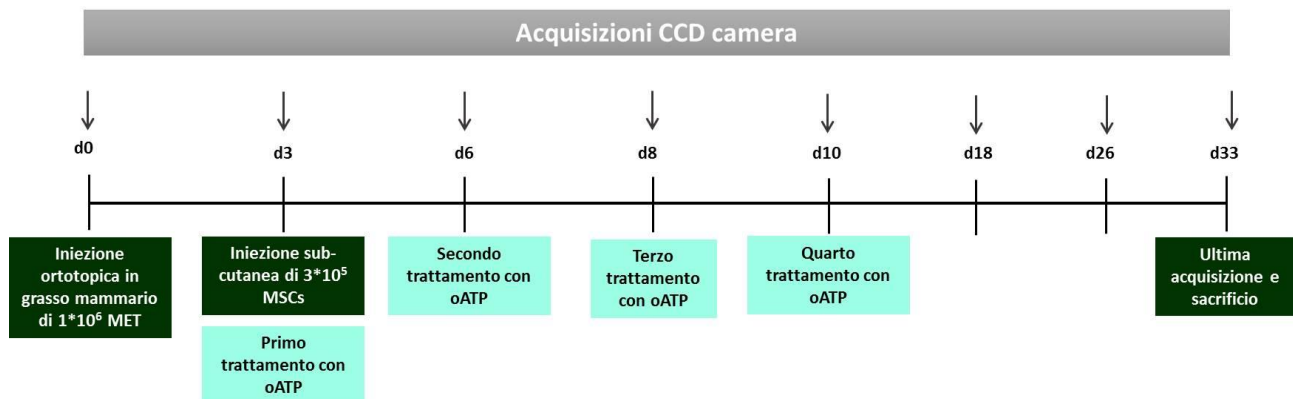


Fig.32 Schema sperimentale in vivo MET1-luc.

Fino al decimo giorno dall'inoculo delle cellule tumorali, il rate di crescita dei tumori è risultato essere paragonabile tra i diversi gruppi. Tuttavia, dal 17° giorno sono state evidenziate differenze nella crescita dei tumori, il cui segnale di bioluminescenza risultava significativamente maggiore nel gruppo MSC rispetto al gruppo controllo ($p < 0.01$ MSCs vs CTR). Inoltre, il gruppo MSCs+oATP mostrava una significativa riduzione del segnale rispetto al gruppo MSCs ($p < 0.01$ MSCs+oATP vs MSCs). Il trattamento con l'inibitore determina la formazione di un tumore che cresce in modo paragonabile ai tumori del gruppo controllo (fig. 33 a, b).

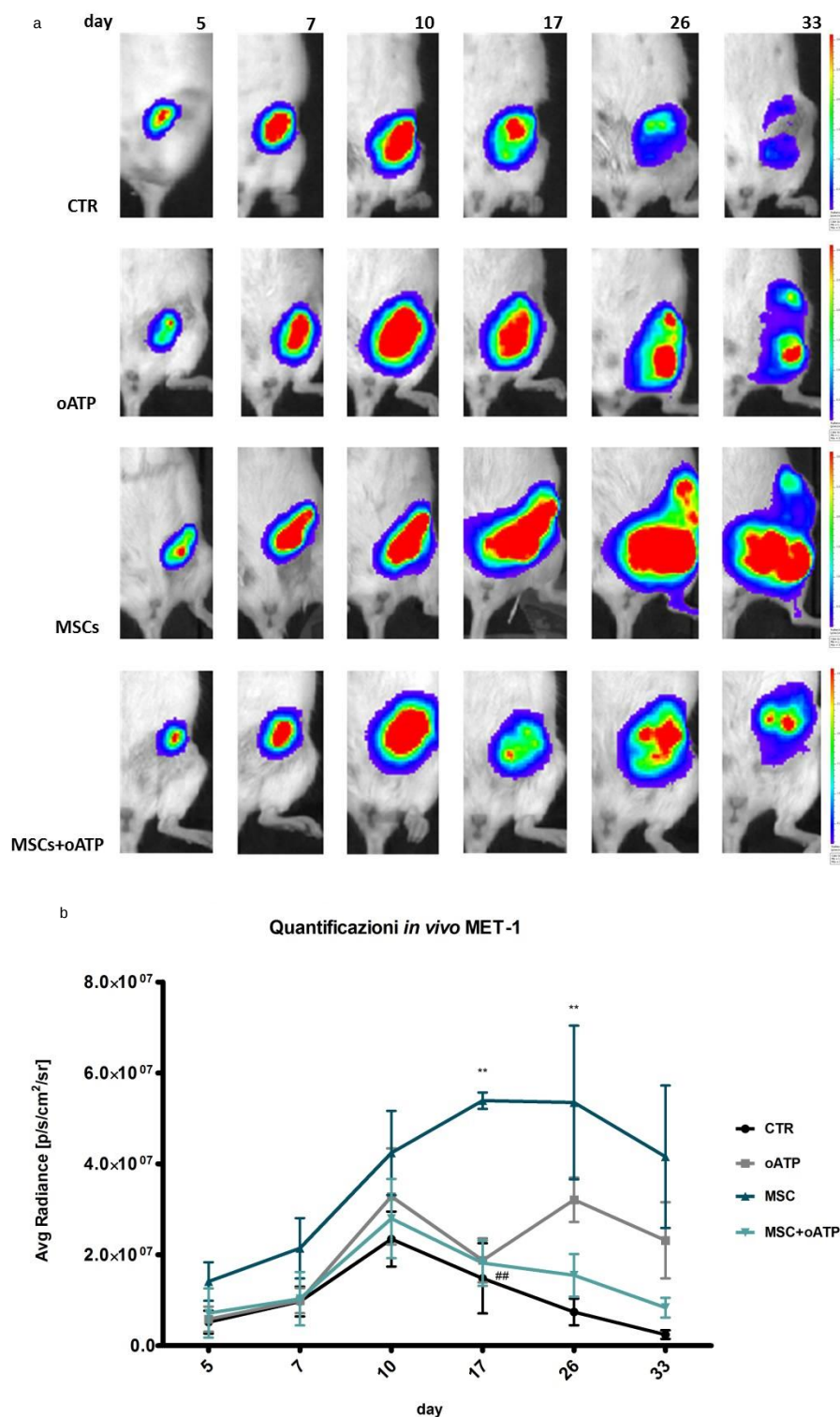


Fig.33 BLI di tumori MET-1 nel tempo, acquisizioni e quantificazioni del segnale a) acquisizioni in bioluminescenza alla CCD camera dei quattro gruppi sperimentali al giorno 5,7,10,17,26 e 33; b) analisi del segnale bioluminescente nel tempo per i quattro gruppi sperimentali, la crescita del tumore è paragonabile, nei quattro gruppi, fino al giorno 10, dal giorno 17 i tumori del gruppo MSCs mostrano un segnale significativamente più elevato dei controlli (** $p < 0.01$ MSCs vs CTR), mentre i tumori del gruppo MSCs+oATP riducono significativamente il loro segnale avvicinandosi al controllo (## $p < 0.01$ MSCs+oATP vs MSCs)

Gli animali sono stati sacrificati il 33° giorno dall'inoculo del tumore. Le dimensioni e il peso dei tumori del gruppo MSCs risultano significativamente maggiore rispetto al controllo. I due gruppi trattati con l'inibitore mostrano, invece, pesi paragonabili al gruppo controllo (fig. 34 a, b). Il trattamento con il solo inibitore dei recettori purinergici non altera la crescita del tumore rispetto al gruppo controllo, mentre l'utilizzo dell'oATP in associazione alla presenza delle MSCs, determina un'inibizione dell'effetto delle mesenchimali sulla proliferazione cellulare. Queste cellule *in vivo* risultano meno sensibili all'oATP e ciò potrebbe essere dovuto ad altri fattori che intervengono in un ambito più complesso come quello *in vivo* (ad esempio il sistema immunitario, diversi livelli di ATP endogeno). Infatti, il tumore iper-stimolato nella crescita dalla presenza di MSCs, ritorna alle dimensioni dei controlli in seguito all'inibizione mediata dall'oATP.

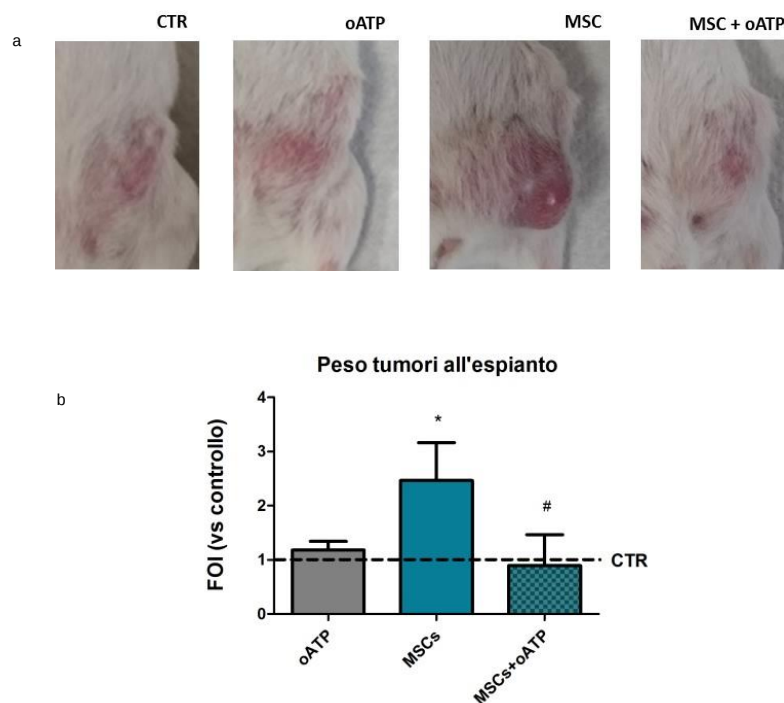


Fig.34 Tumori all'espanto, giorno 33 a) Immagini dei tumori il giorno dell'espanto; b) media peso dei tumori all'espanto, il peso medio dei tumori nel gruppo MSCs è significativamente superiore alla media dei pesi nel gruppo CTR (* $p < 0.05$), il trattamento con oATP riduce il peso dei tumori trattati con MSCs fino a riportarli al peso dei controlli (# $p < 0.05$ MSCs+oATP vs MSC)

I tumori espantati sono stati analizzati in immunohistochimica per l'espressione di due antigeni: Ki67 (indice di cellule in attiva proliferazione) e CD31 (marcatore endoteliale). La quantificazione effettuata per la percentuale di cellule positive alla colorazione per ki67, per campo, non mostra differenze significative tra i gruppi. Nonostante i diversi trattamenti le cellule tumorali mantengono la capacità proliferativa, probabilmente rallentando la progressione nel ciclo cellulare come si può

evincere dalla valutazione del diverso rate di crescita *in vitro* in presenza o assenza dei trattamenti (Fig. 27 a , b). Il medesimo effetto è stato osservato per la formazione di nuovi vasi. Infatti la colorazione specifica per CD31 ha mostrato una densità di vasi paragonabile nei diversi gruppi in analisi. Tale riscontro potrebbe essere dovuto al fatto che il sacrificio e la colorazione istologica è stata effettuata solo in una fase tardiva della crescita delle lesioni nei diversi gruppi, mentre, l'induzione della diversa velocità di crescita del gruppo trattato con le MSCs è stata osservata in fasi molto più precoci.

Anche nel caso dei tumori generati da cellule MET-1, al giorno del sacrificio, i tumori raggiungono dimensioni particolarmente elevate e sono caratterizzati da un'area di necrosi centrale di notevoli dimensioni.

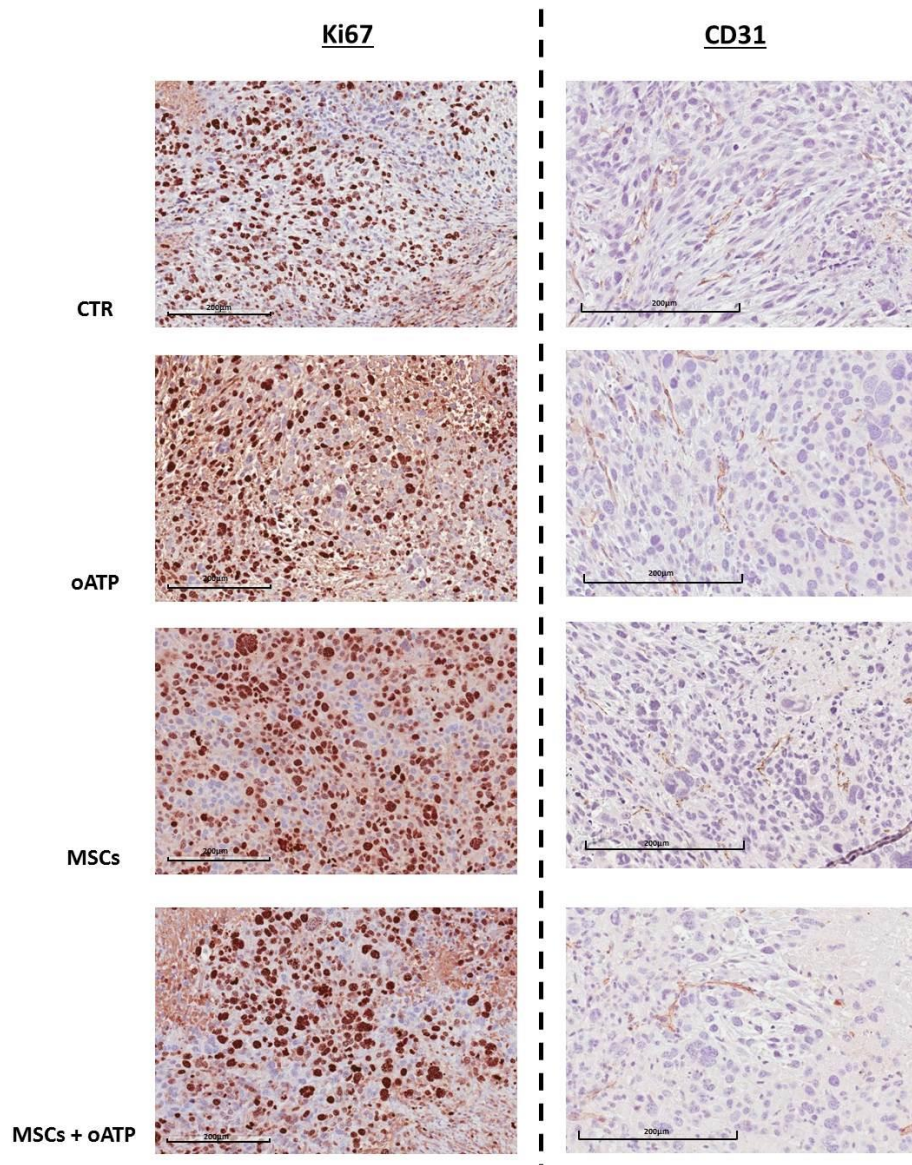


Fig.35 a) Immunoistochimica: marcatura effettuata per ki67 e CD31 per i tumori espiantati dei quattro gruppi sperimentali;

2.3 SUM-159

Al fine di verificare se gli effetti osservati nei modelli murini potessero riproporsi anche utilizzando cellule umane, gli esperimenti *in vivo* sono stati condotti utilizzando anche la linea cellulare di tumore mammario umano SUM159, opportunamente ingegnerizzata per l'espressione del gene per la luciferasi. Topi femmina, nudi atimici sono stati inoculati ortotopicamente nel grasso intramammario con 5×10^6 cellule tumorali. Il terzo giorno, gli animali sono stati suddivisi, in modo omogeneo, in base al segnale di bioluminescenza dato dalle cellule tumorali, in quattro gruppi sperimentali (come nel caso delle MET-1): un gruppo controllo, un gruppo oATP, uno MSCs e uno MSCs+oATP. 3×10^5 MSCs sono state iniettate sottocute nella regione peri tumorale e, contemporaneamente, ha avuto inizio il primo trattamento con oATP. Ogni due giorni per quattro giorni, sono stati effettuati i trattamenti intratumore con l'inibitore (fig. 36).

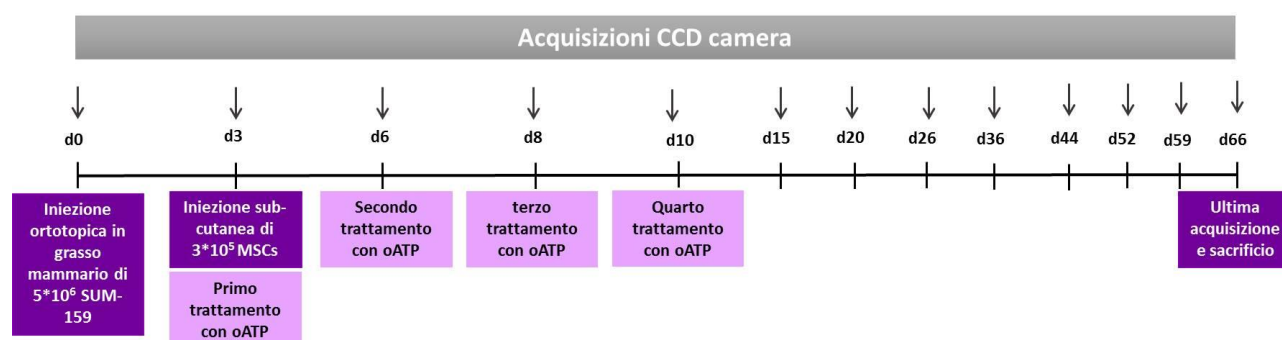


Fig.36 Schema sperimentale *in vivo* per l'inoculo di cellule SUM159-luc.

L'esperimento mostra come fino al 20° giorno dall'inoculo, la crescita del tumore sia paragonabile nei gruppi di studio. Tuttavia, dal 36° giorno in poi la crescita del tumore è maggiore nel gruppo MSCs rispetto al gruppo controllo. Il trattamento con oATP singolarmente non produce cambiamenti rispetto alla crescita dei tumori nel gruppo controllo, ma il trattamento correlato MSCs e oATP causa una diminuzione della crescita non solo rispetto al gruppo MSCs, ma anche rispetto al controllo (Fig 37 a,b). In questo caso, bisogna tener presente che il modello ortotopico è stato prodotto utilizzando topi nudi, carenti cioè di parte delle componenti del sistema immunitario, specialmente della linea T. In questi animali, quindi, il potente effetto immuno-modulatorio descritto

per le MSCs nel TME, non può essere esplicitato completamente. Ne consegue che l'aumento della crescita tumorale, osservata nel gruppo MSCs, potrebbe essere, in questo caso, il risultato di un effetto più diretto delle cellule mesenchimali sul tumore. Confrontando questo risultato con l'incremento della crescita cellulare stimolata dalle MSCs nelle co-culture *in vitro*, possiamo sottolineare come anche in assenza di parte dei bersagli specifici della loro azione (alcune componenti del sistema immunitario), le MSCs sono in grado di stimolare direttamente la proliferazione delle cellule tumorali.

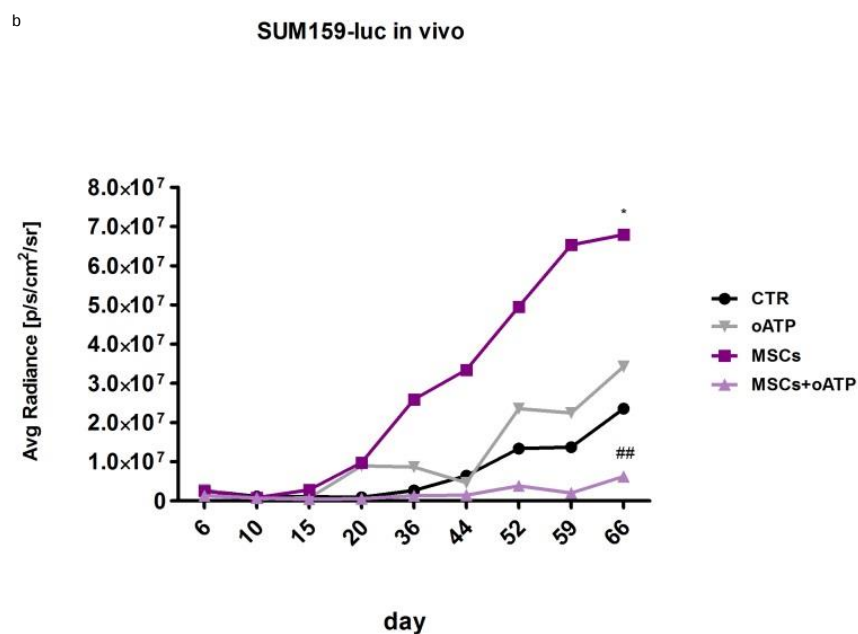
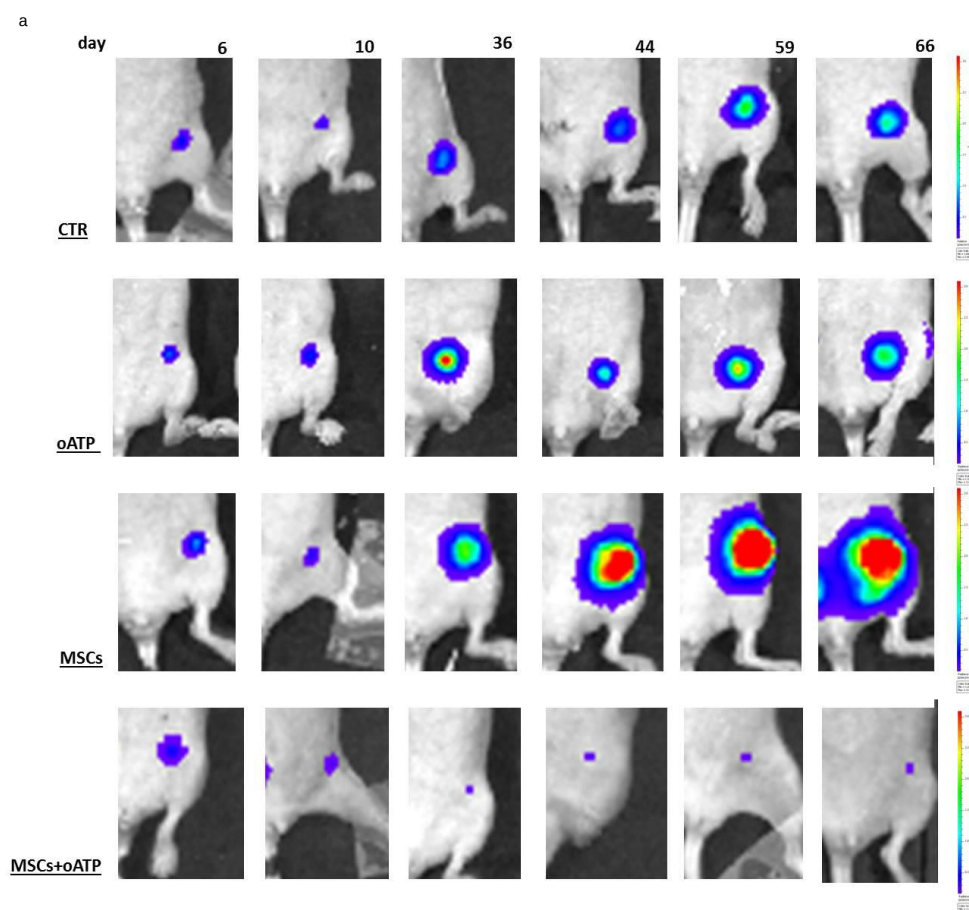


fig.37 Acquisizioni BLI tumori SUM159 dal giorno 6 all' espianto a) immagini di bioluminescenza alla CCD camera dei tumori dei quattro gruppi sperimentali al giorno 6-10-36-44-59 e 66; b) grafico delle quantificazioni del segnale di bioluminescenza per i quattro gruppi nel tempo. Al giorno 66 la media del segnale del gruppo MSCs è significativamente maggiore rispetto al controllo (* $p < 0.05$ MSCs vs CTR) e la media del segnale del gruppo MSCs+oATP è significativamente differente rispetto al gruppo MSCs (## $p < 0.01$ MSCs+oATP vs MSCs)

Il giorno 66 i tumori sono stati espunti e pesati (Fig. 38 a). La media dei pesi per gruppo mostra come vi sia, anche in questo caso, un incremento del peso dei tumori del gruppo MSCs rispetto al controllo, mentre il trattamento con oATP riduce la dimensione e il peso del tumore (fig.38b) . Analizzando questi risultati è possibile osservare che la linea cellulare SUM159, in vivo, mostra una cinetica di crescita inferiore rispetto alle altre linee murine, motivo per cui è stato possibile seguire la crescita neoplastica fino al 66° giorno dall'incolo del tumore. All'espanto i tumori non presentavano aree di necrosi e le dimensioni dei tumori trattati con MSCs risultavano essere significativamente maggiori rispetto ai controlli (fig. 38a). Rispetto ai precedenti esperimenti in vivo, il trattamento con oATP ha mostrato un maggiore effetto nel gruppo dei tumori trattati anche con cellule mesenchimali, tanto da causare una riduzione significativa nelle dimensioni e nel peso del tumore anche rispetto al controllo (fig. 38 a, b). La risposta osservata nel doppio trattamento potrebbe essere causata dall'assenza di parte della componente immunitaria, questo potrebbe causare un'alterazione del sistema che influisce, in ultima analisi, sulla risposta all'oATP potenziandola.

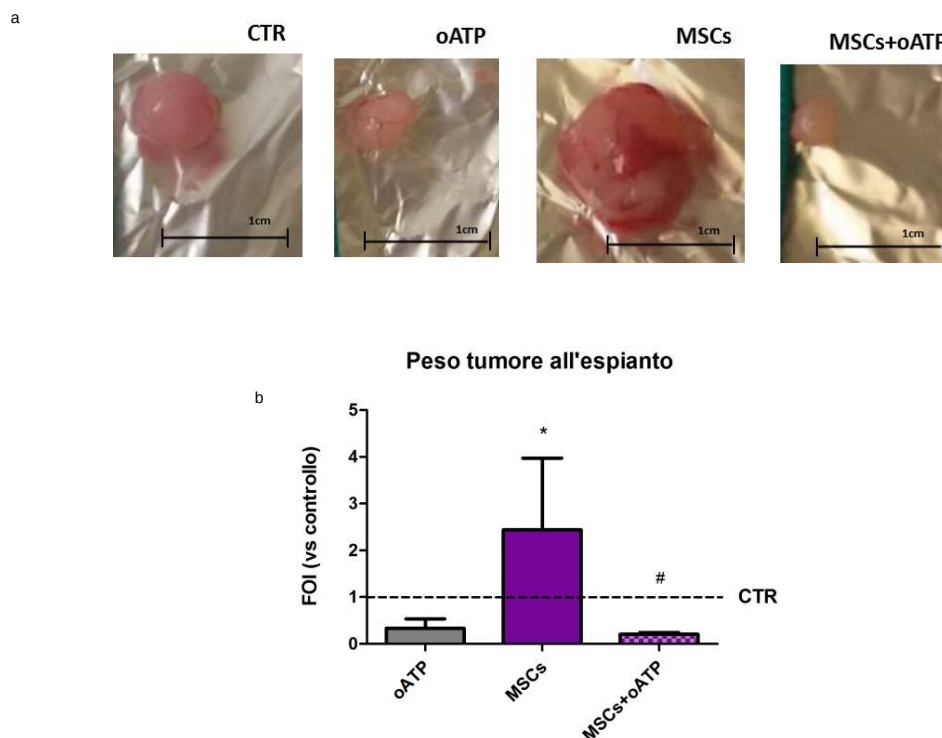


Fig.38 Tumori all'espanto, giorno 66; a) fotografie dei tumori il giorno dell'espanto; b) grafico che mostra la media del peso dei tumori all'espanto: La media dei pesi dei tumori MSCs è superiore alla media dei pesi del gruppo controllo (* $p<0.05$); il trattamento con oATP riduce significativamente il peso dei tumori (* $p<0.05$); il trattamento con oATP in presenza di MSCs causa una riduzione dei pesi dei tumori sia rispetto al controllo (* $p<0.05$) che rispetto al gruppo MSCs (# $p<0.05$)

I tumori espunti sono stati analizzati mediante immunistochemica per gli anticorpi di proliferazione (ki67) e presenza di vasi (CD31). La quantificazione delle immagini mostra anche in

questo caso una positività cellulare al Ki67 e al CD31 paragonabile tra i gruppi in studio (Fig. 39). Le cellule mesenchimali agiscono incrementando la velocità di proliferazione delle cellule tumorali mentre il trattamento con oATP sembra ritardare la velocità di progressione nel ciclo senza modificare la vitalità cellulare validando la positività costante al ki67. Come per i tumori originati dalle cellule MET-1, anche per i tumori ottenuti con cellule SUM159, l'espianto e le colorazioni immunoistochimiche sono state effettuate solo all'*end-point*. Proprio tale tempistica anche in questo caso potrebbe aver determinato il mancato riscontro di differenze significative nell'espressione del CD31 dato che l'aumento nella velocità di crescita nei tumori dei diversi gruppi si è invece iniziata ad osservare in fasi molto più precoci.

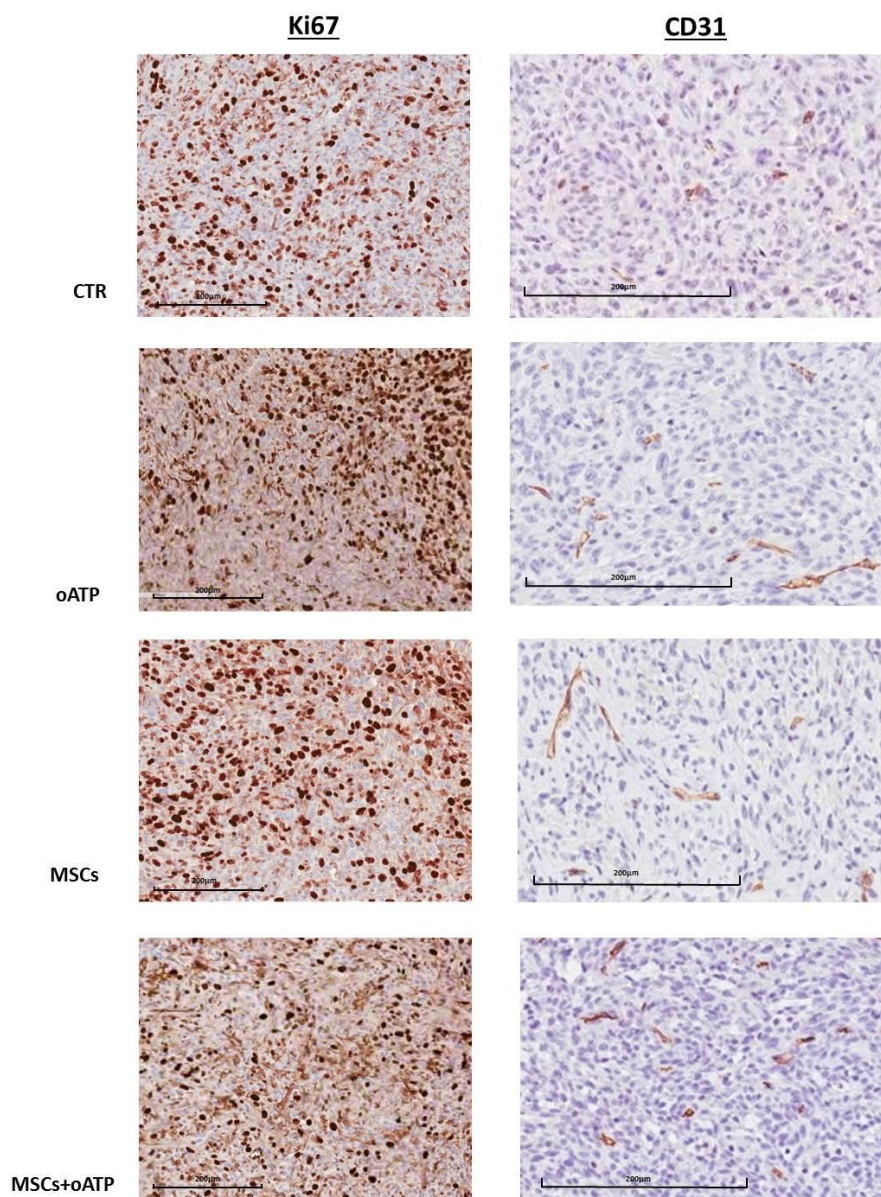


Fig.39 Immunoistochimica: marcatura effettuata per ki67 e CD31 per i tumori espiantati dei quattro gruppi sperimentali.

Il trattamento, *in vitro*, di cellule di tumore mammario di origine sia murina che umana, con MSCs, ha prodotto un aumento della crescita cellulare. Come precedentemente descritto, le MSCs stimolano la crescita delle cellule tumorali mammarie. Il meccanismo molecolare attraverso cui avviene la comunicazione tra cellule mesenchimali e tumorali non è stato ancora chiarito. Tuttavia, è stato più volte proposto un coinvolgimento del TME che coopera al fine di stimolare e supportare la crescita tumorale. Un recente studio mostra come l'aumento della produzione e del rilascio di TGF- β all'interno del TME stimoli la motilità delle cellule tumorali attraverso un meccanismo di feedback che agisce sul recettore purinergico P2X7 presente sulla membrana cellulare delle cellule tumorali, stimolandolo⁵⁷. E' stato dimostrato che le MSCs sono tra le principali cellule del TME a produrre TGF- β ¹⁶. Il recettore P2X7 è implicato nella regolazione di un importante bilancio tra sopravvivenza cellulare e apoptosi, quando viene iper-stimolato determina un aumento della sopravvivenza cellulare⁶⁰. Le MSCs, oltre a giocare un ruolo da protagoniste nella stimolazione delle CSCs all'interno del TME, sono in grado di stimolare direttamente la proliferazione delle cellule tumorali, dato confermato dagli esperimenti condotti *in vitro* in cui la sola presenza di MSCs è in grado di produrre un incremento del numero di cellule in coltura. Nel presente studio viene proposto un sistema di regolazione del segnale che, attraverso la produzione del TGF- β da parte delle MSCs, potrebbe agire stimolando la secrezione di ATP da parte delle cellule tumorali; il nucleotide sarebbe in grado di stimolare il P2X7 la cui attività e produzione potrebbe essere up-regolata dall'aumento della concentrazione di ATP. Un aumento dell'attività di P2X7 significherebbe, in ultima analisi, la proliferazione delle cellule tumorali andando a stimolarne la crescita. (Fig. 40).

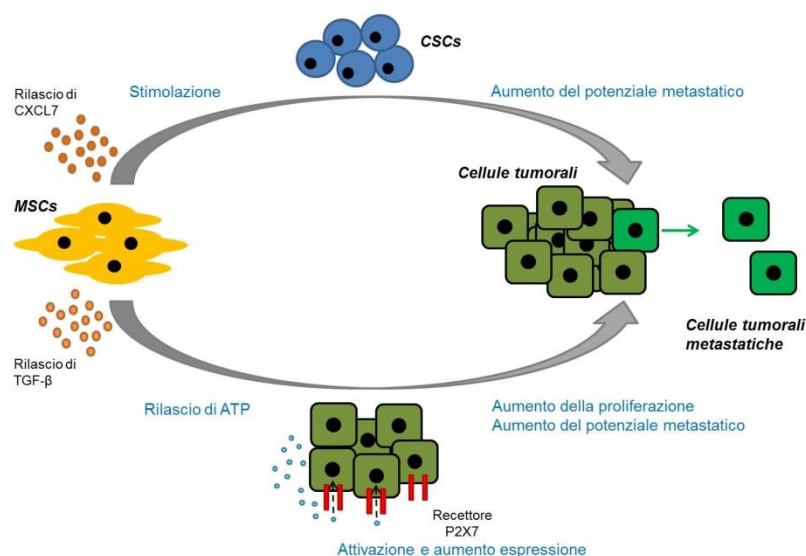


Fig.40 Immagine schematica del meccanismo d'azione proposto, attraverso cui le MSCs stimolano la proliferazione delle cellule neoplastiche: il rilascio di TGF- β stimola la produzione e secrezione di ATP che attiva il P2X7, si instaura un feedback positivo per l'espressione del recettore che stimola le cellule tumorali verso la sopravvivenza.

A riprova dell'ipotesi sostenuta, si è scelto di utilizzare l'inibitore dei recettori purinergici oATP. Gli studi *in vitro* mostrano come nel trattamento congiunto oATP/MSCs, delle cellule tumorali, vi sia un'inibizione dell'effetto pro-proliferativo generato dalle MSCs. Gli esperimenti condotti *in vivo* sulle tre linee di carcinoma mammario esprimenti i geni reporter mostrano un incremento delle dimensioni tumorali in tutti e tre i modelli sperimentali valutati. L'incremento delle dimensioni del tumore è sempre significativo rispetto ai gruppi di controllo. Le MSCs anche nei modelli *in vivo* mostrano una stimolazione della crescita delle cellule tumorali. L'uso dell'inibitore oATP annulla l'effetto di stimolazione creato dalle cellule mesenchimali, determinando quindi un blocco della comunicazione MSCs/cellule tumorali. L'effetto inibitorio raggiunge poi il massimo livello in un sistema modello in cui vi è assenza di parte del sistema immunitario che viene generalmente modulato dalle MSCs.

A sostegno dei dati ottenuti e delle ipotesi fatte, sono in corso analisi molecolari volte a chiarire le implicazioni dell'interazione tra MSCs-P2X7 e cellule tumorali. Dopo co-cultura *in vitro*, è stato estratto l'RNA totale delle cellule tumorali. Sono state effettuate analisi di espressione genica mediante Real Time PCR. Dati preliminari mostrano come la presenza di MSCs stimoli l'espressione dei geni VEGF e P2X7 in entrambe le linee tumorali considerate (MET-1 e SUM159). Il singolo trattamento con l'inibitore dei recettori purinergici oATP, induce una riduzione dell'espressione dei geni in analisi. Il trattamento congiunto MSCs e oATP determina una inibizione dell'espressione genica: tra l'effetto stimolatorio delle MSCs e quello inibitorio dell'oATP prevale quest'ultimo che determina la riduzione dell'espressione di geni coinvolti nel sostegno e nella proliferazione di cellule tumorali. L'effetto sull'espressione del P2X7, a seguito del trattamento congiunto, risulta essere differente tra le due linee a parziale spiegazione della diversa modulazione nella crescita neoplastica osservata *in vivo*.

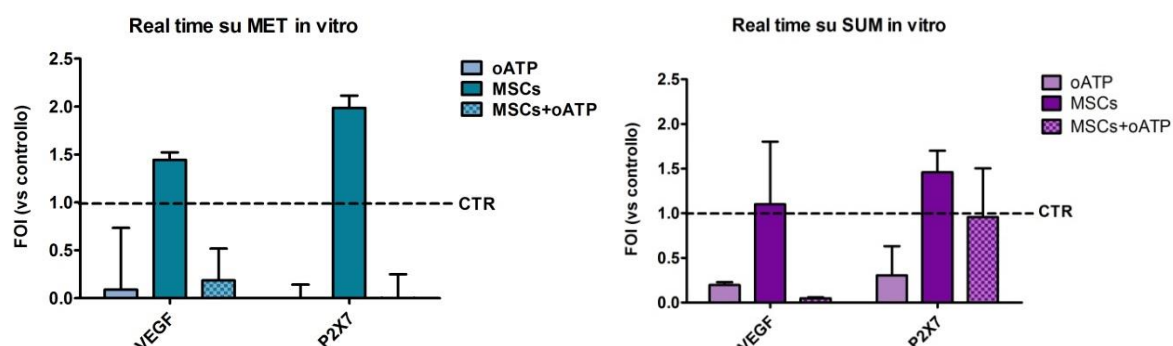


Fig.41 Real time su cellule tumorali per la valutazione dell'espressione di VEGF e P2X7; a) real time per la linea tumorale MET-1; b) real time per la linea cellulare SUM 159. La presenza delle MSCs in coltura stimola l'espressione dei geni VEGF e P2X7; il trattamento con oATP riduce l'espressione dei due geni anche se quando il trattamento viene effettuato in presenza di MSCs.

Questi dati mostrano come ci sia ancora molto da definire riguardo il ruolo di MSCs nella progressione tumorale. Ad oggi il bilancio tra ruolo positivo e negativo di queste cellule risulta essere fortemente controverso. Un recente studio mostra come il loro ruolo possa essere definito in base alla sede di origine. Sembra, infatti, che, mentre MSCs derivate da midollo osseo abbiano un effetto anti tumorale nei gliomi⁷⁸, MSCs derivate da tessuto adiposo, stimolino la proliferazione di cellule tumorali.

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE FUTURE

In conclusione è stato osservato che cellule mesenchimali isolate da tessuto adiposo *in vitro* e *in vivo* stimolano la crescita di diverse linee di carcinoma mammario (murine o umane). L'utilizzo di un inibitore del recettore purinergico P2X7 determina un'inibizione dell'azione esercitata dalle MSCs portando a una regressione del tumore. Alla luce di quanto descritto sarà necessario, quindi, effettuare studi supplementari per indagare il meccanismo molecolare proposto. Esperimenti di Real Time PCR, con particolare attenzione per il pathway attivato dal P2X7, saranno volti a individuare la modulazione dell'espressione genica provocata dalle MSCs nelle cellule tumorali. Sarà inoltre necessario valutare l'azione di inibitori più specifici del recettore purinergico che agiscano selettivamente sul P2X7 inibendone l'attivazione. Inoltre, silenziando, nelle cellule tumorali, il gene P2X7 in assenza o presenza delle MSCs, sarà possibile valutare se effettivamente la presenza del recettore sia l'elemento chiave per la comunicazione tra mesenchimali e cellule neoplastiche. A tal fine saranno condotti quindi, studi sia *in vitro* che *in vivo* che dimostrino il particolare coinvolgimento del recettore nel cross-talking MSCs/cellule tumorali. Sarà inoltre importante effettuare una valutazione della percentuale di CSCs presenti in coltura in presenza o assenza di MSCs, al fine di stabilire se la presenza di queste cellule agisca come stimolatore del differenziamento delle cellule staminali incrementando la popolazione di cellule tumorali differenziate, oppure agisca stimolando la metastatizzazione tumorale. A tal proposito saranno effettuati studi *in vivo* in cui, successivamente all'inoculo delle cellule neoplastiche, il tumore primario verrà asportato e, mediante l'utilizzo di tecniche di imaging, sarà possibile valutare, nel corso del tempo, la formazione di metastasi dovute o meno alla presenza di MSCs. Infine, identificare il pathway molecolare di azione delle MSCs potrebbe permettere di disegnare nuove terapie antineoplastiche mirate contro la comunicazione tra questi tipi cellulari. In base a quanto osservato, lo stesso P2X7 potenzialmente potrebbe costituire un nuovo target terapeutico contro la progressione di alcune tipologie tumorali.

Alla luce di quanto descritto in questo studio, risulta importante, quindi, approfondire il ruolo delle MSCs nelle neoplasie in generale e, in particolare, rispetto al carcinoma mammario. Considerando infatti l'importante ruolo proposto per questa popolazione cellulare come supporto terapeutico nella rigenerazione tissutale o nel drug delivery, risulta fondamentale definire l'influenza che queste cellule esercitano sulla popolazione tumorale per meglio definire il loro ruolo nelle terapie. Inoltre l'utilizzo di cellule mesenchimali è stato proposto anche a supporto della radioterapia o nella chirurgia ricostruttiva dopo mastectomia. Tuttavia, alla luce di quanto emerso riguardo a ruolo delle MSCs proprio nei confronti del carcinoma mammario è necessario rivalutare la loro funzione in questo tipo di interventi.

Bibliografía

- ¹ Korkaya H, Liu S., Wicha M.S. "Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment." *J Clin Invest* 2011;121 (10):3804-3809.
- ² Semenza G. "The hypoxic tumor microenvironment: a driving force for breast cancer progression." *Biochimica et Biophysica Acta* 2015.
- ³ Chaturvedi P, Gilkes DM, Takano N, Semenza GL. "Hypoxia-inducible factor-dependent signaling between triple-negative breast cancer cells and mesenchymal stem cells promotes macrophage recruitment" *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014; 20:2120-9. doi: 10.1073/pnas.1406655111.
- ⁴ Talmadge JE, PhD and Dmitry I. Gabrilovich, MD, PhD. "History of myeloid derived suppressor cells (MDSCs) in the macro- and micro-environment of tumour-bearing hosts" *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(10): 739–752. doi:10.1038/nrc3581.
- ⁵ Mantovani A, Romero P, Palucka AK, Marincola FM "Tumor immunity: effector response to tumor and role of the microenvironment" *The Lancet* 2008; 371:771-783.
- ⁶ Coussens LM, Werb Z. "Inflammation and Cancer" *Nature* 2002 420:16-26.
- ⁷ Wang D, DuBois RN. "Immunosuppression associated with chronic inflammation in the tumor microenvironment" *Carcinogenesis*. 2015; 36(10):1085-93. doi: 10.1093/carcin/bgv123.
- ⁸ Cimino-Mathews A, Foote JB, Emens LA. "Immune targeting in breast cancer" *Oncology* 2015; 29(5):375-85.
- ⁹ Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. "Cancer-related inflammation" *Nature* 2008; 454:436-444.
- ¹⁰ Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. "Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets". *Nat Med*. 2000; 6(4):443-6.
- ¹¹ Cruz-Merino L, Barco-Sánchez, Carrasco FH, Fernández E, Benítez AV, Molina JB, Peinado AM, López AG, Ruiz Borrego M, Villena MCM, Sánchez-Margalet V, Nieto-García A, AlbaConejo,6 Noelia Casares Lagar E, Ibáñez Martínez J. "New Insights into the Role of the Immune

Microenvironment in Breast Carcinoma” Clin Dev Immunol. 2013; 2013:785317. doi: 10.1155/2013/785317.

¹² Hume DA. “The Many Alternative Faces of Macrophage Activation” Front Immunol. 2015; 22:370. doi: 10.3389/fimmu.2015.00370.

¹³ Kise K, Kinugasa-Katayama Y, Takakura N. “Tumor microenvironment for cancer stem cells.” Adv Drug Deliv Rev. 2015; doi: 10.1016/j.addr.2015.08.005.

¹⁴ Sun Z, Wang S, Zhao R.C. “The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment.” Journal of Hemat & Oncol 2014; 7:14

¹⁵ Zubkova ES, Beloglazova IB, Makarevich PI, Boldyreva MA, Sukhareva OY, Shestakova MV, Dergilev KV, Parfyonova YV, Menshikov MY. “Regulation of Adipose Tissue Stem Cells Angiogenic Potential by Tumor Necrosis Factor-Alpha.” J Cell Biochem. 2015; doi: 10.1002/jcb.25263.

¹⁶ Poggi A., Musso A., Dapino I, Zocchi M.R. “Mechanisms of tumor escape from immune system: role of mesenchymal stromal cells.” Immunology letters 2014, 159: 55-72

¹⁷ Thomas DA, Massaguè J. “TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance.” Cancer Cell 2005; 8:369-80

¹⁸ Trapani JA “The dual adverse effects of TGF-beta secretion on tumor progression” Cancer Cell 2005; 8:349-50

¹⁹ Liu S, Ginestier C, Ou SJ “Breast cancer stem cells are regulated by Mesenchymal stem cells through Cytochrome networks” Cancer Res 2011; 71:614-24.

²⁰ Pittenger, Mackay A.M., Beck S.C. “Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.” Science 1999, 284: 143-147.

²¹ Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. “Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells.” The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 2006; 8(4):315-7.

-
- ²² Bernardo ME, Locatelli F., Fibbe WE. "Mesenchymal stromal cells a novel treatment modality for tissue repair" *Ann N Y Acad Sci.* 2009, 1176:101-117.
- ²³ Yi-Ling Si, Ya-Li Zhao, Hao-Jie Hao, Xiao-Bing Fu*, Wei-Dong Han "MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns" *Ageing Research Reviews* 2011; 10: 93–103.
- ²⁴ Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzourt J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr. "Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors." *Anat Rec.* 2001; 264(1):51-62.
- ²⁵ Im GI, Shin & KB Lee "Do to adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow derived cells?" *Osteoarthritis Catilage* 2005;13:845-53.
- ²⁶ Strauer BE, Brehm M., Zeus T., Kosterning M, Hernandez A, Sorg RV, Kogler G, Wernet P "Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans" *Circulation* 2002; 106:1913-18.
- ²⁷ Pittenger M F., Mackay A M., Beck S C., Jaiswal R K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M A, Simonetti D W, Craig S, Marshak DR "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells" *Science* 1999; 284:143-47.
- ²⁸ Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tatenos M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. "Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells." *J Exp Med.* 2001; 193(9):1005-14.
- ²⁹ Hong H.S., Kim Y.H., Son Y. "Perspectives on mesenchymal stem cells: tissue repair, immune modulation, and tumor homing." *Arch Pharm Res* 2012, 35:201-211.
- ³⁰ Bossolasco P, Cova L, Levandis G, Diana V, Cerri S, Lambertenghi Deliliers G, Polli E, Silani V, Blandini F, Armentero MT. "Noninvasive near-infrared live imaging of human adult mesenchymal stem cells transplanted in a rodent model of Parkinson's disease." *Int J Nanomedicine.* 2012;7:435-47. doi: 10.2147/IJN.S27537.

-
- ³¹ Singh T, Prabhakar S, Gupta A, Anald A. "Recruitment of stem cells into the injured retina after laser injury." *Stem Cells Dev* 2012; 21:448-454.
- ³² Vossmerbauer U., Ohnesorge S., Kuehl S., Haapalahiti M, Kluter H. Jonas J.B., Thierse H., Bieback K., " retinal Pigment epithelial phenotype induced in human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2009, 11:177-188.
- ³³ Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Laino L, D'Aquino R, Tirino V. "Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: Biological and clinical implications." *Stem Cells Transl Med* 2013; 2:316-24.
- ³⁴ Wakitani S, Nawata M, Tensho K, Okabe T, Machida H, Ohgushi H. "Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation in a patient with severe osteogenesis imperfecta." *Transplantation* 2005; 79:1607-14.
- ³⁵ Ichim T.E, Solano F, Lara F, Paris E, Ugalde F, Rodriguez JP, Minev B, Bogin V, Ramos F, Woods EJ, "Feasibility of combination allogenic stem cell therapy for spinal cord injury." A case report *Int Arch Med* 2010; 3:30.
- ³⁶ Liu XJ, Zhang JF, Sun B, Peng HS, Kong QF, Bai SS, Liu YM, Wang GY, Wang JH, Li HL. "Reciprocal effect of mesenchymal stem cell on experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by transforming growth factor-beta and interleukin-6." *Clin Exp Immunol.* 2009; 158(1):37-44. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03995.
- ³⁷ Oh JY1, Kim MK, Shin MS, Wee WR, Lee JH. "Cytokine secretion by human mesenchymal stem cells cocultured with damaged corneal epithelial cells." *Cytokine.* 2009; 46(1):100-3. doi: 10.1016/j.cyto.2008.12.011.
- ³⁸ Melief SM, Geutskens SB, Fibbe WE, Roelofs H "Multipotent stromal cells skew monocytes towards an antinflammatory interleukin-10 phenotype by production of interleukin-6." *Hematologica* 2013; 98: 888-895.
- ³⁹ Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E. "Bone marrow

stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production." *Nat Med.* 2009;15(1):42-9. doi: 10.1038/nm.1905.

⁴⁰ Spaggiari GM, Abdelrazik H, Becchetti F, Moretta L. "MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2." *Blood.* 2009; 113(26):6576-83. doi: 10.1182/blood-2009-02-203943.

⁴¹ Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. "Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25 high FOXP3+ regulatory T cells." *Stem Cells.* 2008; 26(1):212-22.

⁴² Stagg J. "Mesenchymal stem cells in cancer." *Stem cell Rev* 2008; 4:119-24.

⁴³ Ritter E, Perry A, Yu J, Wang T, Tang L, Bieberich E. "Breast cancer cell derived fibroblast growth factor 2 and vascular endothelial growth factor are chemotrans for bone marrow stromal stem cells." *Ann Surg* 2008, 247:310-14.

⁴⁴ Gjorgieva D, Zaidman N, Bosnakovski D. " Mesenchymal Stem Cells for anti- cancer drug delivery" *Recent Pat on Anti cancer Drug Discovery* 2013; 8:310-8.

⁴⁵ Sohni A, Verfaillie CM, "Mesenchymal Stem Cell Migration Homing and tracking" *Stem Cells International* 2013; <http://dx.doi.org/10.1155/2013/130763>.

⁴⁶ Stoff-Khalili MA, Rivera AA, Mathis JM, Banerjee NS, Moon AS, Hess A, Rocconi RP, Numnum TM, Everts M, Chow LT, Douglas JT, Siegal GP, Zhu ZB, Bender HG, Dall P, Stoff A, Pereboeva L, Curiel DT. "Mesenchymal stem cells as a vehicle for targeted delivery of CRAds to lung metastases of breast carcinoma." *Breast Cancer Res Treat.* 2007; 105(2):157-67.

⁴⁷ Sonabend AM, Ulasov IV, Tyler MA, Rivera AA, Mathis JM, Lesniak MS. "Mesenchymal stem cells effectively deliver an oncolytic adenovirus to intracranial glioma." *Stem Cells.* 2008; 26(3):831-41. doi: 10.1634/stemcells.2007-0758.

-
- ⁴⁸ Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili MA, Curiel DT, Pereboeva L “Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses.” *Mol Cancer Ther.* 2006; 5(3):755-66.
- ⁴⁹ Tan X., Gong Y.z., Wu P., Liao DF, Zheng XL Mesenchymal stem cell- derived microparticles: a promising therapeutic strategy *Int. J.Mol. Sci* 2014 15:14348-63.
- ⁵⁰ Bruno S., Collino F., Deregibus MC., Grange C., Tetta C., Camussi G. “ Microvesicle from human bone marrow mesenchymal stem cells inhibit tumor growth.” *Stem cells Dv* 2012; 22:758-71.
- ⁵¹ Zhu W, Haung L, Li Y, Zhang X, Gu J, Yan Y, Xu X, Wang M, Qian H, Xu W. “Exosomes derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote tumor growth in vivo”. *Cancer Lett* 2012 31: 28-37.
- ⁵² El-Heabi CP, Karnoub AE. “Mesenchymal stem cells in the pathogenesis and therapy of breast cancer” *J Mammary Biol Neoplasia* 2010, 15:399-409.
- ⁵³ Si YL, Zhao YL, Hao HJ, Fu XB, Han WD “MSCs: Biological characteristics, clinical applications and their outstanding concerns.” *Ageing Res Rev.* 2011 (1):93-103. doi: 10.1016/j.arr.2010.08.005.
- ⁵⁴ Ke CC, Liu RS, Suetsugu A, Kimura H, Ho JH, Lee OK, Hoffman RM. “In vivo Fluorescence imaging reveals the promotion of mammary tumorigenesis by mesenchymal stromal cells” *PlosOne* 2013, vol8/iss7/e69658.
- ⁵⁵ Massagué J. “TGF- β in cancer “ *Cell* 2008, 134:215-30.
- ⁵⁶ Loomans HA, Andl CD, “Intertwining of activating A and TGF- β signaling: dual roles in cancer progression and cancer cell invasion” *Cancers* 2015, 7:70-91.
- ⁵⁷ Takai E, Tsukimoto M, Harada H, Sawada K, Moriyama Y, Kojima S. “ Autocrine regulation of TGF- β induced cell migration by exocytosis of ATP and activation of P2 receptor in human lung cancer cells” *Jorn of Cell Science* 2012,125:5051-60.
- ⁵⁸ Abbracchio MP, Burnstock G “Purinoreceptors: are there families of P2X and P2Y purinoreceptors?”. *Pharmacol Ther.* 1994;64(3):445-75.

-
- ⁵⁹ Di Virgilio F, Sanz JM, Chiozzi P, Falzoni "The P2Z/P2X7 receptor of microglial cells: a novel immunomodulatory receptor." *Prog Brain Res.* 1999;120:355-68.
- ⁶⁰ Di Virgilio F. "Purines, purinergic receptors and cancer". *Cancer Research* 2012; 72(21):5441-47.
- ⁶¹ Adinolfi E, Raffaghello L, Giuliani AL, Cavazzini L, Capece M, Chiozzi P, Bianchi G, Kroemer G, Pistoia V, Di Virgilio F. "Expression of P2X7 Receptor Increases In Vivo tumor growth" *Cancer Research* 2012; 72(12):2957-69.
- ⁶² Beigi RD, Kertesz SB, Aquilina G, Dubyak GR. "Oxidized ATP (oATP) attenuates proinflammatory signaling via P2 receptor-independent mechanisms." *Br J Pharmacol.* 2003;140(3):507-19.
- ⁶³ Bulte JW, Kraitchman DL, "Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging", *NMR Biomed*, 2004; 17(7):484-99.
- ⁶⁴ Lewis JS, Achilefu S, Garbow JR, Laforest R, Welch MJ., "Small animal imaging. Current technology and perspectives for oncological imaging", *Eur J Cancer*, 2002; 38(16):2173-88.
- ⁶⁵ Lucignani G, Ottobriani L, Martelli C, Rescigno M, Clerici M, "Molecular imaging of cell-mediated cancer immunotherapy", *Trends Biotechnol*, 2006; 24(9):410-8.
- ⁶⁶ Massoud TF, Gambhir SS, "Integrating noninvasive molecular imaging into molecular medicine: an evolving paradigm", *Trends Mol Med*, 2007; 13(5):183-91.
- ⁶⁷ Livingston JN, "Genetically engineered mice in drug development", *J Intern Med*, 1999; 245(6):627-35.
- ⁶⁸ Gassmann M, Hennet T, "From genetically altered mice to integrative physiology", *News Physiol Sci*, 1998; 13:53-57.
- ⁶⁹ Spibey CA, Jackson P, Herick K, "A unique charge-coupled device/xenon arc lamp based imaging system for the accurate detection and quantitation of multicolour fluorescence", *Electrophoresis* 2001; 22(5):829-36.

-
- ⁷⁰Gross S, Piwnica-Worms D, “Spying on cancer: molecular imaging in vivo with genetically encoded reporters”, *Cancer Cel*, 2005; 7(1):5-15.
- ⁷¹ Ottobriini L, Ciana P, Biserni A, Lucignani G, Maggi A, “Molecular imaging: A new way to study molecular processes in vivo”, *Mol Cell Endocrinol*, 2006; 246(1-2):69-75.
- ⁷² Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY, “Improved monomeric red orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein”, *Nat Biotechnol*, 2004; 22(12):1567-72.
- ⁷³ Shcherbo D, Merzlyak EM, Chepurnykh TV et al “Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging”, *Nat Methods*, 2007; 4(9):741-6.
- ⁷⁴ Swirski Swirski FK, Berger CR, Figueiredo JL, et al “A Near-Infrared Cell Tracker Reagent for Multiscopic In vivo Imaging and Quantification of Leukocyte Immune Responses”, *PLoS One*, 2007; 2(10):e1075.
- ⁷⁵ Noh YW, Lim YT, Chung BH “Noninvasive imaging of dendritic cell migration into lymph nodes using nearinfrared fluorescent semiconductor nanocrystals”, *FASEB J*, 2008; 22(11):3908-18
- ⁷⁶ Sen D, Deerinck TJ, Ellisman MH, Parker I, Cahalan MD, “Quantum Dots for Tracking Dendritic Cells and Priming an Immune Response In vitro and In vivo”, *PLOS ONE*, 2008; 3(9):1-13
- ⁷⁷ Chen C, Okayama H “High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA.” *Mol Cell Biol* 1987; 7:2745–2752.
- ⁷⁸ Del Fattore A, Luciano R, Saracino R, Battafarano G, Rizzo C, Pascucci L, Alessandri G, Pessina A, Perrotta A, Fierabracci A, Muraca M. “Differential effects of extracellular vesicles secreted by mesenchymal stem cells from different sources on glioblastoma cells.” *Expert Opin Biol Ther*. 2015;15(4):495-504. doi: 10.1517/14712598.2015.997706.

RINGRAZIAMENTI

Per prima cosa vorrei ringraziare il Prof. Lucignani e la Dott.ssa Ottobriani per avermi accolto nel loro laboratorio e avermi accompagnata in questo percorso con impegno e disponibilità.

Vorrei inoltre ringraziare tutto il gruppo di Sanipedia, il Dott. Fabio Bianco, Caludio, Cinzia, Noemi e Arianna per il supporto e la disponibilità

Grazie a Luisa per avermi dato fiducia, per i continui incoraggiamenti e i “non ti preoccupare che ce la facciamo”, lo so, sono un po’ disfattista alle volte, ma il tuo entusiasmo mi ricorda sempre perché ho scelto questa strada.

Un particolare grazie a Cristina per l’infinita pazienza, la disponibilità, la competenza e i sorrisi, perché è bello lavorare in questo clima.

Ad Alessia perché pensavo di essermene liberata ma proprio non vuole smettere di perseguitarmi ed è rassicurante averla nella mia vita.

Infinite grazie alla mia splendida famiglia, a mia madre: la mia ispirazione, a Laurenza: la mia certezza, a Luca per i suoi sorrisi, ma soprattutto alla mia nuova ragione di vita, il mio splendido piccolo Peppuzzo perché è la nostra gioia e adesso tutto sarà per lui.

A mio marito (non mi abituerò mai!), Alessio, la mia roccia, la mia ancora per sempre, perché sa sempre come rendere più leggera la mia vita.

Grazie ai miei amici, vicini e lontani perché dividere le gioie con loro dà un senso alla fatica.

Grazie a mio padre, il mio esempio, la ragione per cui sono qui oggi.